

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 426**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2013 PCT/US2013/070184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14078588**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2013 E 13855041 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2920311**

54 Título: **Métodos y composiciones para procesar biomasa con niveles elevados de almidón**

30 Prioridad:

**14.11.2012 US 201261726301 P**  
**11.03.2013 US 201313793078**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.07.2020**

73 Titular/es:

**AGRIVIDA, INC. (100.0%)**  
**200 Boston Avenue, Suite 2975**  
**Medford, MA 02155, US**

72 Inventor/es:

**LESSARD, PHILIP A.;**  
**LANAHAN, MICHAEL;**  
**SAMOYLOV, VLADIMIR;**  
**BOUGRI, OLEG;**  
**EMERY, JONAS;**  
**RAAB, R. MICHAEL y**  
**ZHANG, DONGCHENG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 774 426 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para procesar biomasa con niveles elevados de almidón

### Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 61/726.301, presentada el 14 de noviembre de 2012 y de la Solicitud de patente de EE. UU. 13/793.078 presentada el 11 de marzo de 2013.

El Listado de Secuencias titulado "Listado de Secuencias" que tiene un tamaño de archivo de aproximadamente 1.236.591 bytes, se creó el 14 de noviembre de 2013 y es presentada en la presente memoria.

### Declaración de apoyo gubernamental

10 Esta invención se realizó, al menos en parte, con el apoyo del gobierno con el número de adjudicación 2009-10001-05118 otorgado por el Instituto Nacional de Alimentos y Agricultura de EE. UU., USDA. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

### Campo de la invención

15 La descripción en la presente memoria se refiere a ácidos nucleicos aislados, construcciones genéticas y vectores para modificar plantas por ingeniería con niveles elevados de almidón vegetativo y que expresan enzimas que degradan polisacáridos y plantas genéticamente modificadas. La descripción también se refiere a métodos de procesamiento agrícola y preparación de piensos para animales usando las plantas genéticamente modificadas.

### Antecedentes

20 La glucosa es un azúcar simple que se puede usar en una variedad de alimentos, piensos y aplicaciones químicas. Sin embargo, la disponibilidad y el coste de la glucosa se han convertido recientemente en un factor limitante en la demanda de una materia prima de biocombustibles de bajo coste y una alimentación animal sostenible. La demanda de maíz y caña de azúcar ha aumentado significativamente el precio de este producto. El almidón es un polímero grande compuesto de restos de glucosa repetidos unidos a través de enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 (Stitt y Samuel C Zeeman 2012). El almidón es una fuente superior de glucosa debido a su estructura molecular simple (enlaces de glucosa  $\alpha$ -1-4 y  $\alpha$ -1-6) y la relativa facilidad con la que se accede a estos enlaces y se hidrolizan mediante enzimas económicas y altamente eficaces (p. ej.;  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa). El almidón derivado de materiales vegetales se puede convertir fácilmente en glucosa bien en el tracto digestivo de los animales (aplicaciones para piensos) o bioquímicamente (por ejemplo, por hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática). La hidrólisis de tejidos vegetales con alto contenido de almidón como el grano proporciona glucosa relativamente pura que se transforma de manera eficaz en carne o productos químicos finales.

30 La glucosa también puede derivar de otros polímeros producidos en plantas, tal como celulosa,  $\beta$ -glucano o xiloglucanos. Sin embargo, los procesos para liberar la glucosa de estos polímeros son generalmente mucho menos eficaces; los animales rumiantes y monogástricos los digieren con menos facilidad y los medios químicos para liberar la glucosa generalmente implican tratamientos químicos agresivos seguidos de hidrólisis con cócteles enzimáticos caros (Alvira et al. 2010).

35 La sacarosa, un carbohidrato de almacenamiento soluble, también es una molécula de materia prima derivada de plantas que los organismos fermentativos utilizan fácilmente. Los sistemas de cultivo y procesamiento que utilizan materias primas de sacarosa, como la remolacha azucarera y el sorgo dulce, están limitados por estrechas ventanas de cosecha y limitaciones de almacenamiento y estabilidad. El sorgo dulce debe procesarse de manera similar a la caña de azúcar, pocos días después de su cosecha para limitar la fermentación microbiana de la sacarosa debido al alto contenido de humedad en los materiales cosechados (deterioro). Los períodos de campaña reducen la eficacia general del capital de las instalaciones de procesamiento dedicadas.

45 Los sustratos lignocelulósicos son materias primas menos atractivas debido a dificultades de procesamiento. La biomasa lignocelulósica contiene una mezcla de hexosas y pentosas y su recalcitrancia a la hidrólisis (cristalinidad y reticulación a la lignina) dificulta la digestión y la degradación rentable en azúcares utilizables. En la producción de biocombustibles, se están desarrollando costosos tratamientos previos para ayudar en la hidrólisis completa de materiales lignocelulósicos. La plena utilización de las mezclas de azúcares resultantes para la producción de combustible y productos químicos también necesita que los organismos de fermentación especializados transformen los azúcares resultantes en productos finales, tales como etanol, butanol, ácido succínico y otros productos químicos.

### Compendio

50 En un aspecto, la invención se refiere a una planta genéticamente modificada. La planta genéticamente modificada comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La planta genéticamente modificada también comprende un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos. Tras la expresión del primer ácido nucleico, la planta genéticamente modificada tiene un nivel alterado

de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón vegetativo en una planta no modificada genéticamente que tiene el mismo fondo genético que la planta genéticamente modificada pero que carece del primer ácido nucleico aislado.

5 En un aspecto, la invención se refiere a una construcción genética. La construcción genética incluye un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La construcción genética también incluye un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos.

10 En un aspecto, la invención se refiere a un método de procesamiento agrícola o preparación de alimento para animales. El método comprende proporcionar una planta genéticamente modificada. La planta genéticamente modificada comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La planta genéticamente modificada también comprende un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos. Tras la expresión del primer ácido nucleico, la planta genéticamente modificada tiene un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón vegetativo en una planta no modificada genéticamente.

### Breve descripción de los dibujos

20 La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la presente invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones particulares. Se entiende, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos mostrados. En los dibujos:

Las FIG. 1A - G ilustran estrategias para expresar ARN de interferencia en plantas transgénicas.

La FIG. 2 ilustra un vector intermedio de ARNi, pAL409.

25 La FIG. 3 ilustra un diagrama de un microARN de origen natural (osa-MIR528; SEQ ID NO: 159) de arroz. Las secuencias iniciadoras están encuadradas y pueden modificarse para cambiar la especificidad de direccionamiento del microARN (adaptado de Wartmann et al. 2008).

La FIG. 4 ilustra un diagrama de un gen sintético para expresar un solo ARNh.

La FIG. 5 ilustra una construcción genética que incluye casetes de expresión para dos ARNh.

La FIG. 6 ilustra casetes de ARNi dirigidos a genes GWD, DSP e ISA3 de arroz.

30 La FIG. 7 ilustra la comparación de secuencias entre la Consulta (secuencia superior), una porción de GWD2 [SEQ ID NO: 181], derivada del gen del glucano, agua dicinasa y la Objeto (secuencia inferior), una porción del gen GWD del tomate (*Solanum lycopersicon*) [SEQ ID NO: 182].

La FIG. 8 ilustra pAL409j SbGWDko2.

La FIG. 9 ilustra la detección de homólogos de ISA3 mediante transferencia Southern.

35 La FIG. 10 ilustra la alineación de fragmentos de los genes GWD de arroz (OsGWD) [SEQ ID NO: 196 y 200], sorgo (SbGWD) [SEQ ID NO: 197 y 201], maíz (ZmGWD) [SEQ ID NO: 198 y 202] y tomate (S1GWD) [SEQ ID NO: 199 y 203]. También se ilustran los cebadores dgGWup2 [SEQ ID NO: 204] y dgGWdown2 [SEQ ID NO: 205].

La FIG. 11 ilustra la comparación de la longitud relativa y el posicionamiento de intrones dentro del segmento central de homología de genes GWD de arroz, sorgo, Arabidopsis y mijo.

40 La FIG. 12 ilustra una representación de matriz de puntos de alineaciones BLASTn entre las secuencias genómicas de mijo y de arroz para los genes del glucano agua dicinasa. Eje horizontal, secuencia de mijo; eje vertical, secuencia de arroz. Los segmentos diagonales representan regiones donde las dos secuencias son altamente homólogas.

La FIG. 13 ilustra los niveles de ARNm de GWD entre plantas que portan pAG2100 o pAG2101 y plantas de control de tipo silvestre (TS).

La FIG. 14 ilustra los niveles de ARNm de DSP entre plantas que portan pAG2102 y controles de TS.

45 La FIG. 15 ilustra los niveles de ARNm de ISA3 entre plantas que portan pAG2103 y plantas de control de TS.

La FIG. 16 ilustra la expresión del gen GDW en el maíz transgénico silenciado con ARNi producido a partir de las construcciones pAG4102 y pAG4103.

Las FIG. 17A - B ilustran almidón elevado entre líneas selectas de arroz (17A) y mijo (17B) que portan construcciones de ARNi.

La FIG. 18 ilustra el contenido de almidón en líneas de arroz transgénico, recolectado aproximadamente 19 semanas después de la siembra.

5 La FIG. 19 ilustra un cuadro que representa el contenido de almidón (mg de almidón por gramo de peso seco de paja) en poblaciones de plantas de arroz transgénicas, portando cada una de ellas una de 11 construcciones diferentes numeradas secuencialmente de 2107 a 2117. Nipponbarre son líneas de arroz de control no transformadas.

La FIG. 20 ilustra el peso seco de plantas de arroz transgénicas que portan 2116 construcciones y plantas de arroz de control no transformadas (NB).

10 La FIG. 21 ilustra el rendimiento de glucosa a partir de paja de arroz transgénica (mezcla de Os; barras negras) producida utilizando las construcciones pAG2110, pAG2115 y pAG2116 y mezcla de NB de control no transgénicas (arroz Nipponbarre no transgénico; barras grises) después del tratamiento previo con ácido sulfúrico 0,25 M (ácido) a 95 °C durante 4 o 16 horas o a 120 °C durante 1 hora e hidrólisis enzimática.

15 La FIG. 22 ilustra la recuperación de glucosa de la mezcla de control de NB (barras blancas) y la mezcla transgénica (barras negras) producidas con las construcciones pAG2110, pAG2115 y pAG2116 después del tratamiento previo con ácido sulfúrico 0,25 M (ácido; pH 1,0), NH<sub>4</sub>OH al 7,5 % (base; pH 12.0) o (NH<sub>4</sub>)HSO<sub>3</sub> 0,175 M+ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,18 M(bisulfito; pH 8,1) a 95 °C durante 4 o 16 horas.

La FIG. 23 ilustra la recuperación de xilosa del control (barras blancas) y la biomasa transgénica (barras negras) después del tratamiento previo con ácido sulfúrico 0,25 M (ácido; pH 1,0), NH<sub>4</sub>OH al 7,5 % (base; pH 12.0) o (NH<sub>4</sub>)HSO<sub>3</sub> 0,175 M+ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,18 M(bisulfito; pH 8,1) a 95 °C durante 4 o 16 horas.

20 La FIG. 24 ilustra los rendimientos de glucosa a partir de biomasa de plantas de arroz transgénicas individuales 2110\_13 (barras negras) y 2110\_21 (barras gris oscuro) producidas a partir de la construcción pAG2110 en comparación con la del tejido de control (mezcla de NB; barras blancas) después de tratamiento previos con ácido, base, bisulfito o Ca(OH)<sub>2</sub> e hidrólisis enzimática.

25 La FIG. 25 ilustra el crecimiento de células de levadura medido por el número de unidades formadoras de colonias por ml de volumen de cultivo (UFC/ml) durante la sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa de arroz (cuadrado; mezcla transgénica), plantas de control no transgénicas (diamante; mezcla de control NB) y control de glucosa (triángulo).

La FIG. 26 ilustra la liberación y el consumo de glucosa durante la sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa de arroz (cuadrado; mezcla transgénica), plantas de control no transgénicas (diamante; mezcla de control NB) y control de glucosa (triángulo).

30 La FIG. 27 ilustra la producción de etanol durante la sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa de arroz (cuadrado; mezcla transgénica), plantas de control no transgénicas (diamante; mezcla de control NB) y control de glucosa (triángulo).

La FIG. 28 ilustra un diagrama de un casete de expresión para una única enzima que degrada la pared celular (CWDE, por sus siglas en inglés).

35 La FIG. 29 ilustra una construcción compuesta por un casete de expresión para un ARNh y casetes de expresión para tres CWDE.

La FIG. 30 ilustra el contenido de almidón, actividad xilanasas y actividad endoglucanasa entre plantas transgénicas que portan casetes de expresión de pAG4110 y pAG4111 y plantas de control.

40 La FIG. 31 ilustra los rendimientos de glucosa de plantas transgénicas que portan casetes de expresión de pAG4206, pAG4110 y pAG4111 y controles de TS.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Cierta terminología se usa en la siguiente descripción solo por conveniencia y no es limitante.

45 "Ácido nucleico aislado" "polinucleótido aislado" "oligonucleótido aislado" "ADN aislado" o "ARN aislado" como se emplea en esta memoria se refiere a un ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, ADN o ARN separado del organismo del que se origina o del genoma, ubicación o moléculas de origen natural, con los que normalmente está asociado, o es un ácido nucleico que se produjo a través de un proceso sintético.

"Proteína aislada" "polipéptido aislado" "oligopéptido aislado" o "péptido aislado" como se emplea en esta memoria se refiere a una proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido separado del organismo del que se origina o de la ubicación o moléculas de origen natural con las que normalmente está asociado.

50 Como se emplea en esta memoria, "variante" se refiere a una molécula que conserva una actividad biológica que es igual o sustancialmente similar a la de la secuencia original. La variante puede ser de la misma especie o diferente o

ser una secuencia sintética basada en una molécula natural o anterior.

Los ácidos nucleicos, secuencias de nucleótidos, proteínas o secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta memoria pueden aislarse, purificarse, sintetizarse químicamente o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica.

5 Como se emplea en esta memoria, "operativamente unido" se refiere a la asociación de dos o más biomoléculas en una configuración relativa entre sí de tal manera que se pueda realizar la función normal de las biomoléculas. En relación con las secuencias de nucleótidos, "operativamente unido" se refiere a la asociación de dos o más secuencias de un ácido nucleico en una configuración relativa entre sí de tal manera que se pueda realizar la función normal de las secuencias. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia previa a líder secretora está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos para un polipéptido si se expresa como una proteína previa que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia codificante; y un sitio de unión al ribosoma del ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia codificante si está posicionado de manera que facilite la unión del ribosoma al ácido nucleico.

15 Las palabras "un" y "uno" como se usan en las reivindicaciones y en las partes correspondientes de la memoria descriptiva, se definen como que incluyen uno o más de los elementos a los que se hace referencia a menos que se indique específicamente lo contrario. Esta terminología incluye las palabras arriba mencionadas específicamente, derivados de las mismas y palabras de importancia similar. La frase "al menos uno" seguida de una lista de dos o más elementos, tal como "A, B o C", significa cualquiera individual de A, B o C, así como cualquier combinación de los mismos.

El aumento del contenido de almidón de la biomasa puede aumentar el contenido de energía (calorías) en piensos animales o mejorar la extracción de glucosa de la biomasa para la producción de etanol u otros productos bioquímicos.

25 Una estrategia para aumentar la disponibilidad de glucosa en la biomasa derivada de plantas que se va a utilizar como pienso para animales o como materia prima para productos químicos sería hacer que las plantas acumulen almidón adicional. Tal almidón adicional tanto aumentaría la cantidad total de glucosa presente en la biomasa como haría que una mayor porción de esa glucosa se extrajera fácilmente. Para aumentar la cantidad de almidón que se acumula en la biomasa, particularmente en partes vegetativas (sin semillas) de la planta, se pueden modular los procesos normales por los cuales las plantas sintetizan y renuevan almidón vegetativo.

30 Las plantas generalmente sintetizan almidón en los tejidos vegetativos durante el día, mientras que por la noche degradan el almidón para movilizar el azúcar resultante con el fin de satisfacer las necesidades energéticas de la planta. Las células vegetales vegetativas expresan una serie de enzimas para iniciar la movilización del almidón transitorio durante la noche (Stitt y Samuel C Zeeman 2012). Entre estas están la Glucano Agua Dicinasa ("GWD"), que fosforila el polímero de almidón y la Fosfoglucono Agua Dicinasa (PWD), que fosforila aún más el almidón. Estas etapas en la renovación de almidón hacen que el polímero de almidón sea accesible para las enzimas que degradan almidón posteriores. Una serie de enzimas que degradan el almidón pueden unirse al polisacárido fosforilado, pero la despolimerización (hidrólisis) del gránulo de almidón no progresa de manera eficaz hasta que el polímero de almidón se desfosforila a través de la acción de enzimas como la proteína fosfatasa de doble especificidad (DSP) u otras fosfoglucono fosfatasas. Posteriormente, enzimas como las beta amilasas (BAM), isoamilasas (tal como ISA3), alfa amilasas (AMY), enzimas de desramificación (DBE), enzimas desproporcionadoras (DPE) y dextrinasas limitantes, convierten el polímero de almidón en glucanos lineales, oligosacáridos cortos tales como maltosa y glucosa. Para desarrollar biomasa que tenga más utilidad y mayor valor como producto alimenticio (p. ej., cuando se formula como ración de pienso o cuando se usa en ensilado) o como materia prima industrial (p. ej., para proporcionar glucosa para la producción fermentativa de etanol u otros productos bioquímicos), se buscó un aumento de la acumulación de almidón en los tejidos vegetativos reduciendo la expresión o actividad de las enzimas clave implicadas en la renovación del almidón transitorio.

50 Una realización proporciona un método para la alteración de la cantidad de almidón que se acumula en los tejidos vegetativos de las plantas mediante la inhibición de la actividad de las enzimas que normalmente son responsables de movilizar el almidón vegetativo (en adelante denominado "Almidón Verde" o "almidón vegetativo") durante los ciclos día/noche. Los ácidos nucleicos aislados se proporcionan para alterar la cantidad de almidón que se acumula en los tejidos vegetativos de las plantas mediante la inhibición de la actividad de las enzimas que normalmente son responsables de movilizar el almidón Verde. Se proporcionan plantas genéticamente modificadas, que incluyen ácidos nucleicos para la alteración de la cantidad de almidón que se acumula en los tejidos vegetativos de las plantas mediante la inhibición de la actividad de las enzimas que normalmente son responsables de movilizar el almidón Verde. Cualquier planta se puede proporcionar como planta genéticamente modificada.

55 En una realización, las plantas también pueden ser genéticamente modificadas para expresar enzimas que degradan polisacáridos. Las plantas genéticamente modificadas que tienen niveles elevados de almidón vegetativo también pueden expresar una o más enzimas que degradan polisacáridos. Las enzimas que degradan polisacáridos pueden ser enzimas que degradan almidón. Las enzimas que degradan el almidón pueden ser, pero sin limitación, amilasas (BAM), isoamilasas (tal como ISA3), alfa amilasas (AMY), enzimas de desramificación (DBE), enzimas

desproporcionadoras (DPE), dextrinas límite, glucoamilasas, glucotransferasas, glucosidasas o invertasas. Las enzimas que degradan polisacáridos pueden ser enzimas que degradan la pared celular (CWDE) o CWDE modificadas. Las formas modificadas pueden ser proteínas CWD modificadas por inteína. Las enzimas modificadas por inteína y las condiciones para inducir el corte y empalme de las inteínas, que podría usarse como condiciones de activación, se describieron en la Solicitud de EE.UU. 10/886.393 presentada el 7 de julio de 2004 y en PCT/US10/55746 presentada el 5 de noviembre de 2010 y en PCT/US10/55669 presentada el 5 de noviembre de 2010 y en PCT/US10/55751 presentada el 5 de noviembre de 2010. Una o más enzimas que degradan polisacáridos pueden ser, pero sin limitación, una enzima seleccionada de XynA: Beta-1,4-xilanasa 229B de *Dictyoglomus thermophilum* (Registro de Uniprot P77853); XynB: Endo-1,4-beta-xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* (Registro de Uniprot O43097); EGA: Endo-beta 1,4-endoglucanasa de *Nasutitermes takasagoensis* (Registro de Uniprot O77044); EGB: Endo-beta 1,4-endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (Registro de Uniprot P54583); AccA: Feruloil esterasa A de *Apergillus niger* (Registro de Uniprot O42807); AccB: Feruloil esterasa B de *Aspergillus niger* (Número de registro de Uniprot Q8WZ18); AccA/B: Feruloil esterasa A y Feruloil esterasa B de *Aspergillus niger*; EGC: Endo-beta 1,4-endoglucanasa de *Rhodothermus marinus* (Registro de Uniprot O33897); P40942: Beta-1,4-xilanasa de *Clostridium stercorarium* F9 (Número de registro de Uniprot P40942); P40943: Beta-1,4-xilanasa de *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (*Bacillus stearothermophilus*; Número de registro de Uniprot P40943); O30700: Beta-1,4-xilanasa de *Bacillus* sp. NG-27 (Número de registro de Uniprot O30700); CBHA: celobiohidrolasa A de *Clostridium thermoCELLUM* (Número de registro de Uniprot O68438); CBHB: celobiohidrolasa B (SYT BD22308); o XynE: xilanasa (EU591743).

Las realizaciones en la presente memoria proporcionan cosechar plantas que tienen niveles elevados de almidón y/o enzimas que degradan polisacáridos *in plantam* para su uso como materia prima en el procesamiento agrícola. La biomasa de plantas genéticamente modificadas que expresan enzimas que degradan polisacáridos pueden no requerir tratamientos previos severos para mejorar la accesibilidad de la pared celular de celulosa a las enzimas exógenas. Los métodos y composiciones para el tratamiento previo consolidado y la hidrólisis de la biomasa de plantas que expresan enzimas que degradan la pared celular se describieron en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 13/414.627, presentada el 7 de marzo de 2012; y en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2012/028132, presentada el 7 de marzo de 2012.

En una realización, se proporcionan aplicaciones en piensos  $p < r <$  animales que incluyen niveles aumentados de almidón en tejidos vegetativos. Los azúcares fácilmente fermentables disponibles en un proceso de fermentación pueden proporcionarse mediante realizaciones en la presente memoria. La producción de biocombustibles se puede potenciar proporcionando azúcares fácilmente fermentables. Los métodos para proporcionar azúcares fácilmente fermentables y los métodos para potenciar la producción de biocombustibles se proporcionan como realizaciones en la presente memoria.

Los cultivos con niveles elevados de almidón vegetativo tienen una variedad de usos y utilidades. En una realización, se proporciona biomasa de plantas que acumulan niveles elevados de almidón vegetativo en relación con las plantas de tipo silvestre. Estas plantas pueden tener un valor añadido como materia prima para procesos de fermentación o aplicaciones de piensos para animales. Por ejemplo, en un proceso celulósico típico, los polisacáridos tales como la celulosa y las hemicelulosas que están presentes en la biomasa se hidrolizan a azúcares simples, que se pueden fermentar después a etanol, butanol, isobutanol, ácidos grasos u otros hidrocarburos por microorganismos. Debido a la recalcitración de la biomasa, la liberación de azúcares simples a partir de polímeros tales como celulosa y hemicelulosas, con frecuencia necesita el uso de condiciones de tratamiento previo severas e hidrólisis con mezclas de enzimas relativamente caras. Por el contrario, cualquier almidón que esté presente en la biomasa representa una fuente adicional de azúcares simples (a saber, glucosa), que pueden liberarse muy fácilmente y de forma mucho menos costosa con tratamientos con ácido diluido o con hidrólisis por amilasas, que están actualmente disponibles y son mucho menos costosas que las enzimas necesarias para la digestión de celulosa y hemicelulosas. Como resultado, cualquier aumento en la cantidad de almidón presente en la biomasa aumentará simultáneamente la cantidad de azúcar fermentable que se puede recuperar (y, por lo tanto, la cantidad de etanol, butanol, etc. que se puede hacer) con solo un aumento desproporcionadamente pequeño en los costes del proceso (es decir, la adición de una amilasa o un tratamiento previo con ácido de bajo coste). De manera similar, la biomasa que contiene niveles elevados de almidón puede tener mayor valor en las aplicaciones de forraje, donde el material vegetal se utiliza para alimentar al ganado. De nuevo, el exceso de almidón presente en este material es digerido más fácilmente por la mayoría de los animales que el material celulósico, proporcionando más energía por unidad de biomasa que la biomasa con niveles normales de almidón. Las realizaciones incluyen la utilización de una planta transgénica como se establece en la presente memoria para cualquiera de estos métodos.

Los métodos en la presente memoria, incluidos los del párrafo anterior, pueden incluir modificar plantas para crear plantas genéticamente modificadas, cultivar las plantas genéticamente modificadas, cosechar las plantas y procesarlas para aplicaciones de piensos para animales como se haría con otros cultivos forrajeros, o secarlas y tratarlas para su uso en procesos de fermentación similares a la forma de tratamiento que se usa en los procesos celulósicos pero con la adición de un tratamiento tal como hidrólisis ácida o digestión por amilasas para la hidrolización del almidón a sus azúcares componentes. Cualquier etapa, conjunto de etapas, o todas las etapas establecidas en este párrafo se pueden proporcionar en un método en la presente memoria.

Se identificaron genes para la alteración del almidón verde. Cualquier enzima, proteína o el ácido nucleico implicados en el metabolismo del almidón pueden ser objeto de alteración de los niveles de Almidón Verde. En una realización, la alteración se logra mediante la supresión de la expresión génica de genes relacionados con el Almidón Verde. En una realización, la alteración es un aumento en la cantidad de Almidón Verde. Las enzimas particulares que pueden ser dianas incluyen, entre otras, Glucano Agua Dicinasa (también conocida como GWD, R1, sex1); Fosfoglucono Agua Dicinasa (también conocida como PWD); Proteína Fosfatasa de Especificidad Dual (también conocida como DSP, sex4);  $\beta$ -amilasa (BAM), isoamilasa (también conocida como ISA3), dextrinasas límite (también conocidas como LDA); enzima desproporcionadora; y otras enzimas de desramificación. GWD fosforila el almidón, que después es susceptible a las enzimas que degradan el almidón. PWD fosforila el almidón y puede depender de la acción previa de GWD por epistasia. La DSP es reguladora y puede activar enzimas que degradan el almidón. DSP también puede fosforilar almidón. También, se sospecha que DSP tiene actividad endo-amilasa, que puede ser sinérgica con la movilización de almidón por  $\beta$ -amilasa e isoamilasa. BAM (pero no  $\alpha$ -amilasa) e ISA3 están implicadas en la movilización del almidón vegetativo. La actividad de BAM depende de GWD y la actividad de ISA3 depende de BAM.

Hay varias estrategias disponibles para interferir con la expresión o acumulación de actividades enzimáticas en las plantas. Entre estas están el ARN antisentido, supresión conjunta e interferencia de ARN (Frizzi & Huang 2010 y Chi-Ham et al. 2010), mutagénesis y estrategias de exploración tal como TILLING (Sikora et al. 2011), inserción de ADN-T y mutagénesis basada en transposones (An et al. 2005), estrategias de edición del genoma que implican nucleasas como las nucleasas de dedos de zinc (Wright et al. 2005), nucleasas efectoras TAL (Christian et al. 2010), o meganucleasas derivadas de inteína (Wehrkamp-Richter et al. 2009).

Se han desarrollado varias estrategias de edición del genoma para introducir cambios estables que bloquean total o parcialmente (es decir, silencian o atenúan) la expresión de genes que codifican enzimas que están implicadas en la movilización del almidón transitorio. Entre estas están eliminar regiones críticas en los promotores, secuencias de codificación, o secuencias terminadoras de los genes o cambiar o eliminar restos de aminoácidos clave en el dominio catalítico de las enzimas para reducir la actividad de la enzima que se expresa. Se pueden introducir cambios introduciendo un transgén que expresa una nucleasa recombinante en plantas transgénicas que expresa una nucleasa recombinante que está diseñada para escindir el gen diana como se describió anteriormente (Puchta et al. 1993; Wright et al. 2005 y Wehrkamp-Richter et al. 2009). El gen diana puede ser en sí mismo, un transgén separado o un gen endógeno natural de la planta. Una vez expresada, la nucleasa introducirá rupturas de ADN bicatenario en la secuencia diana, por ejemplo, eliminando un segmento corto que después se puede reparar parcialmente por los mecanismos de reparación del ADN de la célula, dejando una lesión dentro del gen diana. Una vez que el gen diana se ha escindido, el gen de la nucleasa ya no es necesario. Si el gen de la nucleasa se introdujo en sí mismo como parte de un transgén estable separado, entonces el transgén nucleasa puede haberse integrado en un sitio diferente dentro del genoma del organismo hospedador. En tales casos, el gen de la nucleasa puede eliminarse de las plantas mediante segregación y selección genética. Como alternativa, el gen de la nucleasa se puede introducir como un sistema de expresión transitoria, por ejemplo, como parte del genoma de un virus no integrante según lo descrito por Vainstein et al. 2011. En cualquier caso, si las alteraciones (eliminaciones) en el gen diana son portadas por células en la línea germinal, la progenie de las plantas modificadas portará los genes diana alterados y no expresará la enzima completamente funcional de ese gen diana.

En una realización, las dianas pueden suprimirse utilizando la supresión del ARNi de la expresión génica. Se proporcionan construcciones de ARNi para suprimir la expresión génica de proteínas diana. Las proteínas diana pueden ser enzimas. La enzima diana puede seleccionarse de una enzima implicada en la movilización de Almidón Verde. Se proporcionan construcciones de ARNi que suprimen al menos una de GWD, PWD, DSP, BAM, isoamilasa, LDA, enzimas desproporcionadoras y otras enzimas de desramificación.

Se han desarrollado varias estrategias para expresar ARNi en plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, Horiguchi G., RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis (2004) *Differentiation* 72(2-3): 65-73. Véase también Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM, Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs (2000) *Nature* 407:319-20; Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA, Green AG hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing (2002) *Plant Physiol.* 129 (4): 1723-31. Con referencia a las FIG. 1A - G, se ilustran estrategias ejemplares para ARNi. Las realizaciones en la presente memoria incluyen construcciones de ARNi, métodos y plantas transgénicas que implementan una estrategia de ARNi. Los promotores 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108 pueden permitir la transcripción de ácido nucleico en las construcciones. La estrategia mostrada en la FIG. 1E incluye un promotor 109 sensible a XVE y la estrategia en la FIG. 1D incluye fragmentos promotores 110 y 111. También se ilustran los terminadores 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 y 130, como son las secuencias terminadoras transcritas 122a y 123. Los espaciadores 132, 133 y 134 se ilustran para estrategias en las FIG. 1A, 1C e ID y las FIG. 1A y 1C ilustran los separadores transcritos 132a y 133b. Los intrones 140, 141 y 142 y el intrón transcrito 140a se ilustran en las FIG. 1B, 1E y 1F. Se muestran los fragmentos de ADNc 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160 y 161, así como el ADNc transcrito 150a, 151a, 152a, 153a, 154a y la cadena de ARNbc 154a'. En las FIG. 1E y 1F, se ilustran los sitios loxP 170, 171 y 172. Las realizaciones incluyen métodos que utilizan ARN iniciadores separados por un separador de intrones como se ilustra en la FIG. 1B y construcciones de ARNi, vectores, vectores intermedios, vectores de transformación, cebadores y plantas transgénicas para implementar la estrategia de la FIG. 1B. Pero las realizaciones en la presente memoria no están limitadas a la estrategia ilustrada en la FIG. 1B.

En una realización, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia como se establece en uno cualquiera de los ácidos nucleicos enumerados en la presente memoria o el complemento de los mismos. En una realización, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia que hibrida con un ácido nucleico que tiene la secuencia de cualquier ácido nucleico enumerado en la presente memoria o el complemento del mismo.

5 En una realización, las condiciones de hibridación son condiciones de baja rigurosidad. En una realización, las condiciones de hibridación son condiciones de rigurosidad moderada. En una realización, las condiciones de hibridación son condiciones de alta rigurosidad. En los siguientes libros se describen ejemplos de protocolos de hibridación y métodos para la optimización de los protocolos de hibridación: Molecular Cloning, T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; y, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, Volumen 1, John Wiley & Sons, 2000. Las condiciones moderadas pueden ser las siguientes: los filtros cargados con muestras de ADN se tratan previamente durante 2 - 4 horas a 68 °C en una solución que contiene 6 x solución salina tamponada con citrato (SSC; Amresco, Inc., Solon, OH), dodecilsulfato de sodio al 0,5 % (SDS; Amresco, Inc., Solon, OH), 5X solución de Denhardt (Amresco, Inc., Solon, OH) y esperma de salmón desnaturalizado (Invitrogen Life Technologies, Inc. Carlsbad, CA). La hibridación se realiza en la misma solución con las siguientes modificaciones: EDTA 0,01 M (Amresco, Inc., Solon, OH), 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón y 5 - 20 x 10<sup>6</sup> cpm de sondas marcadas con <sup>32</sup>P o marcadas de forma fluorescente. Los filtros se incuban en una mezcla de hibridación durante 16-20 horas y después se lavan durante 15 minutos en una solución que contiene 2xSSC y SDS al 0,1 %. La solución de lavado se reemplaza por un segundo lavado con una solución que contiene 0,1xSSC y SDS al 0,5 % y se incuba durante 2 horas adicionales a 20 °C a 29 °C por debajo de la T<sub>f</sub> (temperatura de fusión en °C).  $T_f = 81,5 + 16,61 \log_{10}([Na^+]/(1,0+0,7[Na^+])) + 0,41(\%[G+C]) - (500/n) - P - F$ . [Na<sup>+</sup>] = Concentración Molar de iones de sodio. % [G + C] = porcentaje de bases G + C en la secuencia de ADN. N = longitud de la secuencia de ADN en bases. P = una corrección de temperatura para % de pares de bases no coincidentes (~1 °C por 1% de falta de coincidencia). F = corrección para la concentración de formamida (= 0,63 °C por 1 % de formamida). Los filtros se exponen para el desarrollo en un generador de imágenes o por autorradiografía. Las condiciones de baja rigurosidad se refieren a las condiciones de hibridación a bajas temperaturas, por ejemplo, entre 37 °C y 60 °C y el segundo lavado con mayor [Na<sup>+</sup>] (hasta 0,825 M) y a una temperatura de 40 °C a 48 °C por debajo de la T<sub>f</sub>. Alta rigurosidad se refiere a condiciones de hibridación a altas temperaturas, por ejemplo, por encima de 68 °C y el segundo lavado con [Na<sup>+</sup>] = 0,0165 a 0,0330 M a una temperatura de 5 °C a 10 °C por debajo de la T<sub>f</sub>.

En una realización, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia que tiene al menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad a lo largo de su longitud con una porción contigua de un ácido nucleico que tienen cualquiera de las secuencias establecidas en la presente memoria o los complementos de las mismas. La porción contigua puede ser la longitud completa de una secuencia establecida en la presente memoria o el complemento de la misma.

La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de los ácidos nucleicos puede incluir alinear y comparar los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes en las dos secuencias. Si todas las posiciones en dos secuencias están ocupadas por restos de aminoácidos o nucleótidos idénticos, entonces se dice que las secuencias son 100 % idénticas. El porcentaje de identidad puede medirse mediante el algoritmo Smith Waterman (Smith TF, Waterman MS 1981 "Identification of Common Molecular Subsequences", J Mol Biol 147: 195-197).

En una realización, se proporcionan ácidos nucleicos, polinucleótidos u oligonucleótidos aislados que tienen una porción de la secuencia como se establece en cualquiera de los ácidos nucleicos enumerados en la presente memoria o el complemento de la misma. Estos ácidos nucleicos, los polinucleótidos u oligonucleótidos aislados no se limitan a, sino que pueden tener una longitud en el intervalo de 10 a longitud completa, 10 a 3000, 10 a 2900, 10 a 2800, 10 a 2700, 10 a 2600, 10 a 2500, 10 a 2400, 10 a 2300, 10 a 2200, 10 a 2100, 10 a 2000, 10 a 1900, 10 a 1800, 10 a 1700, 10 a 1600, 10 a 1500, 10 a 1400, 10 a 1300, 10 a 1200, 10 a 1100, 10 a 1000, 10 a 900, 10 a 800, 10 a 700, 10 a 600, 10 a 500, 10 a 400, 10 a 300, 10 a 200, 10 a 100, 10 a 90, 10 a 80, 10 a 70, 10 a 60, 10 a 50, 10 a 40, 10 a 35, 10 a 30, 10 a 25, 10 a 20, 10 a 15, o 20 a 30 nucleótidos o 10, 15, 20 o 25 nucleótidos. Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido aislado que tiene una longitud dentro de uno de los intervalos anteriores puede tener cualquier longitud específica dentro del intervalo mencionado, extremos inclusive. La longitud recitada de los nucleótidos puede comenzar en cualquier posición única dentro de una secuencia de referencia (es decir, cualquiera de los ácidos nucleicos en la presente memoria) donde suficientes nucleótidos siguen la posición única para acomodar la longitud recitada. En una realización, una sonda o cebador de hibridación es del 85 al 100 %, 90 al 100 %, 91 al 100 %, 92 al 100 %, 93 al 100 %, 94 al 100 %, 95 al 100 %, 96 al 100 %, 97 al 100 %, 98 al 100 %, 99 al 100 %, o el 100 % complementario a un ácido nucleico con la misma longitud que la sonda o cebador y que tiene una secuencia elegida de una longitud de nucleótidos correspondiente a la longitud de la sonda o cebador dentro de una porción de una secuencia como se establece en cualquier uno de los ácidos nucleicos enumerados en la presente memoria. En una realización, una sonda o cebador de hibridación hibrida a lo largo de su longitud a una longitud correspondiente de un ácido nucleico que tiene la secuencia como se establece en cualquiera de los ácidos nucleicos enumerados en la presente memoria. En una realización, las condiciones de hibridación son de baja rigurosidad. En una realización, las condiciones de hibridación son rigurosidad moderada. En una realización, las condiciones de hibridación son de alta rigurosidad.

Cualquiera de los ácidos nucleicos aislados en la presente memoria puede proporcionarse en un kit. El kit puede usarse para hacer una construcción de ARNi, producir plantas transgénicas, probar una planta para determinar la

presencia de un gen de interés, probar una planta para determinar la presencia de una construcción de ARNi como se describe en la presente memoria, o cualquier otro método o propósito descrito en la presente memoria. Un kit puede incluir uno o más vectores en la presente memoria o una o más sondas o cebadores en la presente memoria.

5 En una realización, se proporciona una planta genéticamente modificada. La planta genéticamente modificada puede derivar de cualquier planta. La planta genéticamente modificada puede derivar de una planta de cultivo energético, una planta de cultivo de forraje o una planta de cultivo de alimentos. La planta de cultivo de energía puede ser, pero sin limitación, una planta de maíz, una planta de mijo, una planta de álamo o una planta de miscanto. La planta de cultivo de forraje puede ser, pero sin limitación, una planta de sorgo. La planta de cultivo de alimentos puede ser, pero sin limitación, una planta de maíz o una planta de tomate. La planta genéticamente modificada puede ser una planta transgénica. La planta transgénica puede incluir una construcción de ARNi. La planta transgénica puede incluir una construcción genética que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La planta transgénica también puede incluir un ácido nucleico que codifica una enzima que degrada polisacáridos. La planta puede ser una planta de arroz, una planta de mijo, una planta de sorgo, una planta de maíz o una planta de tomate.

15 Una planta genéticamente modificada se refiere a una planta transgénica o una planta mutante, progenie de una planta transgénica o una planta genéticamente modificada, un descendiente de una planta transgénica o una planta genéticamente modificada, o una parte de cualquiera de las anteriores. Una planta transgénica puede incluir una construcción genética. La construcción genética puede incluir un primer ácido nucleico que codifica un producto que puede inactivar o inhibir la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La construcción genética también puede incluir un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos, que no se produce naturalmente en la planta. Tras la expresión del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico, la planta genéticamente modificada puede tener un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón vegetativo en una planta no modificada genéticamente del mismo fondo genético que la planta genéticamente modificada pero que carece de la construcción genética. La planta genéticamente modificada puede expresar al menos una enzima que degrada polisacáridos. La planta genéticamente modificada puede incluir más de una construcción genética. La planta genéticamente modificada puede incluir una primera construcción que comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que puede inactivar o inhibir la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La planta genéticamente modificada también puede incluir una segunda construcción genética que comprende un segundo ácido nucleico que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos. Las construcciones genéticas pueden integrarse en un genoma de la planta. Las construcciones genéticas pueden expresarse transitoriamente en la planta. Como se emplea en esta memoria, el fondo genético se define como una pluralidad de todos los genes en una planta. Por lo tanto, las plantas de la misma especie o variedad pueden denominarse plantas que tienen los mismos genes o el mismo fondo genético. Una planta genéticamente modificada puede incluir la construcción o las construcciones genéticas descritas en la presente memoria y, de otro modo, puede tener los mismos genes que una planta no modificada genéticamente del mismo fondo genético.

Una realización incluye una planta genéticamente modificada. La planta genéticamente modificada puede ser cualquiera de las descritas en la presente memoria. La planta genéticamente modificada puede ser una planta transgénica que tiene un nivel alterado de almidón vegetativo, o cualquier parte de la planta transgénica. La planta genéticamente modificada puede ser una planta transgénica que expresa una enzima que degrada polisacáridos, o cualquier parte de la planta transgénica. La planta genéticamente modificada puede ser cualquier planta transgénica que tenga un nivel alterado de almidón vegetativo y/o que exprese una enzima que degrada polisacáridos, o cualquier parte de la planta transgénica. La planta genéticamente modificada puede incluir un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos. El primer ácido nucleico aislado puede ser como se describe a continuación. El segundo ácido nucleico aislado puede ser como se describe a continuación. Tras la expresión del primer ácido nucleico, la planta genéticamente modificada puede tener un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón vegetativo en una planta no modificada genéticamente que tiene el mismo fondo genético que la planta genéticamente modificada pero que carece del primer ácido nucleico aislado. El nivel alterado puede ser un nivel aumentado.

Una planta genéticamente modificada puede ser un mutante convencional que tiene una o más mutaciones en una secuencia del ácido nucleico de un gen que da como resultado la inhibición de la expresión del gen que codifica una enzima implicada en la movilización de almidón en una planta. Las mutaciones pueden ser eliminaciones, inserciones o sustituciones de ácidos nucleicos en una secuencia de genes diana. El mutante convencional puede tener un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con una planta no mutante del mismo fondo genético. El mutante convencional puede adicionalmente modificarse genéticamente para incluir un ácido nucleico que codifica una enzima que degrada polisacáridos. El mutante convencional que tiene un nivel alterado de almidón vegetativo puede ser también una planta transgénica que expresa una enzima que degrada polisacáridos.

La planta genéticamente modificada puede ser de cualquier tipo de planta. La planta genéticamente modificada puede ser, pero sin limitación, maíz, soja, arroz, caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, mijo, miscanto, eucalipto, sauce o álamo. Una planta genéticamente modificada puede ser una planta transgénica o una planta mutante completa o partes de la planta. Las partes pueden ser, pero sin limitación, hojas, tallos, flores, brotes, pétalos, ovarios, frutas o

- semillas. Una planta genéticamente modificada puede ser callo de una planta transgénica o una planta mutante. Una planta genéticamente modificada puede regenerarse a partir de partes de una planta transgénica o una planta o plantas mutantes. Una planta genéticamente modificada puede ser un producto del cruce sexual de una primera planta transgénica y una segunda planta transgénica o una planta no transgénica donde la planta producto conserva una secuencia de polinucleótidos introducida en la primera planta transgénica. Una planta genéticamente modificada puede ser un producto del cruce sexual de una primera planta mutante y una segunda planta no mutante donde la planta producto conserva una mutación introducida en la primera planta mutante. La planta transgénica o la planta mutante pueden ser cualquiera de las plantas transgénicas o plantas mutantes proporcionadas en la presente memoria.
- 5
- 10 Una realización proporciona una construcción genética diseñada para implementar una estrategia para modificar los niveles de almidón vegetativo en plantas. La construcción genética puede incluir un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. El producto puede ser, pero sin limitación, una construcción de ARNi, un ARNh, un miARN, una enzima de restricción o una meganucleasa. La proteína puede ser, pero sin limitación, Glucano Agua Dicinasa (GWD), Fosfoglucono Agua Dicinasa (PWD), Proteína Fosfatasa de Especificidad Dual (DSP), dextrinasa límite (LDA), enzima desproporcionadora, una enzima de desramificación,  $\beta$ -amilasa (BAM) e isoamilasa. La construcción genética puede incluir un segundo ácido nucleico aislado que codifica una o más enzimas que degradan polisacáridos.
- 15
- 20 La construcción genética puede incluir además un complemento invertido del primer ácido nucleico aislado y un espaciador contiguo con y entre el primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido. La expresión "complemento invertido" se refiere a una secuencia complementaria a otra secuencia en la misma cadena de un ácido nucleico. Por ejemplo, un complemento invertido del primer ácido nucleico aislado está en la misma cadena que el primer ácido nucleico aislado. A modo de ejemplo adicional, un complemento invertido de una secuencia de ácido nucleico de OsDSP1:

TATGGTTGACAAGCTTGTGCAGTTTGTCTAATCACAGCAGGAAGCCTCAATCGC  
 AAATCAAAAGCATCAAAATCCCTAATTTTCGGCACGACAGTGCTCTATATCTTT  
 ACATTGTAGACAATATTCTTGAATGGCACAGATGTCAACTCCAAAATATTCAA  
 GGTCTGGATCTTGCTGCAGGCAGAATACTGTTTTTACACCAATGTCCCTAAGTT  
 TATCAACATCAAGTGGGCTCTGTAAGCAGGAGCCCACGATCAAGTCTGGGCGT  
 ATGAAATTGTAGTTCATTCCAAGCTCATGTCTATACGTCAAACTGCTCCCATA  
 GCTTGCGTCATGTTGGTGCTGTACGTATCGGATTTCTCCGTGCCCGCCTCCACT  
 GCGCCACTCTGGGCGCTAGAAGTAGACGCCCCGGATGCGGTTTTGACAGTGTT  
 TGATCGGCGACTCCCGCCACGAACCATCGTCAGATTGAGCGGCGAGGGCCGC  
 CTCATGGACCTGGATCCCACGATTGGAGGCTCCTTGAGCAGGTTCTGGAGGCA

25

**GTTCAT** (SEQ ID NO: 40) es la siguiente secuencia:

ATGAACTGCCTCCAGAACCTGCTCAAGGAGCCTCCAATCGTGGGATCCAGGTC  
 CATGAGGCGGCCCTCGCCGCTCAATCTGACGATGGTTCGTGGCGGGAGTCCGC  
 GATCAAACACTGTCAAACCCGCATCCGGGGCGTCTACTTCTAGCGCCCAGAGT  
 GGCGCAGTGGAGGCGGGCACGGAGAAATCCGATACGTACAGCACCAACATGA  
 CGCAAGCTATGGGAGCAGTGTTGACGTATAGACATGAGCTTGAATGAACTA  
 CAATTCATACGCCCAGACTTGATCGTGGGCTCCTGCTTACAGAGCCCCTTG  
 ATGTTGATAAACTTAGGGACATTGGTGTAACAGTATTCTGCCTGCAGCAA  
 GATCCAGACCTTGAATATTTGGAGTTGACATCTGTGCCATTCAAGAATATTGT  
 CTACAATGTAAAGATATAGAGCACTGTCGTGCCGAAATTAGGGATTTTGATGC  
 TTTTGATTTGCGATTGAGGCTTCCTGCTGTGATTAGCAAACCTGCACAAGCTTGT  
 CAACCATA (SEQ ID NO: 172).

Una secuencia del complemento invertido puede ser capaz de hibridar con una secuencia del primer ácido nucleico aislado. La secuencia del complemento invertido puede ser capaz de hibridar con la secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones *in situ* en una planta genéticamente modificada. La secuencia del complemento invertido puede ser capaz de hibridar con la secuencia de la primera secuencia de ácido nucleico en condiciones de  
5 baja, moderada o alta rigurosidad.

La construcción genética también puede incluir un espaciador contiguo con y entre el primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido. El espaciador puede estar operativamente unido al primer ácido nucleico aislado y al complemento invertido y puede proporcionar una conexión entre el primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido de manera que las secuencias de ARN transcritas desde el primer ácido nucleico aislado y el complemento  
10 invertido pueden hibridar entre sí. El primer ácido nucleico aislado puede estar cadena arriba y contiguo al espaciador y el espaciador puede estar cadena arriba y contiguo al complemento invertido. El complemento invertido puede estar cadena arriba y contiguo al espaciador y el espaciador puede estar cadena arriba y contiguo al primer ácido nucleico. Un espaciador operativamente unido puede ser un intrón. El intrón puede empalmar las secuencias del primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido.

La construcción genética puede incluir un promotor operativamente unido al primer ácido nucleico aislado, al complemento invertido y al espaciador. El promotor operativamente unido puede permitir la transcripción del primer ácido nucleico aislado, del complemento invertido y del espaciador. La transcripción del primer ácido nucleico aislado, del complemento invertido y del espaciador pueden denominarse expresión del primer ácido nucleico aislado, del  
15 complemento invertido y del espaciador. Tras la expresión del primer ácido nucleico aislado, del complemento invertido y del espaciador, la secuencia de ARN transcrita del primer ácido nucleico aislado y la secuencia de ARN transcrita del complemento invertido pueden ser capaces de hibridar entre sí. Las transcripciones de ARN hibridadas del primer ácido nucleico aislado y del complemento invertido pueden ser capaces de inhibir la expresión del gen. Una planta transgénica puede incluir más de un tipo de construcción de ARNi. Cada tipo diferente de construcción de ARNi puede dirigirse a inhibir un gen diferente que expresa una proteína diana diferente. El gen diana puede seleccionarse de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La proteína puede ser,  
20 pero sin limitación, Glucano Agua Dicinasa (GWD), Fosfoglucono Agua Dicinasa (PWD), Proteína Fosfatasa de Especificidad Dual (DSP), dextrinasa límite (LDA), enzima desproporcionadora, una enzima de desramificación,  $\beta$ -amilasa (BAM) o isoamilasa.

En una realización, un primer ácido nucleico aislado y una repetición invertida pueden codificar un producto que puede ser un ARNh. El ARNh puede ser homólogo a una porción de un ARN mensajero que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. El ARNh puede ser homólogo a una porción de un ARN mensajero que  
30 codifica las secuencias 5' UTR o 3' UTR para una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. Las secuencias que son complementarias de un ARN mensajero se denominan "secuencias iniciadoras".

En una realización, un primer ácido nucleico aislado puede codificar un producto que puede ser una construcción de ARNi. La construcción de ARNi puede diseñarse para implementar cualquier estrategia con ARNi, incluyendo, pero sin limitación, los ilustrados en la FIG. 1A - G. Una construcción de ARNi puede incluir un primer ácido nucleico aislado que tiene una secuencia complementaria a una porción de un gen en la planta genéticamente modificada que codifica una proteína diana implicada en la movilización del almidón vegetativo. El primer ácido nucleico aislado puede ser una  
35 primera secuencia iniciadora. El primer ácido nucleico aislado puede tener al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad a lo largo de la longitud del ácido nucleico aislado con una porción de un gen en la planta genéticamente modificada que codifica una proteína diana implicada en la movilización del almidón vegetativo. La longitud del primer ácido nucleico puede ser cualquier longitud adecuada para proporcionar un efecto de ARNi. La construcción de ARNi puede incluir un complemento invertido del primer ácido nucleico aislado. El complemento invertido puede ser una segunda secuencia iniciadora.

El primer ácido nucleico aislado puede incluir una porción que tiene al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia del gen diana. La identidad se puede medir a lo largo de toda la secuencia del gen diana. El gen diana puede seleccionarse del uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón vegetativo en una planta. El gen diana puede ser cualquier gen implicado en la movilización de almidón vegetativo en una planta. Puede haber más de un gen diana. La longitud de la porción del  
45 primer ácido nucleico aislado puede ser igual a la longitud del gen diana. La longitud de la porción puede tener, pero sin limitación, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695 o 700 nucleótidos de longitud, o cualquier longitud dentro de un intervalo entre dos cualquiera de las longitudes anteriores.

En una realización, un primer ácido nucleico aislado puede codificar el producto que puede ser un miARN capaz de dirigirse a un ARN mensajero transcrito a partir del gen diana. El primer ácido nucleico aislado puede tener de 18 a 25  
60 nucleótidos de longitud. El primer ácido nucleico aislado puede tener 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195,

200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295 o 300 nucleótidos de longitud, o cualquier longitud dentro de un intervalo entre dos de las longitudes anteriores.

5 En una realización, un primer ácido nucleico aislado puede codificar un producto que puede ser una enzima de restricción capaz de cortar una secuencia del gen diana. La enzima de restricción puede ser, pero sin limitación, una meganucleasa, una nucleasa con dedos de zinc, o una nucleasa efectora TAL. La meganucleasa puede ser I-Crel, I-Dmol, I-Scel, E-Dmel o DmoCre. Se pueden usar otras meganucleasas conocidas.

10 La construcción genética puede incluir un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que tiene cualquier secuencia adecuada para afectar la expresión de un gen que codifica una proteína diana. La secuencia puede ser adecuada para afectar el ARNi de un gen que codifica una proteína diana. El primer ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia con al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 38 [amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 39 [micro ARN de OsGWD osa-MR809aM1], SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44[OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a]. La identidad se puede medir a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. La longitud del primer ácido nucleico aislado puede ser igual a la longitud de la secuencia de referencia.

20 La construcción de ARNi puede incluir un primer ácido nucleico aislado capaz de hibridar con un ácido nucleico que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 38 [amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 39 [micro ARN de OsGWD osa-MR809aM1], SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44[OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a], o el complemento de las mismas en condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad.

25 La construcción de ARNi puede incluir la secuencia de un complemento invertido capaz de hibridar con la secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones *in situ* en la planta genéticamente modificada. La construcción de ARNi puede incluir la secuencia del complemento invertido capaz de hibridar con la secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones de una de baja, moderada o alta rigurosidad.

30 La construcción de ARNi puede incluir un complemento invertido que tiene al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con el complemento invertido de una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44[OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a]. La identidad puede medirse a lo largo de la longitud del complemento invertido de la secuencia de referencia. La longitud del complemento invertido puede ser igual a la longitud del complemento invertido de la secuencia de referencia.

35 El espaciador puede ser cualquier secuencia. El espaciador puede ser un intrón. El intrón puede ser cualquier intrón. El intrón puede ser el intrón OsUbi. La secuencia del intrón OsUbi se puede encontrar en la secuencia de pAL409 que tiene la SEQ ID NO: 185 con referencia a la FIG. 2 que ilustra pAL409 con el intrón OsUbi entre las posiciones 4519 - 566. La numeración de nucleótidos en la SEQ ID NO: 185 puede variar de la etiquetada en la FIG. 2, pero la comparación de secuencias históricas (p. ej., sitios de restricción) entre la FIG. 2 y SEQ ID NO: 185 permite la identificación de cualquier secuencia específica de un pAL409 característico. La secuencia del intrón OsUbi dentro de la secuencia de la SEQ ID NO: 185 puede identificarse basándose en los sitios de restricción para las enzimas de restricción *BspE1* y *Agel*. La secuencia del intrón OsUbi puede ubicarse dentro de la secuencia de la SEQ ID NO: 185 entre las secuencias CCTAGG, el sitio de restricción para *BspE1* y ACCGGT, el sitio de restricción para *Agel*. El intrón puede tener una secuencia que tenga al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con el intrón OsUbi. El intrón puede tener una secuencia que tenga al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51 [ZmAdhli6], SEQ ID NO; 52 [OsAdhli], SEQ ID NO: 53 [SbAdh1-2i] y SEQ ID NO: 54 [SbGWDi]. El intrón puede tener una secuencia que hibrida con el intrón OsUbi, o un complemento del mismo en condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad. El intrón puede tener una secuencia que hibrida con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 51 [ZmAdhli6], SEQ ID NO; 52 [OsAdhli], SEQ ID NO: 53 [SbAdh1-2i] y SEQ ID NO: 54 [SbGWDi], o el complemento de las mismas en condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad.

60 Una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta puede ser una proteína diana. La proteína diana puede ser cualquier proteína implicada en la regulación del Almidón Verde. Por ejemplo, la proteína diana puede ser una Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual,  $\beta$ -amilasa,

isoamilasa, dextrinasa límite, enzima desproporcionadora o una enzima de desramificación. El gen diana puede codificar la proteína diana. El gen diana puede seleccionarse del uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. El gen diana que codifica la proteína diana puede tener una secuencia con al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5 [sec. codificante de SbGWD], SEQ ID NO: 6 [sec. codificante de ZmGWD], SEQ ID NO: 7 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 8 [gen SbGWD], SEQ ID NO: 9 [gen ZMGWD], SEQ ID NO: 10 [5'UTR y promotor del gen SbGWD], SEQ ID NO: 11 NO: [5'UTR y promotor del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 12 [3'UTR del gen SbGWD], SEQ ID NO: 13 [3'UTR del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 17 [sec. codificante de SbPWD], SEQ ID NO: 18 [sec. codificante de ZmPWD], SEQ ID NO: 19 [sec. codificante de OsPWD], SEQ ID NO: 20 [gen SbPWD], SEQ ID NO: 21 [gen ZmPWD]. SEQ ID NO: 22 [5'UTR y promotor del gen SbPWD], SEQ ID NO: 23 [3'UTR del gen SbPWD], SEQ ID NO: 24 [3'UTR del gen ZmPWD], SEQ ID NO: 29 [secuencia codificante de ZmDSP], SEQ ID NO: 30 [secuencia codificante de SbDSP], SEQ ID NO: 31 [secuencia codificante de OsDSP], SEQ ID NO: 32 [gen ZmDSP], SEQ ID NO: 33 [gen SbDSP], SEQ ID NO: 34 [5'UTR y promotor del gen ZmDSP], SEQ ID NO: 35 [5'UTR y promotor del gen SbDSP], SEQ ID NO: 36 [3'UTR de ZmDSP], SEQ ID NO: 37 [3'UTR del gen SbDSP], SEQ ID NO: 173 [gen OsGWD], SEQ ID NO: 174 [gen DSP], SEQ ID NO: 175 [gen ISA3], SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 177 [secuencia codificante de DSP], SEQ ID NO: 178 [secuencia codificante de ISA3], SEQ ID NO: 182 [porción del gen S1GWD], SEQ ID NO: 191 [gen SbGWD-1], SEQ ID NO: 192 [gen SbGDW-2], SEQ ID NO: 206 [PvGWD-2], SEQ ID NO: 207 [PvGWD-5], SEQ ID NO: 208 [PvGWD-1] y SEQ ID NO: 215 [secuencia fusionada de mijo]. La identidad se puede medir a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. La longitud de la secuencia del gen diana puede ser igual a la longitud de la secuencia de referencia.

El gen diana que codifica la proteína diana puede tener una secuencia que hibrida con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5 [sec. codificante de SbGWD], SEQ ID NO: 6 [sec. codificante de ZmGWD], SEQ ID NO: 7 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 8 [gen SbGWD], SEQ ID NO: 9 [gen ZMGWD], SEQ ID NO: 10 [5'UTR y promotor del gen SbGWD], SEQ ID NO: 11 NO: [5'UTR y promotor del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 12 [3'UTR del gen SbGWD], SEQ ID NO: 13 [3'UTR del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 17 [sec. codificante de SbPWD], SEQ ID NO: 18 [sec. codificante de ZmPWD], SEQ ID NO: 19 [sec. codificante de OsPWD], SEQ ID NO: 20 [gen SbPWD], SEQ ID NO: 21 [gen ZmPWD]. SEQ ID NO: 22 [5'UTR y promotor del gen SbPWD], SEQ ID NO: 23 [3'UTR del gen SbPWD], SEQ ID NO: 24 [3'UTR del gen ZmPWD], SEQ ID NO: 29 [secuencia codificante de ZmDSP], SEQ ID NO: 30 [secuencia codificante de SbDSP], SEQ ID NO: 31 [secuencia codificante de OsDSP], SEQ ID NO: 32 [gen ZmDSP], SEQ ID NO: 33 [gen SbDSP], SEQ ID NO: 34 [5'UTR y promotor del gen ZmDSP], SEQ ID NO: 35 [5'UTR y promotor del gen SbDSP], SEQ ID NO: 36 [3'UTR de ZmDSP], SEQ ID NO: 37 [3'UTR del gen SbDSP], SEQ ID NO: 173 [gen OsGWD], SEQ ID NO: 174 [gen DSP], SEQ ID NO: 175 [gen ISA3], SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 177 [secuencia codificante de DSP], SEQ ID NO: 178 [secuencia codificante de ISA3], SEQ ID NO: 182 [porción del gen SIGWD], SEQ ID NO: 191 [gen SbGWD-1], SEQ ID NO: 192 [gen SbGDW-2], SEQ ID NO: 206 [PvGWD-2], SEQ ID NO: 207 [PvGWD-5], SEQ ID NO: 208 [PvGWD-1] y SEQ ID NO: 215 [secuencia fusionada de mijo], o el complemento de las mismas en condiciones de baja, moderada o alta rigurosidad.

En una realización, la construcción genética puede incluir el primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y el segundo ácido nucleico aislado que codifica una o más enzimas que degradan polisacáridos. Una planta transgénica puede incluir más de un tipo de construcción genética. Cada tipo diferente de construcción genética puede dirigirse a inhibir un gen diferente que expresa una proteína diana diferente y que expresa una enzima que degrada polisacáridos diferente. Una construcción genética puede incluir el primer ácido nucleico aislado. Otra construcción genética puede incluir el segundo ácido nucleico aislado. El gen diana puede seleccionarse de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta. La al menos una enzima que degrada polisacáridos puede ser, pero sin limitación, una xilanasa, una endoglucanasa, una exoglucanasa, una amilasa, una xilanasa modificada con inteína, una endoglucanasa modificada con inteína, una exoglucanasa modificada con inteína y una amilasa modificada con inteína.

En una realización, el segundo ácido nucleico puede tener al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 86 [O43097], SEQ ID NO: 87 [BD22308], SEQ ID NO: 88 [BD25243], SEQ ID NO: 89 [EU591743], SEQ ID NO: 90 [NtEGm], SEQ ID NO: 91 [P0C2S1], SEQ ID NO: 92 [P77853], SEQ ID NO: 93 [O68438], SEQ ID NO: 94 [O33897], SEQ ID NO: 164 [amilasa 19862], SEQ ID NO: 165 [glucoamilasa 20082], SEQ ID NO: 166 [glucoamilasa 20707], SEQ ID NO: 167 [amilasa 21853], SEQ ID NO: 168 [AmyS], SEQ ID NO: 170 [GlaA], SEQ ID NO: 104 [EU591743:AS146-7], SEQ ID NO: 105 [P77853: S158-30-108-35] y SEQ ID NO: 106 [P77853:T134-101-100]. La identidad se puede medir a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. La longitud de la secuencia del segundo ácido nucleico puede ser igual a la longitud de la secuencia de referencia.

En una realización, el segundo ácido nucleico aislado puede codificar una "variante" de una enzima que degrada polisacáridos. La secuencia de aminoácidos de una variante de una enzima que degrada polisacáridos puede diferir por eliminaciones, adiciones, sustituciones de secuencias de aminoácidos u otras modificaciones de la enzima que degrada polisacáridos. Una variante de una enzima que degrada polisacáridos puede mantener la actividad biológica de la enzima que degrada polisacáridos. Mantener la actividad biológica como se emplea en esta memoria significa que la variante tiene al menos el 60 % de la actividad de la enzima que degrada polisacáridos de la que deriva. La

actividad de una xilanasas y una endoglucanasa puede evaluarse en un ensayo usando sustrato Xylazyme AX y sustrato Cellazyme, respectivamente, como se describe en la Solicitud de EE.UU. 10/886.393 presentada el 7 de julio de 2004 y PCT/US10/55746 presentada el 5 de noviembre de 2010 y PCT/US10/55669 presentada el 5 de noviembre de 2010 y PCT/US10/55751 presentada el 5 de noviembre de 2010. La actividad de una exoglucanasa puede evaluarse usando 4-metilumbeliferil-b-D-lactopiranosido fluorescente (4-MU) como se describe en Harrison MD et al. 2011 "Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane", Plant Biotechnology Journal 9: 884-896. La actividad de una feruloil esterasa puede evaluarse usando un ensayo que usa ferulado marcado con pNP como sustrato (como se describe en Hegde S. et al. 2009 "Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases", Analytical Biochemistry 387(1): 128-129). Las pruebas anteriores para determinar la actividad de una xilanasas, endoglucanasa, exoglucanasa o feruloil esterasa se pueden utilizar para determinar si una secuencia con menos del 100 % de identidad con una secuencia de enzima que degrada polisacáridos en la presente memoria es una variante de la enzima que degrada polisacáridos. Las variantes de una enzima que degrada polisacáridos en la presente memoria pueden modificarse en la secuencia de aminoácidos frente a la enzima que degrada polisacáridos basándose en la similitud en la hidrofobicidad, hidrofiliidad, solubilidad, polaridad de restos de aminoácidos. Las variantes de una enzima que degrada polisacáridos en la presente memoria pueden diferir después de modificaciones postraduccionales. Las diferentes modificaciones postraduccionales pueden ser, sin limitación, glicosilaciones, acetilaciones o fosforilaciones. Una variante puede desarrollarse por cualquier medio. Se puede desarrollar una variante mediante mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis no dirigida. Se puede usar PCR propensa a error para crear mutantes de una enzima que degrada polisacáridos en la presente memoria y se puede usar cualquiera de los ensayos anteriores para evaluar si el mutante es una variante.

Las realizaciones incluyen al menos una de las enzimas que degradan polisacáridos, o variantes de las mismas, unida con variantes de al menos uno de un péptido de direccionamiento, o un péptido de direccionamiento carboxi. Las variantes de un péptido de direccionamiento o un péptido de direccionamiento carboxi dirigirán la proteína con la que se une a la misma ubicación que la secuencia de referencia para el péptido de direccionamiento o el péptido de direccionamiento carboxi.

Se pueden proporcionar variantes de una inteína en una secuencia de la enzima que degrada polisacáridos. Una variante de inteína puede empalmarse con la proteína a la que está unida.

En una realización, una construcción genética puede incluir una secuencia con al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 59 [OsUbi3P: amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 60 [Os Ubi3P: osa-MIR809aM1 de OsGWD], SEQ ID NO: 61 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP1], SEQ ID NO: 62 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP2], SEQ ID NO: 63 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD1], SEQ ID NO: 64 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD2], SEQ ID NO: 65 [OsUbi3P: ARNh de OsPWD1], SEQ ID NO: 66 [OsUbi3P:ARNh de OsPWD2], SEQ ID NO: 67 [OsUbi3P:ARNi de SbGWD], SEQ ID NO: 68 [ZmPepCP: ARNi de SbGWD1], SEQ ID NO: 69 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD2], SEQ ID NO: 70 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1], SEQ ID NO: 71 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2], SEQ ID NO: 72 [OsDSP1 y OsGWD2], SEQ ID NO: 73 [OsPWD2 y OsGWD1], SEQ ID NO: 74 [OsDSP2 y OsPWD1], SEQ ID NO: 119 [ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD], SEQ ID NO: 120 [ZmPepCP: xGZein27ss:BD25243:SEKDEL], SEQ ID NO: 121 [OsUbi3P:EU591743], SEQ ID NO: 122 [ZmUbi1P:EU591743: AS146-7:SEKDEL], SEQ ID NO: 123 [ZmUbi1p: HvAle:NtEGm: SEKDEL], SEQ ID NO: 124 [ZmPepCP: HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 125 [OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 126 [OsUbi3P:BAASS: O33897], SEQ ID NO: 127 [ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL], SEQ ID NO: 128 [OsUbi3P:068438], SEQ ID NO: 129 [OsUbi3P:P0C2S1], SEQ ID NO: 130 [ZmUbi1P:ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35], SEQ ID NO: 131 [ZmUbi1:BAASS:P77853:T134-100-101:SEKDEL], SEQ ID NO: 132 [casete 2379 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 133 [casete 2380 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 134 [casete 4106 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 135 [casete 4107 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 136 [casete 4108 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 137 [casete 4109 - -3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 138 [casete 4110 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 139 [casete 4111 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 140 [casete 4112 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 141 [casete 4113 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 142 [casete 4114 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 143 [casete 4115 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 144 [casete 4116 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 145 [casete 4117 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 146 [casete 4120 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 147 [casete 4121 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 148 [casete 4124 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 149 [casete 4125 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 150 [casete 4514 - 3 CWDE y 1 ARNh] y SEQ ID NO: 151 [casete 4515 - 3 CWDE y 1 ARNh]. La identidad se puede medir a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. La longitud de la secuencia puede ser igual a la longitud de la secuencia de referencia.

La construcción genética puede incluir además una secuencia reguladora (también denominada elemento regulador) operativamente conectada a un primer ácido nucleico aislado o a un segundo ácido nucleico aislado. En este contexto, conectado operativamente significa que la secuencia reguladora imparte su función al ácido nucleico o la secuencia de polinucleótidos. En el caso de una secuencia reguladora que es un promotor, el promotor es capaz de controlar la expresión del ácido nucleico o de la secuencia de polinucleótidos cuando están conectados operativamente. El promotor puede estar operativamente unido al primer ácido nucleico aislado. El promotor puede estar operativamente unido al segundo ácido nucleico aislado. El promotor operativamente unido puede ser cualquier tipo de promotor. El promotor operativamente unido puede ser un promotor inducible. El promotor operativamente unido puede ser un promotor constitutivo. El promotor puede ser un promotor inducible, que inicia la transcripción de las secuencias de

polinucleótidos solo cuando se expone a un estímulo químico o ambiental particular. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, aquellos que son un promotor inducible por alcoholes, un promotor inducible por tetraciclina, un promotor inducible por esteroides, o un promotor inducible por hormonas. El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor puede ser un promotor constitutivo, que proporciona la transcripción de los ácidos nucleicos o secuencias de polinucleótidos en toda la planta en la mayoría de las células, tejidos y órganos y durante muchas pero no necesariamente todas las etapas de desarrollo. El promotor puede ser específico para una etapa de desarrollo, órgano o tejido particular. Un promotor específico de tejido puede ser capaz de iniciar la transcripción en un tejido vegetal particular. El tejido vegetal que puede diana de un promotor específico de tejido puede ser, pero sin limitación, hojas, tricomas, anteras o semillas. Un promotor constitutivo en la presente memoria puede ser el promotor de Ubiquitina 3 de arroz (OsUbi3P) o el promotor de fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz (ZmPepCP). Se pueden usar otros promotores constitutivos conocidos, e incluyen, pero sin limitación, el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CAMV), el promotor del Virus del Rizado de Hoja Amarilla del (CMP) o la versión corta de CMP (CMPS), el promotor de la subunidad pequeña de Rubisco, el promotor de acción del arroz (OsAct1P) y el promotor de ubiquitina de maíz (ZmUbi1P). El promotor específico de tejido puede incluir el promotor específico de semilla. El promotor específico de semilla puede ser, pero sin limitación, el promotor GluB4 del arroz o el promotor de zeína de maíz. El promotor puede ser el promotor P-OsUbi. La secuencia del promotor P-OsUbi se puede encontrar en la secuencia de pAL409 que tiene la SEQ ID NO: 185 con referencia a la FIG. 2, que ilustra pAL409 con el promotor P-OsUbi entre las posiciones 3574 - 4507. La numeración de nucleótidos en la SEQ ID NO: 185 puede variar de la etiquetada en la FIG. 2, pero la comparación de secuencias históricas (p. ej., sitios de restricción) entre la FIG. 2 y SEQ ID NO: 185 permite la identificación de cualquier secuencia específica de un pAL409 característico. La secuencia del promotor P-OsUbi puede identificarse basándose en los sitios de restricción para las enzimas de restricción Pacl y AvrII. La secuencia del promotor P-OsUbi puede ubicarse entre las secuencias TTAATTAA, el sitio de restricción para Pacl y CCTAGG, el sitio de restricción para AvrII. El promotor puede incluir una secuencia con al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con el promotor P-OsUbi. El promotor puede incluir una secuencia que hibrida con el promotor P-OsUbi o el complemento del mismo en condiciones de baja rigurosidad. El promotor puede incluir una secuencia que hibrida con el promotor P-OsUbi o el complemento del mismo en condiciones de moderada rigurosidad. El promotor puede incluir una secuencia que hibrida con el promotor P-OsUbi o el complemento del mismo en condiciones de alta rigurosidad.

En el caso de un elemento regulador que sea un terminador, el terminador es capaz de terminar la transcripción del ácido nucleico o de la secuencia de polinucleótidos. Se puede incluir una secuencia de terminación en el extremo 3' de una unidad transcripcional del casete de expresión. El terminador puede derivar de una variedad de genes vegetales. El terminador puede ser una secuencia de terminación de los genes de nopalina sintasa (NOS) u octopina sintasa (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia de terminación puede ser el terminador CaMV 35S de CaMV, o cualquiera de las secuencias 3'UTR que se muestra que terminan la transcripción transgénica en plantas. Por ejemplo, se puede utilizar el terminador PepC de maíz (3'UTR).

En una realización, un primer ácido nucleico aislado o el segundo ácido nucleico aislado pueden incluir además una secuencia de polinucleótidos de direccionamiento que codifica un péptido de direccionamiento. Un péptido de direccionamiento puede fusionarse con una o más enzimas que degradan polisacáridos. Cuando un segundo ácido nucleico aislado codifica más de una enzima que degrada polisacáridos, se puede seleccionar independientemente un péptido de direccionamiento para cada una de las enzimas que degradan polisacáridos. Se puede seleccionar un péptido de direccionamiento de, pero sin limitación, una señal de direccionamiento a amiloplastos, un péptido de direccionamiento a la pared celular, un péptido de direccionamiento a mitocondrias, una señal de localización en el citosol, una señal de direccionamiento a cloroplastos, un péptido de direccionamiento nuclear y un péptido de direccionamiento a vacuolas. Un polinucleótido de direccionamiento puede estar cadena arriba del primer ácido nucleico aislado o del segundo ácido nucleico aislado. Un péptido de direccionamiento puede tener al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con uno de BAASS (SEQ ID NO: 107), péptido señal SEKDEL (SEQ ID NO: 108), señal de direccionamiento xHvVSD (SEQ ID NO: 109), la fusión traduccional ZmUBQm (SEQ ID NO: 110), xGZein27ss (SEQ ID NO: 111) o la señal HvAle (SEQ ID NO: 112).

En una realización, se puede insertar una construcción genética en un vector apropiado para la modificación genética de una planta. Los vectores que incorporan una construcción genética en la presente memoria también pueden incluir elementos genéticos adicionales tales como múltiples sitios de clonación para facilitar la clonación molecular y marcadores de selección para facilitar la selección. Un marcador seleccionable que puede incluirse en un vector puede ser un gen de fosfomanosa isomerasa (PMI) de *Escherichia coli*, lo que confiere a la célula transformada la capacidad de utilizar manosa para el crecimiento. Los marcadores seleccionables que pueden incluirse en un vector incluyen, sin limitación, un gen de neomicina fosfotransferasa (npt), que confiere resistencia a kanamicina, un gen de higromicina fosfotransferasa (hpt), que confiere resistencia a higromicina y un gen de enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, que confiere resistencia a glifosato.

Una realización incluye un vector que tiene cualquier construcción genética en la presente memoria. El vector puede ser un vector intermedio. El vector puede ser un vector de transformación. El constructo de construcción genética en el vector puede tener cualquier ácido nucleico o polinucleótido aislado descrito en la presente memoria.

Un vector en la presente memoria puede configurarse para la expresión en un hospedador que tiene el gen dirigido por la construcción genética. La construcción genética puede ser una construcción de ARNi. Tras la expresión, una

secuencia de ARN transcrita a partir del primer ácido nucleico aislado y una secuencia de ARN transcrita a partir del complemento invertido pueden ser capaces de hibridar entre sí y provocar la inhibición de la expresión del gen en el hospedador.

5 Un vector en la presente memoria puede tener una secuencia que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia que tiene al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 187 [pAG2100], SEQ ID NO: 188 [pAG2101], SEQ ID NO: 189 [pAG2102], SEQ ID NO: 190 [pAG2103], SEQ ID NO: 195 [pAG2106] y SEQ ID NO: 218 [pAL409jSbGWDko2].

10 Un vector en la presente memoria puede tener una secuencia que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia que tiene al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 185 [pAL409] y SEQ ID NO: 186 [pAG2004].

15 Una realización proporciona un método para producir una planta genéticamente modificada. Una planta genéticamente modificada puede construirse mediante cualquier método de ingeniería genética. Una planta genéticamente modificada puede ser una planta transgénica. Una planta transgénica puede transformarse por cualquier método conocido de transformación. Se puede utilizar la transformación mediada por *Agrobacterium*. La planta transgénica puede crearse por otros métodos para transformar una planta, por ejemplo, bombardeo con partículas o captación directa de ADN. La planta puede ser cualquier tipo de planta. La planta puede ser una planta de cultivo energético, una planta de cultivo de alimentos o una planta de cultivo de forraje. La planta puede ser una planta de arroz, una  
20 planta de mijo, una planta de sorgo, una planta de maíz o una planta de tomate. La transformación puede realizarse con cualquier vector adecuado que incluya o consista en uno o más construcciones genéticas en la presente memoria. La planta transgénica puede crearse mediante transformación mediada por *Agrobacterium* usando un vector que incluye un primer ácido nucleico que codifica un producto que inactiva o inhibe uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que codifica al  
25 menos una enzima que degrada polisacáridos. La transformación mediada por *Agrobacterium* puede utilizar cualquier vector de transformación adecuado que albergue una cualquiera o más construcciones de ARNi en la presente memoria. La transformación mediada por *Agrobacterium* se puede hacer con un vector que tenga una secuencia con al menos un 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia seleccionada de grupo que consiste en la SEQ ID NO: 187 [pAG2100], SEQ ID NO: 188 [pAG2101], SEQ ID NO: 189 [pAG2102],  
30 SEQ ID NO: 190 [pAG2103], SEQ ID NO: 195 [pAG2106] y SEQ ID NO: 218 [pAL409jSbGWDko2]. La planta transgénica puede incluir cualquier ácido nucleico aislado, secuencia de aminoácidos, construcción genética, o vector descrito en la presente memoria.

35 La planta mutante se puede crear realizando mutagénesis de semillas de plantas; p. ej., mediante mutagénesis química (EMS) o radiación y seleccionando los mutantes mediante amplificación por PCR y secuenciación del producto de PCR mutante. La planta mutante puede crearse usando mutagénesis y estrategias de exploración tales como Localización en Genomas de Lesiones Locales Inducidas (TILLING, por sus siglas en inglés; Sikora et al. 2011), inserción de ADN-T y mutagénesis basada en transposones (An et al. 2005), estrategias de edición del genoma que implican nucleasas tal como las nucleasas de dedos de zinc (Wright et al. 2005), nucleasas efectoras TAL (Christian et al. 2010), o meganucleasas derivadas de inteína (Wehrkamp-Richter et al. 2009).

40 En una realización, la planta genéticamente modificada puede incluir cualquier secuencia del ácido nucleico aislada, secuencia de aminoácidos, una o más construcciones genéticas, o uno o más vectores descritos en la presente memoria.

45 Una realización incluye un método para alterar los niveles de almidón vegetativo en una planta. El método puede incluir expresar un ácido nucleico aislado en la planta. La expresión del ácido nucleico aislado en la planta puede alterar la actividad de al menos una enzima relacionada con el metabolismo del almidón en la planta. La planta puede ser cualquier planta genéticamente modificada en la presente memoria. La planta genéticamente modificada puede incluir una cualquiera o más construcciones genéticas descritas en la presente memoria.

50 Cualquier planta genéticamente modificada en la presente memoria puede proporcionarse en un método de procesamiento agrícola o aplicaciones de piensos para animales. La planta genéticamente modificada puede incluir una cualquiera o más construcciones genéticas descritas en la presente memoria. Un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos en la planta genéticamente modificada pueden expresarse en cualquier punto del método. El primer ácido nucleico aislado y el segundo ácido nucleico aislado pueden expresarse antes de la etapa de procesamiento de la planta. La primera secuencia aislada y la segunda secuencia aislada pueden expresarse durante  
55 la etapa de procesamiento de la planta. La expresión puede ser inducida. Tras la expresión del primer y el segundo ácido nucleico, la planta genéticamente modificada puede tener un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón en una planta no modificada genéticamente del mismo fondo genético pero que carece de una o más construcciones genéticas.

Una etapa para proporcionar la planta genéticamente modificada puede incluir obtenerla de otra parte que la produjo. Una etapa para proporcionar puede incluir producir la planta transgénica. Una etapa para proporcionar puede incluir producir la planta mutante. La etapa para proporcionar puede incluir la modificación genética de la planta poniendo en contacto la planta con cualquiera de las construcciones genéticas de la presente memoria. La etapa para proporcionar puede incluir una transformación estable de la planta por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, o métodos conocidos. La etapa para proporcionar puede incluir la modificación genética de la planta escindiendo un gen que codifica una proteína implicada en el metabolismo del almidón en un sitio de escisión reconocido por una enzima de restricción expresada transitoriamente en la planta después de poner en contacto la planta con una construcción genética que comprende un primer ácido nucleico que codifica la enzima de restricción. La etapa para proporcionar también puede incluir regenerar la planta genéticamente modificada a partir de un tejido de la planta transgénica o mutante que tiene un nivel alterado de almidón vegetativo. La etapa para proporcionar puede incluir la obtención de una progenie de plantas genéticamente modificadas como resultado de la autopolinización o polinización cruzada entre la planta genéticamente modificada y la planta no modificada genéticamente. La planta genéticamente modificada puede usarse en una variedad de métodos o usos posteriores. La etapa para proporcionar puede incluir la adquisición de la planta genéticamente modificada. La etapa de proporcionar puede incluir hacer que la planta genéticamente modificada esté disponible para otras etapas de procesamiento.

La planta genéticamente modificada puede proporcionarse en un método de procesamiento agrícola como materia prima diseñada con niveles elevados de almidón y/o expresar una o más enzimas que degradan polisacáridos. La materia prima puede incluir cualquier planta genéticamente modificada en la presente memoria sola o en combinación con otros componentes. Los otros componentes pueden incluir otro material vegetal. El procesamiento agrícola es la manipulación o conversión de cualquier materia prima agrícola para un producto o uso en particular. El procesamiento agrícola puede incluir secar la planta genéticamente modificada. El procesamiento agrícola puede incluir fermentar la planta genéticamente modificada. El procesamiento agrícola puede incluir hidrolizar la planta genéticamente modificada por una o más enzimas exógenas para obtener un producto bioquímico.

La planta genéticamente modificada puede proporcionarse en un método de preparación de piensos para animales. La preparación de piensos para animales puede incluir la combinación de la planta genéticamente modificada con granos destiladores. La preparación de piensos para animales puede incluir la granulación de la planta genéticamente modificada en gránulos de pienso. La preparación de piensos para animales puede incluir el ensilado de la planta genéticamente modificada para hacer ensilado.

La preparación de piensos para animales puede incluir la mezcla de la planta genéticamente modificada con una fuente de fibra comestible.

El procesamiento agrícola o la preparación de piensos para animales también pueden incluir al menos una de las operaciones de recolección, empaquetado, molienda, trituración, corte, reducción de tamaño, aplastado, extracción de un componente de la materia prima, purificación de un componente o porción de la materia prima, extracción o purificación del almidón, hidrolización de polisacáridos en oligosacáridos o monosacáridos, conversión química o catálisis química de la materia prima.

En una realización del método de procesamiento agrícola, la planta genéticamente modificada puede usarse para producir un producto químico. El método puede incluir el tratamiento previo de una planta genéticamente modificada con una formulación química para formar una mezcla. La formulación química puede incluir uno o más restos que incluyen pero sin limitación, un ion de sulfito, bisulfito, sulfato, carbonato, hidróxido u óxido. La formulación química puede incluir además uno o más contraiones que incluyen, pero sin limitación, amonio, sodio, magnesio o calcio.

En una realización, la formulación química puede incluir, pero sin limitación, un compuesto seleccionado de un ácido sulfúrico, una base, bisulfito de amonio y carbonato de amonio. El bisulfito de amonio puede estar a una concentración de 0,02 M a 0,35 M. El carbonato de amonio puede estar a una concentración de 0,025 M a 0,25 M. El ácido sulfúrico puede estar a una concentración de 0,25 M. La base puede ser hidróxido de amonio al 7,5 %.

En una realización, la formulación química y la planta genéticamente modificada pueden mezclarse con otro material vegetal en una proporción óptima de líquido a sólido en una mezcla. La mezcla puede tener una relación líquida a sólido seleccionada del valor menor que o igual a uno de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, o cualquier valor en un intervalo entre dos cualquiera de los anteriores (extremos inclusive).

El tratamiento previo puede incluir incubar la mezcla durante cualquier período de tiempo. El tratamiento previo puede incluir incubar la mezcla durante hasta 16 horas. La incubación se puede producir por periodos más largos o más cortos. El tratamiento previo puede incluir incubar la mezcla durante un período de menos que o igual a uno de 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 hora(s).

El tratamiento previo puede incluir proporcionar una temperatura de mezcla de 40 °C a 150 °C. Una temperatura de la mezcla de 40 °C a 95 °C puede permitir la ruptura o eliminación de porciones de lignina dentro del material lignocelulósico en la mezcla sin desactivar las enzimas hidrolíticas. El tratamiento previo puede incluir proporcionar una temperatura de mezcla de 40 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C, 95 °C, 150 °C, menos de 55 °C, menos de 65 °C, menos de 75 °C, menos de 95 °C, menos de 150 °C, 40 °C a 55 °C, 40 °C a 65 °C, 40 °C a 75 °C, 40 °C a 95 °C, 40 °C a

menos de 150 °C, 55 °C a 65 °C, 55 °C a 75 °C, 55 °C a 95 °C, 55 °C a menos de 150 °C, 65 °C a 75 °C, 65 °C a 95 °C, 65 °C a menos de 150 °C, 75 °C a 95 °C, 75 °C a menos de 150 °C, o 95 °C a menos de 150 °C.

5 El tratamiento previo puede incluir proporcionar un pH de mezcla que varía de 1,0 a 12,0. El tratamiento previo puede incluir proporcionar un pH de mezcla dentro de un intervalo de 6,5 a 8,5. El pH de mezcla proporcionado puede ser 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0, 9,5, 10, 10,5, 11,0, 11,5 o 12,0, o un pH dentro de un intervalo entre dos cualquiera de los valores de pH anteriores (extremos incluidos). El pH de la mezcla durante el tratamiento previo puede depender del tipo de sustancia química utilizada y/o del tipo de material vegetal utilizado. Proporcionar un pH de mezcla puede incluir agregar una sustancia química modificadora de pH. Una sustancia química modificadora de pH puede ser un ácido o un álcali.

10 En una realización, el método de procesamiento agrícola puede incluir además la hidrolización de la mezcla. La hidrolización puede incluir incubar la mezcla durante un período de 144 horas, 140 horas, 130 horas, 120 horas, 110 horas, 100 horas, 90 horas, 80 horas, 70 horas, 60 horas, 50 horas, 40 horas, 30 horas, 20 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, menos de 144 horas, menos de 140 horas, menos de 130 horas, menos de 120 horas, menos de 110 horas, menos de 100 horas, menos de 90 horas, menos de 80 horas, menos de 70 horas, menos de 60 horas, menos de 50 horas, menos de 40 horas, menos de 30 horas, menos de 20 horas, menos de 10 horas, menos de 9 horas, menos de 8 horas, menos de 7 horas, menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas o menos de 1 hora.

20 En una realización, la etapa de hidrolización puede incluir proporcionar una temperatura de mezcla de 100 °C o menos, 65 °C o menos, 50 °C o menos, 48 °C a 50 °C, 48 °C a 65 °C, 48 °C a menos de 100 °C, o 48 °C a 100 °C. La etapa de hidrolización puede incluir proporcionar un pH que varía de 4,8 a 5,0, un pH de 4,8, un pH de 4,9, o un pH de 5,0. Al menos uno de la temperatura, pH o tiempo de tratamiento, puede seleccionarse en función de la actividad específica de una enzima que degrada polisacáridos en la planta genéticamente modificada.

25 Si la planta genéticamente modificada incluye múltiples enzimas que degradan polisacáridos, la etapa de hidrolización puede proporcionar secuencialmente condiciones óptimas para al menos una de expresión, tratamiento previo o hidrólisis por cada una de las múltiples enzimas que degradan polisacáridos. La etapa de hidrolización puede incluir proporcionar un pH óptimo para la actividad de una enzima, seguido de un pH óptimo diferente para la actividad de otra enzima. La etapa de hidrolización puede incluir ajustar las temperaturas en diferentes períodos de tiempo para una actividad óptima de cada enzima. Por ejemplo, una celobiohidrolasa puede necesitar una temperatura o pH diferente que una xilanasas.

30 El método de procesamiento agrícola puede incluir añadir una o más enzimas exógenas a al menos una de las plantas genéticamente modificadas, otro material vegetal, o la mezcla. Las enzimas exógenas se pueden añadir antes, durante o después del tratamiento previo. Las enzimas exógenas se pueden añadir antes, durante o después de la etapa de hidrolización. Se pueden proporcionar una o más enzimas exógenas en un cóctel de enzimas. Un cóctel de enzimas puede incluir una o más enzimas que degradan polisacáridos. Una enzima que degrada polisacáridos proporcionada en una realización en la presente memoria puede ser, pero sin limitación, una enzima que degrada lignina, una enzima que degrada celulosa, o una enzima que degrada hemicelulosa. Una enzima que degrada polisacáridos proporcionada en una realización en la presente memoria puede ser, pero sin limitación, una seleccionada entre glucosidasas, xilanasas, celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas, β-xilosidasas, feruloil esterases, β-glucosidasas y amilasas. Un cóctel de enzimas puede incluir una celulasas aislada de *Trichoderma reesii*. Un cóctel de enzimas se puede adquirir de un vendedor. Un cóctel de enzimas puede ser, pero sin limitación, Accellerase® 1000, Accellerase® 1500, Accellerase® TRIO™ y Accellerase® XY disponibles de Genencor International (Rochester, NY). Un cóctel de enzimas puede ser Cellic, CTEC, HTEC disponibles de Novozymes (Dinamarca). Un cóctel de enzimas puede incluir diferentes clases de enzimas que degradan polisacáridos. Un cóctel de enzimas puede incluir enzimas que degradan el almidón. Un cóctel de enzimas puede incluir una amilasa o una invertasa. Se pueden proporcionar condiciones óptimas para diferentes clases de enzimas que degradan polisacáridos en un cóctel. Por ejemplo, la temperatura, el pH y el tiempo de tratamiento para la hidrólisis pueden ajustarse durante el método para proporcionar condiciones óptimas para diferentes enzimas en el cóctel.

50 El método de procesamiento agrícola puede incluir además poner en contacto la mezcla y/o los productos de hidrólisis con un organismo fermentador para producir un producto químico. Después de la hidrólisis enzimática, los azúcares solubles pueden recuperarse y usarse para la producción de un producto químico. El producto químico puede ser glucosa. Como alternativa, en el método, se pueden realizar la sacarificación y la fermentación simultáneas de azúcares solubles en un producto químico. Un producto químico puede ser, pero sin limitación, butano, butanodiol, butadieno, butanol, isobutanol, propano, propanodiol, propileno, propanol, isopropanol, metano, metanol, etanol, fenol, glicerol, etileno, tolueno, etilo, benceno, estireno, xileno, etilenglicol, óxido de etileno, ácido fórmico, dióxido de carbono, formaldehído, acetaldehído, acetona, una vitamina, etano, pentano, hexano, heptano, octano, benceno, ácido acético, sorbitol, arabinitol, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ácido furano dicarboxílico, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutámico, ácido itacónico, ácido levulínico, hidroxibutirolactona, glicerol, sorbitol, xilitol, arabinitol, ácido glucónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido aconítico, ácido xilónico, furfural, levoglucosano, alanina, prolina, lisina, serina o treonina (Véase T. Werpy y G. Petersen, op Value Added Chemicals From Biomass, Volumen 1, Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas, Agosto de 2004, Artículo, PNNL y NREL).

- 5 La conversión de azúcares en un producto químico se puede realizar por cualquier organismo fermentador adecuado. El organismo fermentador puede seleccionarse basándose en el producto químico deseado. El organismo fermentador puede ser levadura. La levadura puede ser, pero sin limitación a uno de especies de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Spathasporao* *Scheffersomyces*. El organismo fermentador puede ser una bacteria. Una bacteria puede ser, pero sin limitación una especie de *Zymomonas*, *Escherichia*, *Bacilo*, *Lactobacillus* o *Clostridium*. El organismo fermentador puede ser un organismo de tipo silvestre o un organismo recombinante genéticamente modificado. El organismo fermentador puede ser una colección de organismos aislados de un animal rumiante. El organismo fermentador puede ser un acetógeno.
- 10 El método de procesamiento agrícola puede incluir sacarificación y fermentación simultáneas de azúcares solubles para producir etanol. La sacarificación y fermentación simultáneas para producir etanol pueden incluir proporcionar *Saccharomyces cerevisiae* D5A antes, durante o después del tratamiento previo o de proporcionar condiciones de hidrólisis.
- 15 Una realización proporciona un método para preparar la planta genéticamente modificada para utilizarse como pienso para animales. El método puede incluir una etapa de poner en contacto la planta genéticamente modificada con líquido para formar una mezcla e incubar la mezcla a una temperatura de 40 °C a 100 °C durante un tiempo suficiente para producir azúcares solubles a partir de material lignocelulósico en la mezcla. El líquido puede ser agua. Una temperatura de la mezcla de 40 °C a 95 °C puede permitir la rotura o eliminación de la lignina dentro del material lignocelulósico en la mezcla sin desactivar una o más CWDE incluidas en la planta genéticamente modificada.
- 20 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir además poner en contacto la mezcla con una sustancia química alcalina. La sustancia química alcalina puede ser, pero sin limitación, óxido de calcio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico, hidróxido sódico, hipoclorito, peróxido de hidrógeno y amoníaco. La etapa de poner en contacto puede producirse en un vaso puede incluir la molienda giratoria y mecánica de la mezcla en el vaso.
- 25 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir además añadir a la mezcla una o más enzimas para la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico. Las enzimas añadidas pueden ser, pero sin limitación, una seleccionada de amilasas, proteasas, fitasas, enzimas hidrolíticas, celulasas, glucanasas, hemicelulasas, xilanasas, amilasas, esterases, lacasas, mananasas y peroxidasas.
- 30 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir combinar la mezcla con una fuente de fibra comestible. La fuente de fibra comestible puede ser, pero sin limitación, maíz, sorgo, trigo, centeno, semillas de soja, mijo, hierbas, grano de maíz, grano de sorgo, grano de trigo, paja de trigo, grano de centeno, fibra de maíz, rastrojo de maíz, hojas de maíz, harina de soja, harina de maíz, aceite de maíz, germen de trigo, germen de maíz, o combinación de los mismos.
- 35 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir combinar la mezcla con granos destiladores. Los granos destiladores se pueden crear en destilerías como subproductos en cervecerías y plantas productoras de etanol. Los granos destiladores pueden usarse como forraje para el ganado.
- 40 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir la granulación de las plantas genéticamente modificadas en gránulos de pienso. La granulación puede realizarse por cualquier método conocido. En una realización, las plantas genéticamente modificadas se pueden triturar en trituradoras tradicionales utilizadas en la fabricación de gránulos. El material triturado como subproductos en cervecerías y plantas productoras de etanol. Los granos destiladores pueden usarse como forraje para el ganado.
- 45 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir la granulación de las plantas genéticamente modificadas en gránulos de pienso. La granulación puede realizarse por cualquier método conocido. En una realización, las plantas genéticamente modificadas se pueden triturar en trituradoras tradicionales utilizadas en la fabricación de gránulos. El material triturado se puede moler aún más para producir partículas que varían en tamaño de 0,5 pulgadas a 6 pulgadas. Las partículas pueden usarse para producir gránulos.
- 50 En una realización, el método de preparación de piensos para animales puede incluir ensilar las plantas genéticamente modificadas para hacer ensilado. Como se emplea en esta memoria, el ensilado es un forraje fermentado de alta humedad que puede alimentar a los animales rumiantes, en particular al ganado lechero, ovejas y caballos. El ensilado se puede hacer colocando partes verdes de plantas en un silo y apilándolas en un montón cubierto por una película de plástico. El ensilado conserva más nutrientes que las plantas secas, heno o rastrojo. El ensilado pasa por un proceso de fermentación bacteriana que da como resultado la producción de ácidos grasos volátiles y una mejor digestibilidad para los animales rumiantes. El método también puede incluir la adición de agentes de ensilado para mejorar la estabilidad o la digestibilidad de la planta genéticamente modificada ensilada. El agente de ensilado puede ser, pero sin limitación, azúcares, ácido láctico o inoculantes.
- 55 En una realización del método de preparación de piensos para animales, las plantas genéticamente modificadas se pueden utilizar para obtener una materia prima digerible. El método también puede incluir alimentar a un animal con una materia prima digerible que comprenda las plantas genéticamente modificadas para promover el crecimiento del animal. El animal puede ser, pero sin limitación, pollos, cerdos o vacas.

Párrafos

Los siguientes párrafos son parte de la descripción.

1. Una construcción genética que comprende:

- 5 i) un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual, dextrinasa límite, enzima desproporcionadora, una enzima de desramificación,  $\beta$ -amilasa e isoamilasa; y
- ii) un segundo ácido nucleico aislado que codifica una o más enzimas que degradan polisacáridos.

2. La construcción genética del párrafo 1 que incluye además un complemento invertido del primer ácido nucleico y un espaciador contiguo con y entre el primer ácido nucleico y el complemento invertido y en donde una secuencia del complemento invertido es capaz de hibridar con una secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones de rigurosidad moderada.

3. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 1 - 2, en donde el producto es un ARNh.

4. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 1 - 2, en donde el producto es una construcción de ARNi.

5. La construcción genética del párrafo 1, en donde el producto es un miARN capaz de dirigirse a un ARN mensajero transcrito a partir de uno o más genes.

6. La construcción genética del párrafo 5, en donde el producto tiene una longitud de 18 a 25 nucleótidos.

7. La construcción genética del párrafo 1, en donde el primer ácido nucleico aislado codifica una enzima de restricción capaz de cortar una secuencia de uno o más genes.

8. La construcción genética del párrafo 7, en donde la enzima de restricción se selecciona del grupo que consiste en: una meganucleasa, una nucleasa con dedos de zinc y una nucleasa efectora TAL.

9. La construcción genética del párrafo 9, en donde la meganucleasa se selecciona del grupo que consiste en I-Crel, I-Dmol, I-Scel, E-Dmel y DmoCre.

10. La construcción genética de una cualquiera o más de las realizaciones 1 - 9, en donde el primer ácido nucleico aislado incluye una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5 [secuencia codificante de SbGWD], SEQ ID NO: 6 [secuencia codificante de ZmGWD], SEQ ID NO: 7 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 8 [gen SbGWD], SEQ ID NO: 9 [gen ZMGWD], SEQ ID NO: 10 [5'UTR y promotor del gen SbGWD], SEQ ID NO: 11 [5'UTR y promotor del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 12 [3'UTR del gen SbGWD], SEQ ID NO: 13 [3'UTR del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 17 [sec. codificante de SbPWD], SEQ ID NO: 18 [sec. codificante de ZmPWD], SEQ ID NO: 19 [sec. codificante de OsPWD], SEQ ID NO: 20 [gen SbPWD], SEQ ID NO: 21 [gen ZmPWD], SEQ ID NO: 22 [5'UTR y promotor del gen SbPWD], SEQ ID NO: 23 [3'UTR del gen SbPWD], SEQ ID NO: 24 [3'UTR del gen ZmPWD], SEQ ID NO: 29 [secuencia codificante de ZmDSP], SEQ ID NO: 30 [secuencia codificante de SbDSP], SEQ ID NO: 31 [secuencia codificante de OsDSP], SEQ ID NO: 32 [gen ZmDSP], SEQ ID NO: 33 [gen SbDSP], SEQ ID NO: 34 [5'UTR y promotor del gen ZmDSP], SEQ ID NO: 35 [5'UTR y promotor del gen SbDSP], SEQ ID NO: 36 [3'UTR de ZmDSP], SEQ ID NO: 37 [3'UTR del gen SbDSP], SEQ ID NO: 173 [gen OsGWD], SEQ ID NO: 174 [gen DSP], SEQ ID NO: 175 [gen ISA3], SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 177 [secuencia codificante de DSP], SEQ ID NO: 178 [secuencia codificante de ISA3], SEQ ID NO: 182 [porción del gen S1GWD], SEQ ID NO: 191 [gen SbGWD-1], SEQ ID NO: 192 [gen SbGDW-2], SEQ ID NO: 206 [PvGWD-2], SEQ ID NO: 207 [PvGWD-5], SEQ ID NO: 208 [PvGWD-1] y SEQ ID NO: 215 [secuencia fusionada de hijo].

11. La construcción genética de una cualquiera o más de las realizaciones 1 - 10, en donde el primer ácido nucleico tiene al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 38 [amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 39 [micro ARN de OsGWD osa-MR809aM1], SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44 [OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a].

12. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 2 - 11, en donde el complemento invertido tiene una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con un complemento invertido de una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44 [OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47

[SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a].

5 13. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 2 - 12, en donde el espaciador comprende un intrón que tiene al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada de grupo que consiste en: SEQ ID NO: 51 [ZmAdh1i6], SEQ ID NO: 52 [OsAdh1i], SEQ ID NO: 53 [SbAdh1-2i] y SEQ ID NO: 54 [SbGWDi].

10 14. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 1 - 13, en donde la una o más enzimas que degradan polisacáridos se seleccionan de un grupo que consiste en: una xilanasa, una endoglucanasa, una exoglucanasa, una amilasa, una xilanasa modificada con inteína, una endoglucanasa modificada con inteína, una exoglucanasa modificada con inteína y una amilasa modificada con inteína.

15 15. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 1 a 14, en donde el segundo ácido nucleico aislado tiene al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada de grupo que consiste en: SEQ ID NO: 86 [O43097], SEQ ID NO: 87 [BD22308], SEQ ID NO: 88 [BD25243], SEQ ID NO: 89 [EU591743], SEQ ID NO: 90 [NtEGm], SEQ ID NO: 91 [POC2S1], SEQ ID NO: 92 [P77853], SEQ ID NO: 93 [O68438], SEQ ID NO: 94 [O33897], SEQ ID NO: 164 [amilasa 19862], SEQ ID NO: 165 [glucoamilasa 20082], SEQ ID NO: 166 [glucoamilasa 20707], SEQ ID NO: 167 [amilasa 21853], SEQ ID NO: 168 [AmyS], SEQ ID NO: 170 [GlaA], SEQ ID NO: 104 [EU591743:AS146-7], SEQ ID NO: 105 [P77853: S158-30-108-35] y SEQ ID NO: 106 [P77853:T134-101-100].

20 16. Una construcción genética que comprende una secuencia del ácido nucleico aislado con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 59 [OsUbi3P: amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 60 [Os Ubi3P: osa-MIR809aM1 de OsGWD], SEQ ID NO: 61 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP1], SEQ ID NO: 62 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP2], SEQ ID NO: 63 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD1], SEQ ID NO: 64 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD2], SEQ ID NO: 65 [OsUbi3P: ARNh de OsPWD1], SEQ ID NO: 66 [OsUbi3P:ARNh de OsPWD2], SEQ ID NO: 67 [OsUbi3P:ARNi de SbGWD], SEQ ID NO: 68 [ZmPepCP: ARNi de SbGWD1], SEQ ID NO: 69 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD2], SEQ ID NO: 70 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1], SEQ ID NO: 71 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2], SEQ ID NO: 72 [OsDSP1 y OsGWD2], SEQ ID NO: 73 [OsPWD2 y OsGWD1], SEQ ID NO: 74 [OsDSP2 y OsPWD1], SEQ ID NO: 119 [ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD], SEQ ID NO: 120 [ZmPepCP: xGZein27ss:BD25243:SEKDEL], SEQ ID NO: 121 [OsUbi3P:EU591743], SEQ ID NO: 122 [ZmUbi1P:EU591743: AS146-7:SEKDEL], SEQ ID NO: 123 [ZmUbi1p: HvAle:NtEGm: SEKDEL], SEQ ID NO: 124 [ZmPepCP: HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 125 [OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 126 [OsUbi3P:BAASS: O33897], SEQ ID NO: 127 [ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL], SEQ ID NO: 128 [OsUbi3P:068438], SEQ ID NO: 129 [OsUbi3P:POC2S1], SEQ ID NO: 130 [ZmUbi1P:ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35], SEQ ID NO: 131 [ZmUbi1:BAASS:P77853:T134-100-101:SEKDEL], SEQ ID NO: 132 [casete 2379 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 133 [casete 2380 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 134 [casete 4106 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 135 [casete 4107 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 136 [casete 4108 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 137 [casete 4109 - -3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 138 [casete 4110 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 139 [casete 4111 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 140 [casete 4112 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 141 [casete 4113 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 142 [casete 4114 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 143 [casete 4115 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 144 [casete 4116 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 145 [casete 4117 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 146 [casete 4120 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 147 [casete 4121 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 148 [casete 4124 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 149 [casete 4125 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 150 [casete 4514 - 3 CWDE y 1 ARNh] y SEQ ID NO: 151 [casete 4515 - 3 CWDE y 1 ARNh].

45 17. Una planta genéticamente modificada que comprende una construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 1 a 16 y 77 a 87.

18. Una planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 1 a 16 y 77 a 87, en donde la planta tiene un nivel disminuido de al menos una proteína diana en comparación con una planta de control no modificada genéticamente.

50 19. La planta genéticamente modificada del párrafo 18, en donde la planta genéticamente modificada es una planta seleccionada del grupo que consiste en: maíz, soja, arroz, caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, mijo, miscanto, eucalipto, sauce y álamo.

20. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 18 - 19, en donde la construcción genética está integrada en un genoma de la planta genéticamente modificada.

55 21. Un método para procesar biomasa vegetal que comprende: obtener una planta genéticamente modificada que incluye una construcción genética que comprende i) un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono

Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual, dextrinasa límite, enzima desproporcionadora, una enzima de desramificación,  $\beta$ -amilasa e isoamilasa; y ii) un segundo ácido nucleico aislado que codifica una o más enzimas que degradan polisacáridos.

22. Un método para procesar biomasa vegetal que comprende:

- 5 modificar genéticamente una planta poniendo en contacto la planta con una construcción genética, en donde la construcción genética comprende i) un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de uno o más genes que codifican una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual, dextrinasa límite, enzima desproporcionadora, una enzima de desramificación,  $\beta$ -amilasa e isoamilasa; y ii) un segundo ácido nucleico aislado que codifica una o más enzimas que degradan polisacáridos; y

regenerar una planta genéticamente modificada que tiene un mayor nivel de almidón en comparación con una planta de control no modificada genéticamente.

- 15 23. El método del párrafo 22, en donde la etapa de modificación genética comprende poner en contacto la planta con una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16

24. El método del párrafo 22, en donde la etapa de modificación genética comprende la transformación estable de la planta.

25. El método del párrafo 22, en donde la etapa de modificación genética comprende expresar una construcción genética en la planta de manera transitoria.

- 20 26. El método del párrafo 22, en donde la planta genéticamente modificada es una planta de uno cualquiera o más de los párrafos 17 - 20 y 66 - 76.

27. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 26, en donde la planta genéticamente modificada se usa para producir una sustancia química.

- 25 28. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 27 incluye además el tratamiento previo de la planta genéticamente modificada con una formulación química para formar una mezcla.

29. El método del párrafo 28, en donde la formulación química incluye al menos un resto que comprende un ion seleccionado del grupo que consiste en: sulfito, bisulfito, sulfato, carbonato, hidróxido y óxido.

30. El método del párrafo 29, en donde el al menos un resto incluye además un contraión seleccionado del grupo que consiste en: amonio, sodio, magnesio y calcio.

- 30 31. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 28 - 30, en donde la formulación química incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un ácido sulfúrico, una base, bisulfito de amonio y carbonato de amonio.

32. El método del párrafo 31, en donde el bisulfito de amonio está a una concentración de 0,02 M a 0,35 M.

33. El método del párrafo 31, en donde el carbonato de amonio está a una concentración de 0,025 M a 0,25 M.

34. El método del párrafo 31, en donde el ácido sulfúrico está a una concentración de 0,25 M.

- 35 35. El método del párrafo 31, en donde la base es hidróxido de amonio al 7,5 %.

36. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 28 - 35, en donde la mezcla tiene una relación líquida a sólido seleccionada del valor de menor que o igual a uno de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1.

- 40 37. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 28 - 36, en donde el tratamiento previo incluye incubar la mezcla durante un período de menos de o igual a uno de 16 horas, 15 horas, 14 horas, 13 horas, 12 horas, 11 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora.

38. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 28 - 37, en donde el tratamiento previo incluye proporcionar una temperatura de mezcla de 40 °C a 120 °C.

39. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 28 - 38, en donde el tratamiento previo incluye proporcionar una mezcla a un pH que varía de 1,0 a 12,0.

- 45 40. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 28 - 39 que comprende además la hidrolización de la mezcla.

41. El método del párrafo 40, en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla durante un período de menos de o igual a uno de 144 horas, 140 horas, 130 horas, 120 horas, 110 horas, 100 horas, 90 horas, 80 horas, 70 horas, 60 horas, 50 horas, 40 horas, 30 horas, 20 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas,

- 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora.
42. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 40 - 41, en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla a una temperatura de 100 °C o menos.
43. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 40 - 41, en donde la temperatura es 65 °C o menos.
- 5 44. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 40 - 43, en donde la temperatura es de 48 °C a 50 °C.
45. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 40 - 44, en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla a un pH de 4,8 a 5,0.
46. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 40 - 45 que comprende además poner en contacto la mezcla con un organismo fermentador para producir una sustancia química.
- 10 47. El método del párrafo 46, en donde el organismo fermentador es una levadura seleccionada del grupo que consiste en: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Spathaspora* y *Scheffersomyces*.
48. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 47 que incluye además la adición de una o más enzimas exógenas.
- 15 49. El método del párrafo 48, en donde la una o más enzimas incluyen una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una glucosidasa, una β-xilosidasa, celulasa aislada de *Trichoderma reesii*, una xilanasa, una amilasa y una invertasa.
50. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 27 - 49, en donde la sustancia química es glucosa.
51. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 26, en donde la planta genéticamente modificada se usa para producir un pienso para animales.
- 20 52. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 26 y 51 que incluye además poner en contacto una planta genéticamente modificada con líquido para formar una mezcla e incubar la mezcla a una temperatura menor que o igual a 100 °C durante un tiempo suficiente para producir azúcares solubles a partir de material lignocelulósico en la mezcla.
53. El método del párrafo 52, en donde el líquido es agua.
- 25 54. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 52 - 53, que además pone en contacto la mezcla con una sustancia química alcalina.
55. El método del párrafo 54, en donde la sustancia química alcalina se selecciona del grupo que consiste en: óxido de calcio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico, hidróxido sódico, hipoclorito, peróxido de hidrógeno y amoníaco.
56. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 52 - 55, que además pone en contacto la mezcla con una o más enzimas.
- 30 57. El método del párrafo 56, en donde la una o más enzimas se selecciona del grupo que consiste en: proteasas, fitasas, enzimas hidrolíticas, glucanasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, amilasas, esterases, lacasas, mananasas y peroxidases.
58. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 52 - 57 que incluye además combinar la mezcla con una fuente de fibra comestible.
- 35 59. El método del párrafo 58, en donde la fuente de fibra comestible se selecciona del grupo de plantas que consiste en: maíz, sorgo, trigo, centeno, semillas de soja, grano de maíz, grano de sorgo, grano de trigo, grano de centeno, harina de soja, harina de maíz, aceite de maíz y germen de maíz.
60. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 52 - 57 que comprende además combinar la mezcla con granos destiladores.
- 40 61. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 51 - 57 que comprende además la granulación de la planta genéticamente modificada en gránulos de pienso.
62. El método del párrafo 51 que comprende además ensilar la planta genéticamente modificada para hacer ensilado.
63. El método del párrafo 51, en donde la planta genéticamente modificada se usa para obtener una materia prima digerible.
- 45 64. El método del párrafo 63 que comprende además alimentar a un animal con la materia prima digerible para promover el crecimiento del animal.

65. El método del párrafo 64, en donde el animal se selecciona del grupo que consiste en: pollos, cerdos y vacas.
66. Una planta genéticamente modificada que comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos, en donde tras la expresión del primer ácido nucleico, la planta genéticamente modificada tiene un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón vegetativo en una planta no modificada genéticamente que tiene el mismo fondo genético que la planta genéticamente modificada pero que carece del primer ácido nucleico aislado.
67. La planta genéticamente modificada del párrafo 66 que comprende además un promotor operativamente unido a al menos uno del primer ácido nucleico aislado o del segundo ácido nucleico aislado.
68. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 67 que comprende además un complemento invertido del primer ácido nucleico aislado y un espaciador contiguo con y entre el primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido, en donde una secuencia del complemento invertido es capaz de hibridar con una secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones de rigurosidad moderada.
69. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 67, en donde el producto es un miARN capaz de dirigirse a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen diana seleccionado de al menos un gen.
70. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 67, en donde el producto es una enzima de restricción capaz de cortar una secuencia de un gen diana seleccionado de al menos un gen.
71. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 69, en donde el primer ácido nucleico aislado comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 38 [amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 39 [micro ARN de OsGWD osa-MR809aM1], SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44[OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a].
72. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 71, en donde el al menos un gen comprende una secuencia con al menos 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5 [secuencia codificante de SbGWD], SEQ ID NO: 6 [secuencia codificante de ZmGWD], SEQ ID NO: 7 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 8 [gen SbGWD], SEQ ID NO: 9 [gen ZMGWD], SEQ ID NO: 10 [5'UTR y promotor del gen SbGWD], SEQ ID NO: 11 [5'UTR y promotor del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 12 [3'UTR del gen SbGWD], SEQ ID NO: 13 [3'UTR del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 17 [sec. codificante de SbPWD], SEQ ID NO: 18 [sec. codificante de ZmPWD], SEQ ID NO: 19 [sec. codificante de OsPWD], SEQ ID NO: 20 [gen SbPWD], SEQ ID NO: 21 [gen ZmPWD]. SEQ ID NO: 22 [5'UTR y promotor del gen SbPWD], SEQ ID NO: 23 [3'UTR del gen SbPWD], SEQ ID NO: 24 [3'UTR del gen ZmPWD], SEQ ID NO: 29 [secuencia codificante de ZmDSP], SEQ ID NO: 30 [secuencia codificante de SbDSP], SEQ ID NO: 31 [secuencia codificante de OsDSP], SEQ ID NO: 32 [gen ZmDSP], SEQ ID NO: 33 [gen SbDSP], SEQ ID NO: 34 [5'UTR y promotor del gen ZmDSP], SEQ ID NO: 35 [5'UTR y promotor del gen SbDSP], SEQ ID NO: 36 [3'UTR de ZmDSP], SEQ ID NO: 37 [3'UTR del gen SbDSP], SEQ ID NO: 173 [gen OsGWD], SEQ ID NO: 174 [gen DSP], SEQ ID NO: 175 [gen ISA3], SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 177 [secuencia codificante de DSP], SEQ ID NO: 178 [secuencia codificante de ISA3], SEQ ID NO: 182 [porción del gen S1GWD], SEQ ID NO: 191 [gen SbGWD-1], SEQ ID NO: 192 [gen SbGDW-2], SEQ ID NO: 206 [PvGWD-2], SEQ ID NO: 207 [PvGWD-5], SEQ ID NO: 208 [PvGWD-1] y SEQ ID NO: 215 [secuencia fusionada de hijo].
73. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 71, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en: Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual,  $\beta$ -amilasa, isoamilasa, dextrinasa límite, una enzima desproporcionadora y una enzima de desramificación
74. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 73, en donde la al menos una enzima que degrada polisacáridos se selecciona de un grupo que consiste en: una xilanasa, una endoglucanasa, una exoglucanasa, una amilasa, una xilanasa modificada con inteína, una endoglucanasa modificada con inteína, una exoglucanasa modificada con inteína y una amilasa modificada con inteína.
75. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 74, en donde el segundo ácido nucleico aislado comprende una secuencia con al menos 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 86 [O43097], SEQ ID NO: 87 [BD22308], SEQ ID NO:88 [BD25243], SEQ ID NO: 89 [EU591743], SEQ ID NO: 90 [NtEGm], SEQ ID NO: 91[P0C2S1], SEQ ID NO: 92 [P77853], SEQ ID NO: 93 [O68438], SEQ ID NO: 94 [O33897], SEQ ID NO: 164 [amilasa 19862], SEQ ID NO: 165 [glucoamilasa 20082], SEQ ID NO: 166 [glucoamilasa 20707], SEQ ID NO: 167

[amilasa 21853], SEQ ID NO: 168 [AmyS], SEQ ID NO: 170 [GlaA], SEQ ID NO: 104 [EU591743:AS146-7], SEQ ID NO: 105 [P77853:S158-30-108-35] y SEQ ID NO: 106 [P77853:T134-101-100].

76. La planta genéticamente modificada de uno cualquiera o más de los párrafos 66 - 67, en donde el primer ácido nucleico aislado y el segundo ácido nucleico aislado están dentro de una construcción genética que comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 59 [OsUbi3P: amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 60 [Os Ubi3P: osa-MIR809aM1 de OsGWD], SEQ ID NO: 61 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP1], SEQ ID NO: 62 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP2], SEQ ID NO: 63 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD1], SEQ ID NO: 64 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD2], SEQ ID NO: 65 [OsUbi3P: ARNh de OsPWD1], SEQ ID NO: 66 [OsUbi3P:ARNh de OsPWD2], SEQ ID NO: 67 [OsUbi3P:ARNi de SbGWD], SEQ ID NO: 68 [ZmPepCP: ARNi de SbGWD1], SEQ ID NO: 69 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD2], SEQ ID NO: 70 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1], SEQ ID NO: 71 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2], SEQ ID NO: 72 [OsDSP1 y OsGWD2], SEQ ID NO: 73 [OsPWD2 y OsGWD1], SEQ ID NO: 74 [OsDSP2 y OsPWD1], SEQ ID NO: 119 [ZmUbi1P:mZ27:BD22308:HvVSD], SEQ ID NO: 120 [ZmPepCP:m27:BD25243:SEKDEL], SEQ ID NO: 121 [OsUbi3P:EU591743], SEQ ID NO:122 [ZmUbi1P:EU591743: AS146-7:SEKDEL], SEQ ID NO: 123 [ZmUbi1P:NvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 124 [ZmPepCP: HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 125 [OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 126 [OsUbi3P:BAASS:O43097:SEKDEL], SEQ ID NO: 127 [ZmPepCP:BAASS:O43097], SEQ ID NO: 128[OsUbi3P:068438], SEQ ID NO: 129 [OsUbi3P:P0C2S1], SEQ ID NO: 130 [ZmUbi1P:Zm:BAASS:P77853:S158-30-108-35], SEQ ID NO: 131 [ZmUbi1:BAASS:P77853:T134-100-101:SEKDEL], SEQ ID NO: 132 [casete 2379 - 3CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 133 [casete 2380 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 134 [casete 4106 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 135 [casete 4107 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 136 [casete 4108 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 137 [casete 4109 - -3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 138 [casete 4110 - 3 CWDE y 1ARNh], SEQ ID NO: 139 [casete 4111 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 140 [casete 4112 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 141 [casete 4113 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 142 [casete 4114 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 143 [casete 4115 - 3CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 144 [casete 4116 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 145 [casete 4117 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 146 [casete 4120 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 147 [casete 4121 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 148 [casete 4124 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 149 [casete 4125 - 2 CWDE y 1ARNh], SEQ ID NO: 150 [casete 4514 - 3 CWDE y 1 ARNh] y SEQ ID NO: 151 [casete 4515 - 3 CWDE y 1 ARNh].

77. Una construcción genética que comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos.

78. La construcción genética del párrafo 77 que comprende además un promotor operativamente unido a al menos uno del primer ácido nucleico aislado o del segundo ácido nucleico aislado.

79. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 78 que incluye además un complemento invertido de la secuencia del primer ácido nucleico aislado y un espaciador contiguo con y entre el primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido, en donde una secuencia del complemento invertido es capaz de hibridar con una secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones de rigurosidad moderada.

80. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 78, en donde el producto es un miARN capaz de dirigirse a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen diana seleccionado de al menos un gen.

81. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 78, en donde el producto es una enzima de restricción capaz de cortar una secuencia de un gen diana seleccionado de al menos un gen.

82. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 78, en donde el primer ácido nucleico aislado comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 38 [amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 39 [OsGWD osa-MR809aM1microRNA], SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42[OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44[OsPWD1], SEQ ID NO: 45[OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD -SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 49 [ZmGWD1] y SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a].

83. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 82, en donde el al menos un gen comprende una secuencia con al menos 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5 [sec. codificante de SbGWD], SEQ ID NO: 6 [sec.codificante de ZmGWD], SEQ ID NO: 7 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 8 [gen SbGWD], SEQ ID NO: 9 [gen ZMGWD], SEQ ID NO: 10 [5'UTR y promotor del gen SbGWD], SEQ ID 11 NO: [5'UTR y promotor del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 12 [3'UTR del gen SbGWD], SEQ ID NO: 13 [3'UTR del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 17 [sec. codificante de SbPWD], SEQ ID NO: 18 [sec. codificante de ZmPWD], SEQ ID NO: 19 [sec. codificante de OsPWD], SEQ ID NO: 20 [gen SbPWD], SEQ ID NO: 21 [gen ZmPWD], SEQ ID NO: 22 [5'UTR y promotor del gen SbPWD], SEQ ID NO: 23 [3'UTR del gen SbPWD], SEQ ID NO: 24 [3'UTR del gen ZmPWD], SEQ ID NO: 29 [secuencia

- 5 codificante de ZmDSP], SEQ ID NO: 30 [secuencia codificante de SbDSP], SEQ ID NO: 31 [secuencia codificante de OsDSP], SEQ ID NO: 32 [gen ZmDSP], SEQ ID NO: 33 [gen SbDSP], SEQ ID NO: 34 [5'UTR y promotor del gen ZmDSP], SEQ ID NO: 35 [5'UTR y promotor del gen SbDSP], SEQ ID NO: 36 [3'UTR de ZmDSP], SEQ ID NO: 37 [3'UTR del gen SbDSP], SEQ ID NO: 173 [gen OsGWD], SEQ ID NO: 174 [gen DSP], SEQ ID NO: 175 [gen ISA3], SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 177 [secuencia codificante de DSP], SEQ ID NO: 178 [secuencia codificante de ISA3], SEQ ID NO: 182 [porción del gen SIGWD], SEQ ID NO: 191 [gen SbGWD-1], SEQ ID NO: 192 [gen SbGDW-2], SEQ ID NO: 206 [PvGWD-2], SEQ ID NO: 207 [PvGWD-5], SEQ ID NO: 208 [PvGWD-1] y SEQ ID NO: 215 [secuencia fusionada de mijo].
- 10 84. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 83, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en: Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual,  $\beta$ -amilasa, isoamilasa, dextrinasa límite, una enzima desproporcionadora y una enzima de desramificación
- 15 85. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 84, en donde la al menos una enzima que degrada polisacáridos se selecciona de un grupo que consiste en: una xilanasa, una endoglucanasa, una exoglucanasa, una amilasa, una xilanasa modificada con inteína, una endoglucanasa modificada con inteína, una exoglucanasa modificada con inteína y una amilasa modificada con inteína.
- 20 86. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 84, en donde el segundo ácido nucleico aislado comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con la secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 86 [O43097], SEQ ID NO: 87 [BD22308], SEQ ID NO: 88 [BD25243], SEQ ID NO: 89 [EU591743], SEQ ID NO: 90 [NtEGm], SEQ ID NO: 91 [P0C2S1], SEQ ID NO: 92 [P77853], SEQ ID NO: 93 [O68438], SEQ ID NO: 94 [O33897], SEQ ID NO: 164 [amilasa 19862], SEQ ID NO: 165 [glucoamilasa 20082], SEQ ID NO: 166 [glucoamilasa 20707], SEQ ID NO: 167 [amilasa 21853], SEQ ID NO: 168 [AmyS], SEQ ID NO: 170 [GlaA], SEQ ID NO: 104 [EU591743:AS146-7], SEQ ID NO: 105 [P77853: S158-30-108-35] y SEQ ID NO: 106 [P77853:T134-101-100].
- 25 87. La construcción genética de uno cualquiera o más de los párrafos 77 - 78 que comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 59 [OsUbi3P: amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 60 [Os Ubi3P: osa-MIR809aM1 de OsGWD], SEQ ID NO: 61 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP1], SEQ ID NO: 62 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP2], SEQ ID NO: 63 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD1], SEQ ID NO: 64 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD2], SEQ ID NO: 65 [OsUbi3P: ARNh de OsPWD1], SEQ ID NO: 66 [OsUbi3P:ARNh de OsPWD2], SEQ ID NO: 67 [OsUbi3P:ARNi de SbGWD], SEQ ID NO: 68 [ZmPepCP: ARNi de SbGWD1], SEQ ID NO: 69 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD2], SEQ ID NO: 70 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1], SEQ ID NO: 71 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2], SEQ ID NO: 72 [OsDSP1 y OsGWD2], SEQ ID NO: 73 [OsPWD2 y OsGWD1], SEQ ID NO: 74 [OsDSP2 y OsPWD1], SEQ ID NO: 119 [ZmUbi1P:mZ27:BD22308:HvVSD], SEQ ID NO: 120 [ZmPepCP: m27:BD25243:SEKDEL], SEQ ID NO: 121 [OsUbi3P:EU591743], SEQ ID NO: 122 [ZmUbi1P:EU591743: AS146-7:SEKDEL], SEQ ID NO: 123 [ZmUbi1p:NvAle:NtEGm: SEKDEL], SEQ ID NO: 124 [ZmPepCP: HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 125 [OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 126 [OsUbi3P:BAASS: O43097:SEKDEL], SEQ ID NO: 127 [ZmPepCP:BAASS:O43097], SEQ ID NO: 128 [OsUbi3P:068438], SEQ ID NO: 129 [OsUbi3P:P0C2S1], SEQ ID NO: 130 [ZmUbi1P:Zm:BAASS:P77853:S158-30-108-35], SEQ ID NO: 131 [ZmUbi1:BAASS:P77853:T134-100-101:SEKDEL], SEQ ID NO: 132 [casete 2379 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 133 [casete 2380 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 134 [casete 4106 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 135 [casete 4107 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 136 [casete 4108 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 137 [casete 4109 - -3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 138 [casete 4110 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 139 [casete 4111 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 140 [casete 4112 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 141 [casete 4113 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 142 [casete 4114 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 143 [casete 4115 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 144 [casete 4116 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 145 [casete 4117 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 146 [casete 4120 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 147 [casete 4121 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 148 [casete 4124 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 149 [casete 4125 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 150 [casete 4514 - 3 CWDE y 1 ARNh] y SEQ ID NO: 151 [casete 4515 - 3 CWDE y 1 ARNh].
- 30 35 40 45 50 55 60
88. Un método de procesamiento agrícola o preparación de piensos para animales que comprende proporcionar una planta genéticamente modificada que comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica un producto que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que codifica al menos una enzima que degrada polisacáridos, en donde tras la expresión del primer ácido nucleico, la planta genéticamente modificada tiene un nivel alterado de almidón vegetativo en comparación con el nivel de almidón vegetativo en una planta no modificada genéticamente.
89. El método del párrafo 88, en donde la planta genéticamente modificada comprende además un promotor operativamente unido a al menos el primer ácido nucleico aislado o el segundo ácido nucleico aislado.
90. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 89, en donde la planta genéticamente modificada comprende además un complemento invertido del primer ácido nucleico aislado y un espaciador contiguo con y entre el primer ácido nucleico aislado y el complemento invertido y en donde una secuencia del complemento invertido es capaz de hibridar con una secuencia del primer ácido nucleico aislado en condiciones de rigurosidad moderada.

91. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 89, en donde el producto es un miARN capaz de dirigirse a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen diana seleccionado del al menos un gen.
92. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 89, en donde el producto es una enzima de restricción capaz de cortar una secuencia de un gen diana seleccionado del al menos un gen.
- 5 93. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 89, en donde el primer ácido nucleico aislado comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 38 [amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 39 [micro ARN de OsGWD osa-MR809aM1], SEQ ID NO: 40 [OsDSP1], SEQ ID NO: 41 [OsDSP2], SEQ ID NO: 42 [OsGWD1], SEQ ID NO: 43 [OsGWD2], SEQ ID NO: 44[OsPWD1], SEQ ID NO: 45 [OsPWD2], SEQ ID NO: 46 [sec. flanqueantes SbGWD- SbGWDko2b], SEQ ID NO: 47 [SbGWD1], SEQ ID NO: 48 [SbGWD2], SEQ ID NO: 10 49 [ZmGWD1], SEQ ID NO: 50 [ZmGWD2], SEQ ID NO: 179 [GWD1], SEQ ID NO: 180 [GWD2], SEQ ID NO: 183 [DSP1], SEQ ID NO: 184 [ISA3], SEQ ID NO: 209 [PvGWDko2] y SEQ ID NO: 216 [sec. flanqueantes SbGWDko2a].
- 15 94. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 92, en donde el al menos un gen comprende una secuencia con al menos 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5 [secuencia codificante de SbGWD], SEQ ID NO: 6 [secuencia codificante de ZmGWD], SEQ ID NO: 7 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 8 [gen SbGWD], SEQ ID NO: 9 [gen ZMGWD], SEQ ID NO: 10 [5'UTR y promotor del gen SbGWD], SEQ ID 11 NO: [5'UTR y promotor del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 12 [3'UTR del gen SbGWD], SEQ ID NO: 13 [3'UTR del gen ZmGWD], SEQ ID NO: 17 [sec. codificante de SbPWD], SEQ ID NO: 18 [sec. codificante de ZmPWD], SEQ ID NO: 19 [sec. codificante de OsPWD], SEQ ID NO: 20 [gen SbPWD], SEQ ID NO: 21 [gen ZmPWD]. SEQ ID NO: 22 [5'UTR y promotor del gen SbPWD], SEQ ID NO: 23 [3'UTR del gen SbPWD], SEQ ID NO: 24 [3'UTR del gen ZmPWD], SEQ ID NO: 29 [secuencia codificante de ZmDSP], SEQ ID NO: 30 [secuencia codificante de SbDSP], SEQ ID NO: 31 [secuencia codificante de OsDSP], SEQ ID NO: 32 [gen ZmDSP], SEQ ID NO: 33 [gen SbDSP], SEQ ID NO: 34 [5'UTR y promotor del gen ZmDSP], SEQ ID NO: 35 [5'UTR y promotor del gen SbDSP], SEQ ID NO: 36 [3'UTR de ZmDSP], SEQ ID NO: 37 [3'UTR del gen SbDSP], SEQ ID NO: 173 [gen OsGWD], SEQ ID NO: 174 [gen DSP], SEQ ID NO: 175 [gen ISA3], SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de OsGWD], SEQ ID NO: 177 [secuencia codificante de DSP], SEQ ID NO: 178 [secuencia codificante de ISA3], SEQ ID NO: 182 [porción del gen S1GWD], SEQ ID NO: 191 [gen SbGWD-1], SEQ ID NO: 192 [gen SbGDW-2], SEQ ID NO: 206 [PvGWD-2], SEQ ID NO: 207 [35; PvGWD-5], SEQ ID NO: 208 [PvGWD-1] y SEQ ID NO: 215 [secuencia fusionada de mijo].
- 20 95. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 94, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en: Glucano Agua Dicinasa, Fosfoglucono Agua Dicinasa, Proteína fosfatasa de Especificidad Dual,  $\beta$ -amilasa, isoamilasa, dextrinasa límite, una enzima desproporcionadora y una enzima de desramificación.
- 25 96. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 95, en donde la al menos una enzima que degrada polisacáridos se selecciona de un grupo que consiste en: una xilanasa, una endoglucanasa, una exoglucanasa, una amilasa, una xilanasa modificada con inteína, una endoglucanasa modificada con inteína, una exoglucanasa modificada con inteína y una amilasa modificada con inteína.
- 30 97. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 95, en donde el segundo ácido nucleico comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 86 [O43097], SEQ ID NO: 87 [BD22308], SEQ ID NO: 88 [BD25243], SEQ ID NO: 89 [EU591743], SEQ ID NO: 90 [NtEGm], SEQ ID NO: 91 [P0C2S1], SEQ ID NO: 92 [P77853], SEQ ID NO: 93 [O68438], SEQ ID NO: 94 [O33897], SEQ ID NO: 164 [amilasa 19862], SEQ ID NO: 165 [glucoamilasa 20082], SEQ ID NO: 166 [glucoamilasa 20707], SEQ ID NO: 167 [amilasa 21853], SEQ ID NO: 168 [AmyS], SEQ ID NO: 170 [GlaA], SEQ ID NO: 104 [EU591743:AS146-7], SEQ ID NO: 105 [P77853: S158-30-108-35] y SEQ ID NO: 106 [P77853:T134-101-100].
- 35 98. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 89, en donde el primer ácido nucleico aislado y el segundo ácido nucleico aislado están dentro de una construcción genética que comprende una secuencia con al menos un 70, 72, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 % de identidad con una secuencia de referencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 59 [OsUbi3P:amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 60 [Os Ubi3P: osa-MIR809aM1 de OsGWD], SEQ ID NO: 61 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP1], SEQ ID NO: 62 [OsUbi3P: OsDSP2 ARNh], SEQ ID NO: 63 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD1], SEQ ID NO: 64 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD2], SEQ ID NO: 65 [OsUbi3P: ARNh de OsPWD1], SEQ ID NO: 66 [OsUbi3P:ARNh de OsPWD2], SEQ ID NO: 67 [OsUbi3P:ARNi de SbGWD], SEQ ID NO: 68 [ZmPepCP: ARNi de SbGWD1], SEQ ID NO: 69 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD2], SEQ ID NO: 70 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1], SEQ ID NO: 71 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2], SEQ ID NO: 72 [OsDSP1 y OsGWD2], SEQ ID NO: 73 [OsPWD2 y OsGWD1], SEQ ID NO: 74 [OsDSP2 y OsPWD1], SEQ ID NO: 119 [ZmUbi1P:mZ27:BD22308:HvVSD], SEQ ID NO: 120 [ZmPepCP: m27:BD25243:SEKDEL], SEQ ID NO: 121 [OsUbi3P:EU591743], SEQ ID NO: 122 [ZmUbi1P:EU591743: AS146-7:SEKDEL], SEQ ID NO: 123 [ZmUbi1p:NvAle:NtEGm: SEKDEL], SEQ ID NO: 124 [ZmPepCP: HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 125 [OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL], SEQ ID NO: 126 [OsUbi3P:BAASS: O43097:SEKDEL], SEQ ID NO: 127 [ZmPepCP:BAASS:O43097], SEQ ID NO: 128 [OsUbi3P:068438], SEQ ID NO: 129 [OsUbi3P:P0C2S1], SEQ ID NO: 130 [ZmUbi1P:Zm:BAASS:P77853:S158-30-108-35], SEQ ID NO: 131 [ZmUbi1P:BAASS:P77853:T134-100-
- 60

- 101:SEKDEL], SEQ ID NO: 132 [casete 2379 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 133 [casete 2380 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 134 [casete 4106 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 135 [casete 4107 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 136 [casete 4108 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 137 [casete 4109 - -3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 138 [casete 4110 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 139 [casete 4111 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 140 [casete 4112 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 141 [casete 4113 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 142 [casete 4114 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 143 [casete 4115 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 144 [casete 4116 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 145 [casete 4117 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 146 [casete 4120 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 147 [casete 4121 - 3 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 148 [casete 4124 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 149 [casete 4125 - 2 CWDE y 1 ARNh], SEQ ID NO: 150 [casete 4514 - 3 CWDE y 1 ARNh] y SEQ ID NO: 151 [casete 4515 - 3 CWDE y 1 ARNh].
99. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 98, en donde la planta genéticamente modificada es la planta genéticamente modificada de cualquiera de los párrafos 17 - 20 o 66 - 76.
100. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 99 que comprende además el tratamiento previo de la planta genéticamente modificada con una formulación química para formar una mezcla.
101. El método del párrafo 100, en donde la formulación química incluye al menos un resto que comprende un ion seleccionado del grupo que consiste en: sulfito, bisulfito, sulfato, carbonato, hidróxido y óxido.
102. El método del párrafo 101, en donde el al menos un resto incluye además un contraión seleccionado del grupo que consiste en: amonio, sodio, magnesio y calcio.
103. El método del párrafo 100, en donde la formulación química incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un ácido sulfúrico, una base, bisulfito de amonio y carbonato de amonio.
104. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 100 - 103, en donde la mezcla tiene una relación líquida a sólido seleccionada del valor de menor que o igual a uno de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1.
105. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 100 - 104, en donde el tratamiento previo incluye incubar la mezcla durante un período de menos de o igual a uno de 16 horas, 15 horas, 14 horas, 13 horas, 12 horas, 11 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora.
106. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 100 - 105, en donde el tratamiento previo incluye proporcionar una temperatura de mezcla de 40 °C a 120 °C.
107. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 100 - 106, en donde el tratamiento previo incluye proporcionar una mezcla a un pH que varía de 1,0 a 12,0.
108. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 100 - 107 que comprende además la hidrolización de la mezcla.
109. El método del párrafo 108, en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla durante un período de menos de o igual a uno de 144 horas, 140 horas, 130 horas, 120 horas, 110 horas, 100 horas, 90 horas, 80 horas, 70 horas, 60 horas, 50 horas, 40 horas, 30 horas, 20 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora.
110. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 108 - 109, en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla a una temperatura de 100 °C o menos.
111. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 108 - 110 que comprende además la hidrolización de la planta genéticamente modificada con una o más enzimas exógenas.
112. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 108 - 111 que comprende además exponer la planta genéticamente modificada a un organismo fermentador en condiciones de fermentación para producir un producto químico.
113. El método del párrafo 112, en donde la una o más enzimas exógenas se selecciona del grupo que consiste en: una glucosidasa, una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una glucosidasa, una β-xilosidasa, una celulasa, una xilanasa, una amilasa, una invertasa, una proteasa, una fitasa, una enzima hidrolítica, una glucanasa, una hemicelulasa, una esterasa, una lacasa, una mananasa y una peroxidasa.
114. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 111 que comprende además al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en: secar la planta genéticamente modificada, granular la planta genéticamente modificada en gránulos de pienso, ensilar la planta genéticamente modificada para hacer ensilado y combinar la planta genéticamente modificada con granos destiladores o con una fuente de fibra comestible.
115. El método del párrafo 114, en donde la fuente de fibra comestible se selecciona del grupo de plantas que consiste en: maíz, sorgo, trigo, centeno, semillas de soja, grano de maíz, grano de sorgo, grano de trigo, grano de centeno,

harina de soja, harina de maíz, aceite de maíz y germen de maíz.

116. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 111 y 114 - 115 que comprende además alimentar a un animal con la planta genéticamente modificada para promover el crecimiento del animal.

117. El método del párrafo 116, en donde el animal se selecciona del grupo que consiste en: pollos, cerdos y vacas.

5 118. El método de uno cualquiera o más de los párrafos 88 - 117, en donde la etapa de proporcionar incluye producir la planta genéticamente modificada usando transformación mediada por *Agrobacterium*-con la construcción genética.

119. El método del párrafo 118, en donde la planta genéticamente modificada se selecciona del grupo que consiste en: maíz, soja, arroz, caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, mijo, miscanto, eucalipto, sauce y álamo.

10 120. Uso de una cualquiera o más de las plantas modificadas genéticamente de los párrafos 17 - 20 y 66 - 76 para procesar la biomasa vegetal mediante un método de uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 65 y 88 - 119.

121. El uso del párrafo 120, en donde una o más de las plantas genéticamente modificadas incluyen una cualquiera o más de las construcciones genéticas de los párrafos 1 - 16 y 77 - 87.

122. Uso de uno cualquiera o más de las construcciones genéticas de los párrafos 1 - 16 y 77 - 87 en un método de procesamiento de biomasa vegetal en uno cualquiera o más de los párrafos 21 - 65 y 88 - 119.

15 123. El uso del párrafo 122, en donde la una cualquiera o más de las construcciones genéticas se usaron para obtener una cualquiera o más de las plantas genéticamente modificadas de los párrafos 17 - 20 y 66 - 76.

#### Ejemplo 1. Identificación de los genes diana

Las bibliotecas de inserción de ADN-T a partir de diferentes organismos pueden investigarse para localizar genes en aquellos organismos relacionados con la regulación del almidón. Basándose en el descubrimiento de tales genes, se puede realizar una búsqueda para encontrar genes similares en una planta de interés. Los genes de interés pueden usarse en construcciones de la presente memoria para afectar la alteración en la regulación del almidón.

25 Se han desarrollado otros métodos para generar o identificar alelos nulos entre genes. Entre estos están TILLING (Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, Comai L Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING (2007) BMC Plant Biol. 7:19) y el etiquetado de genes con retrotransposones Tos17 o transposones Ac y Ds/dSpm de maíz (*Zea mays*) modificado (Krishnan A, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Han CD, Lee MC, Yu SM, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Sundaresan V, Hirochika H, Leung H, Pereira A. 2009. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. Plant Physiol. 149:165-70 y referencias en el mismo). Estos métodos pueden usarse para generar o identificar alelos nulos entre genes relacionados con la regulación del almidón.

30 Una vez que se identificaron los genes que codifican enzimas clave implicadas en la renovación del almidón transitorio en los cultivos de ejemplo, se identificaron genes candidatos en arroz, maíz y sorgo que codifican enzimas implicadas en la renovación del almidón por su homología con genes que codifican las enzimas correspondientes en especies que se han estudiado mejor. Por ejemplo, las alineaciones de aminoácidos con CLUSTAL entre secuencias hipotéticas de glucano agua dicinasa (GWD) que se han inferido a partir de secuencias de genoma propuestas de sorgo (SbGWD; SEQ ID NO: 1), maíz (ZmGWD; SEQ ID NO: 2) y arroz (OsGWD; SEQ ID NO: 3) y la secuencia de la enzima GWD conocida de patata (StGWD; SEQ ID NO: 4) muestran una extensa homología entre estos polipéptidos:

Alineación de secuencias múltiples con CLUSTAL 2.1

SbGWD -----

MTGFSAASAAAAAERCALAIRARPAASSPAKRQQQSASLRRSGGQRRPT 50

ZmGWD -----

40 OsGWD ----- PAATT 5

StGWD

MSNSLGNLLYQGFLTSTVLEHKSRISPPCVGGNSLFQQQVISKSPSTEFRGNRLK

VQK 60

SbGWD

TLAASRRSPVVVPRAIATSADRASHDLVGKFTLDSNSELLVAVNPAPQGLVSVIGL  
EVTN 110

ZmGWD -----

OsGWD TLAVSRRS-

LLAPRAIAASTGRASPGLVGRFTLDANSELKVTLNPAPQGSVVEINLEATN 64

StGWD  
KKIPMEKKRAFSSSPHAVLTTDTSSSELAEKFSLGGNIELQVDVRPPTSGDVSVDF  
QVTN 120

5

SbGWD

TSGSLILHWGVLRPDKRDWILPSRQPDGTTVYKNRALRTPFVKSGDNSTLRIEIDD  
PAVQ 170

ZmGWD -----

PDGTTVYKNRALRTPFVKSGDNSTLRIEIDDPGVH 35

10 OsGWD

TSGSLILHWGALRPDRGEWLLPSRKPDPGTTVYKNRALRTPFIKSGDNSTLKIEIDDP  
AVQ 124

StGWD

GSDKLFLHWGAVKFGKETWSLPNDRPDGTVYKNKALRTPFVKSGSNSILRLEIR  
DTAIE 180

\*\*\*\*.\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\* \*\* \*..\*\* \* ..

SbGWD

AIEFLIFGETQNKWFKNNGQNFQIQLQSSRHQNGASGASSATSTLVPEDLVQIQ

15 AYLR 230

ZmGWD

AIEFLIFDETQNKWFKNNGQNFQVQFQSSRHQGTGASGASSATSTLVPEDLVQIQ  
AYLR 95

OsGWD AIEFLIFDEARNNWKNNQNFQIQLQASQYQGQGTSTATS---

STVVPEDLVQIQSYLR 181

StGWD AIEFLIYDEAHDKWIKNNGGNFRVKLSRKEIRGP-----

DVSVPEELVQIQSYLR 230

\*\*\*\*\*. \*...\* \*\*\*\*\* \*\*... ..\* .. \*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*

20

SbGWD

WERKKGQSYTPEQEKEEYEAARAELIEELNRGVSLEKLRAKLTKTPEAPESDERK  
SPASR 290

ZmGWD



LFTKSLHEKDGCEVLSRKLFKFGDKEILAISTKVQNKTEVHLATNHTEPLILHWSL

AKKA 468

ZmGWD

LFTKSLHEKDGCEVLSRKLFKFGDKEILAISTKVQNKTEVHLATNHTDPLILHWSL

AKNA 333

OsGWD

LFTKSLQEQDNCEVLSRKLFKFGDKEILGITVALGKTKVHLATNYMEPLILHWA

5 LSKEN 416

StGWD

LYAKEKEEQIDDPILNKKIFKVDDGELLVLVAKSSGKTKVHLATDLNQPITLHWA

LSKSP 466

\*..\* .\*. .\*. :\*. :\*. \* .\*. :. :\* .\*. :. :\* .\*. :\*

SbGWD GEWKAPPSNILPSGSKLLDMACETEFTRSELDGLC--

YQVVEIELDDGGYKGMFVLRSG 526

ZmGWD GEWKAPSPNILPSGSTLLDKACETEFTKSELDGLH--

10 YQVVEIELDDGGYKGMFVLRSG 391

OsGWD GEWQAPPSILPSGSSLLDKACETSFSSEYELNGLH--

CQVVEIELDDGGYKRMFVLRSG 474

StGWD

GEWMVPPSSILPPGSILDKAAETPFSASSDGLTSKVQSLDIVIEDGNFVGMFVLL

SG 526

\*\*\* .\*. :\*. :\*. \* .\*. :. :\* .\* .\*. :. :\* .\* .\* .\* .\*

SbGWD ETWIKNNGSDFFLDFSTRDTRNIK--

15 LKDNGDAGKGTAKALLERIAADLEEDAQRSLMHRF 584

ZmGWD

ETWIKNNGSDFFLDFSTHDVRNIKAILKDNGDAGKGTAKALLERIAADLEEDAQRSL

MHRF 451

OsGWD ETWMKNNGSDFYLDFTKVAKNTK----

DTGDAGKGTAKALLERIAADLEEDAQRSLMHRF 530

StGWD EKWIKNQGSDFYVGFSAASKLALK-----

AAGDGSHTAKSLLDKIADMESEAQKSFHRF 581

\* .\*. :\*. :\*. :\* .\* .\* .\* .\* .\* .\* .\* .\* .\* .\* .\* .\*

20

SbGWD

NIAADLADDEARDAGLLGIVGLFVWIRFMATRQLTWNKNYNVVKPREISKAQDRFT  
DDLENM 644

ZmGWD

NIAADPADQARDAGLLGIVGLFVWIRFMATRQLTWNKNYNVVKPREISKAQDRFT  
DDLENM 511

OsGWD

NIAADLVDQARDNGLLGIIGIFVWIRFMATRQLIWNKNYNVVKPREISKAQDRFTD

5 DLENM 590

StGWD

NIAADLIEDATSAGELGFAGILVWMRFMATRQLIWNKNYNVVKPREISKAQDRFTD  
LLQNA 641

\*\*\*\*\* ::\* \* \*\* :\*:\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\* \*:\*

SbGWD

YRTYPQYREILRMIMAAVGRGGEGDVGQRIRDEILVIQRNNDCKGGMMEEWHQ  
KLHNNTS 704

10 ZmGWD

YKTYYPQYREILRMIMAAVGRGGEGDVGQRIRDEILVIQRNNDCKGGMMEEWHQ  
KLHNNTS 571

OsGWD

YRTYPQYQEILRMIMSAVGRGGEGDVGQRIRDEILVIQRNNDCKGGMMEEWHQK  
LHNNTS 650

StGWD

FTSHPQYREILRMIMSTVGRGGEGDVGQRIRDEILVIQRNNDCKGGMMQEWHQK  
LHNNTS 701

15 :::\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

SbGWD

PDDVVICQALIDYIKNDFDISVYWDTLNKNGITKERLLSYDRAIHSEPNFRSEQKEG  
LLR 764

ZmGWD

PDDVVICQALIDYIKSDFDISVYWDTLNKNGITKERLLSYDRAIHSEPNFRSEQKAG  
LLR 631

20 LLR 631

OsGWD

PDDVVICQALLDYIKSDFDIGVYWDTLKKDGITKERLLSYDRPIHSEPNFRSEQKD  
GLLR 710

StGWD

PDDVICQALIDYIKSDFDLGVYWKTLNENGITKERLLSYDRAIHSEPNFRGDQKG  
GLLR 761

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*...\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*

SbGWD

DLGNYMRSKAVHSGADLESIAIATCMGYKSEGEGFMVGVQINPVKGLPSGFPEL  
LEFVLD 824

5 ZmGWD

DLGNYMRSKAVHSGADLESIAIASCMGYKSEGEGFMVGVQINPVKGLPSGFPELL  
EFVLE 691

OsGWD

DLGNYMRSKAVHSGADLESIAIATCMGYKSEGEGFMVGVQINPVKGLPSGFPEL  
LEFVLD 770

StGWD

DLGHYMRSLKAVHSGADLESIAIANCMGYKTEGEGFMVGVQINPVSGLPSGFQDL  
LHFVLD 821

10 \*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.

SbGWD

HVEDKSAEPLLEGLLEARVDLRPLLLDSPERMKDLIFLDIALDSTFRRTAIERSYEEL  
NDA 884

ZmGWD

HVEDKSAEPLPEGLLEARVELRPLLLDSRERMKDLIFLDIALDSTFRRTAIERSYEEL

15 NDA 751

OsGWD

HVEDKSAEPLLEGLLEARAELHPLLLGSPERMKDLIFLDIALDSTFRRTAVERSYEEL  
NNV 830

StGWD

HVEDKNVETLLERLLEAREELRPLLLKPNRLKDLLFLDIALDSTVRTAVERGYEE  
LNNA 881

\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.

20

SbGWD

APEKIMYFISLVLENLAFSIDDNEDILYCLKGWNQALEMAKQKDDQWALYAKAF  
LDRIRL 944

ZmGWD









Alineación de secuencias múltiples con CLUSTAL 2.1

SbPWD

MASLRPFDP SLAARPGPPPPARPAARRPVPAPPLAAPFASALIFPVRPRIPGRTRGT  
GVA 60

5 ZmPWD -----

AtPWD -----MESIGSHCCSSPFTFITRNSSSSLPRLVN--  
ITHRVNLSHQSHRLRNSNSRLT 51

SbPWD

ASTKHITRTKEEKQTDPSKQDIVRLHVCLDHQVMFGEHVGIIGSAKELGSWKSPV  
EMDWT 120

10 ZmPWD -----

AtPWD

RTATSSSTIEEQRKKKDGSGTKVRLNVRLDHQVNFQDHVAMFGSAKEIGSWKKK  
SPLNWS 111

SbPWD

PNGWVCQLDLPGETLLEFKFVFLNRGKDKIWEDGDNRVVNLPKNGSFDMACH  
WNKTKEP 180

15 ZmPWD -----

AtPWD ENGWVCELELDGGQVLECKFVIVKNDG-  
SLSWESGDNRVLKVNSGNFSVVCHWDATRET 170

SbPWD LNLLGTS-

EIKLSGDTEKEKDEDAKLSRNIALEEMGNISNAGDGLTPKLESSTLGGLWQ 239

20 ZmPWD -----

AtPWD LDLPQEVGNDDVGDGGHERDNHVDGDDR VVGSSENG-----  
AQLQKSTLGGQWQ 219

SbPWD

GSDTVFMRSNEHRN NESDRKWDMTGLDAVSLKLVGDKASRNWWRKLELVRG  
LVSEYVHD 299

25 ZmPWD -----

AtPWD









TTLAFANFSEELMVLNSGPTDGEMSRRTVDYSSKPLSV DATFREQFGQRLAAIGQ  
YLEQK 726

AtPWD

QTLAFANFSEELLVSGTGPADGKYVRLTVDYSSKRLTVDSVFRQQLGQRLGSGVGF  
FLERN 1170

\*\*\*\*\*:\*. \*\*.\*: \* \*\*\*\*\* \*.\*\*.\* \*.\*\*\* \*.\*\*\*

5 SbPWD FGSAQDVEGCLVGQDIFIVQSRPQP- 1212 (SEQ ID NO: 14)

ZmPWD FGSAQDVEGCLVGPDIIVQSRPQPQ 752 (SEQ ID NO: 15)

AtPWD FGCAQDVEGCLVGEDVYIVQSRPQPL 1196 (SEQ ID NO: 16)

\*\* \*\*\*\*\* \*..\*\*\*\*\*

10 Basándose en esta homología, fue posible identificar secuencias de genes (incluidas secuencias codificantes que no  
habían sido previamente anotadas en bases de datos públicas) que corresponden a las enzimas PWD de los genomas  
de las respectivas especies. Estas secuencias incluyen secuencias (codificantes) de ADNc de PWD supuestas de  
sorgo (SEQ ID NO: 17), maíz (SEQ ID NO: 18) y arroz (SEQ ID NO: 19) y los genes correspondientes de los cuales  
se transcriben los ARNm de PWD para PWD de sorgo (SEQ ID NO: 20) y maíz (SEQ ID NO: 21). Además, a partir de  
esta información, también se pueden inferir las secuencias de las regiones 5' no traducidas (UTR) y los promotores  
15 del gen PWD en sorgo (SEQ ID NO: 22), así como las 3' UTR de los respectivos genes PWD en sorgo (SEQ ID NO:  
23) y maíz (SEQ ID NO: 24). El gen SbPWD de 24,3 kb se encuentra en el cromosoma 4 de sorgo. La secuencia de  
proteína deducida de la SbPWD (1212AA) tiene una identidad de secuencia del 57 % en toda su longitud con respecto  
a la proteína PWD de 1196AA de Arabidopsis funcionalmente caracterizada (AY747068). Sin embargo, solo la parte  
C-terminal de la proteína SbPWD (374AA) tiene homología de secuencia con secuencias genómicas de maíz  
20 localizadas en el cromosoma 10. Esta secuencia de proteína parcial de ZmPWD de maíz tiene el 58 % de identidad  
de secuencia con AtPWD y el 93 % de identidad de secuencia con SbPWD. La alineación de secuencias de las  
secuencias compiladas para los últimos 13 exones de los genes SbPWD y ZmPWD demostró una identidad  
de secuencia del 95,2 % a nivel de nucleótidos entre las regiones codificantes. Sin embargo, cuando las secuencias  
25 genómicas enteras para esta parte de la PWD de maíz y sorgo están alineadas, solo está presente un 31 % de  
identidad de secuencia. Las diferencias en las secuencias intrónicas entre los dos genes podrían explicar esta  
situación. Por ejemplo, el intrón número 11 en SbPWD tiene 5,3 kb y el intrón número 13 tiene 0,8 kb, mientras que  
sus homólogos en ZmPWD tienen 17 kb y 5 kb de largo. La situación opuesta se encontró para el intrón número 16,  
que tiene 3,6 kb en SbPWD y solo 248 pb en ZmPWD. El análisis de secuencia de la 3' UTR de 252 pb de SbPWD y  
ZmPWD demostró una identidad de secuencia del 78 % interrumpida por numerosas interrupciones en la homología.

30 Se usó la alineación de secuencia con CLUSTAL de la siguiente manera para identificar las proteínas diana DSP  
candidatas de maíz (ZmDSP; SEQ ID NO: 25) y sorgo (SbDSP; SEQ ID NO: 26) basándose en su similitud con la  
proteína DSP conocida de Arabidopsis thaliana (AtDSP; SEQ ID NO: 27). De manera similar, fue posible identificar  
una proteína DSP de arroz candidata (OsDSP; SEQ ID NO: 28) entre las listas de proteínas hipotéticas de arroz.

Alineación de secuencias múltiples con CLUSTAL 2.1 ZmDSP, SbDSP y AtDSP

ZmDSP MNCLQNLLKE--PPIVGSRSRMR---PSPLNLMVVRGGSSRSNTVKT---

35 LQAPGASTSG 52

SbDSP MNCLQNLLKE--PPIVGSRSRMR---PSPLNLMVVRGGSSRSNTVKT---

LQAPGASTSG 52

AtDSP

MNCLQNLPRCSVSPLLGFQCIQRDHSSSSSLKMLISPPKANDPKSRLVLHAVSES

KSS 60

\*\*\*\*\*:\*. \*\*.\*: \* \*\*\*\*\* \*.\*\*.\* \*.\*\*\* \*.\*\*\*

ZmDSP



IKLATADILTGLSKNTITLKWEDDGSSSVEISGLDIGWGQRIPLTYDEERGAWFLEK

ELP 292

AtDSP

IRNATIDILTGLKRKTVTLTKDKGFSRVEISGLDIGWGQRIPLTDKGTGFWILKR

ELP 300

\*. \*\* \*\*\*\*\* ..\*.\*\* . \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* : \* :\*.\*\*\*

5 ZmDSP

EGRYEYKYVVDGKWLCNEHELITKPNADGHVNNYVQVSRDGTSDDEEKELRERLT

GPDPDL 352

SbDSP

EGRYEYKYIVDGKWLCNEHEMLTKPNADGHVNNYVQVSRDGTSDDEEKELRERL

TGPDPVL 352

AtDSP EGQFEYKYIIDGEWTHNEAEPFIGPNKDGHTNNYAKVVDDPTS-

VDGTTRELRSSDPEL 359

\*\*..\*\*\*..\*\*.\* \*\* \* : \*\* \*\*.\*\*\*.\* \* \*\* : \*\*\*\*\* \*\* \*

10

ZmDSP TDQERLMIREYLEQYADAAER 373 (SEQ ID NO: 25)

SbDSP TDEERLMIREYLEQYADAGER 373 (SEQ ID NO: 26)

AtDSP LEEERSKLIQFLETCEAEV- 379 (SEQ ID NO: 27)

..\*\* \* :..\*\* \*\* \*

15

Basándose en esta homología, fue posible identificar secuencias de genes (incluidas secuencias codificantes que no habían sido previamente anotadas en bases de datos públicas) que corresponden a las enzimas DSP de los genomas de las respectivas especies. Estas secuencias incluyen secuencias (codificantes) de ADNc de DSP supuestas de maíz (SEQ ID NO: 29), sorgo (SEQ ID NO: 30) y arroz (SEQ ID NO: 31), los genes correspondientes a partir de los cuales se transcriben los ARNm de DSP para DSP de maíz (SEQ ID NO: 32) y sorgo (SEQ ID NO: 33). Además, a partir de esta información, también se pueden inferir las secuencias de las regiones 5' no traducidas (UTR) y los promotores del gen DSP en maíz (SEQ ID NO: 34) y sorgo (SEQ ID NO: 35), así como las 3' UTR de los respectivos genes DSP en maíz (SEQ ID NO: 36) y sorgo (SEQ ID NO: 37). Los genes DSP de 5 kb y 6 kb se localizan en los cromosomas 1 de los genomas de sorgo y maíz, respectivamente. La estructura del gen DSP es muy similar tanto en maíz como en sorgo, conteniendo cada gen 14 exones de longitud idéntica y 13 intrones de tamaño ligeramente diferente. La alineación deducida de la secuencia de proteínas entre Arabidopsis, maíz y sorgo demuestran un 58,8 % de identidad, mientras que entre las proteínas SbDSP y ZmDSP hay una identidad de secuencia del 96,5 % a nivel de aminoácidos. La identidad de secuencia entre los exones compilados de los genes SbDSP y ZmDSP es del 95,5 %, mientras que cuando se incluyen los intrones, la identidad entre los dos genes se reduce al 65,3 %. Hay 50-60 % de identidad de secuencia en las regiones 5' /3' UTR. Ambas proteínas SbDSP y ZmDSP contienen el dominio DSPc (fosfatasa de especificidad dual, dominio catalítico) en 130-227AA con el sitio activo en el resto C190.

20

25

30

### Ejemplo 2. Supresión de la expresión, acumulación o actividad de las enzimas diana en plantas

Una vez que los genes que codifican cada una de las enzimas diana se han identificado en una especie dada, el siguiente objetivo era suprimir la expresión, acumulación o actividad de esa enzima en plantas.

35

Los genes diana se inhibieron usando una estrategia de interferencia con ARN. Un enfoque para la supresión génica a través de la interferencia con ARN era modificar una secuencia de microARN de origen natural de modo que sus secuencias de direccionamiento naturales se alteraran para que reconozcan una secuencia diana diferente y después expresar este microARN modificado de acuerdo con Wartmann et al. 2008.

40

Un ejemplo de microARN de origen natural de arroz se ilustra en la FIG. 3. Se introdujeron secuencias de nucleótidos de amiRNA1wmd3 de OsGWD (SEQ ID NO: 38) y osa-MIR809aM1 de OsGWD (SEQ ID NO: 39), como se muestran en la FIG. 3, que codifican microARN dirigidos a un ARN mensajero que codifica la proteína GWD de arroz en un

casete de expresión para la supresión de la expresión de una enzima diana.

Como alternativa, se suprimió la expresión de una enzima diana mediante la expresión de un ARN de horquilla diseñado adecuadamente ("ARNh") que incluye copias invertidas de una secuencia de ARN que es homóloga a una porción del ARNm, la 5' UTR, o la 3' UTR para una enzima diana, según Horiguchi 2004. Las secuencias homólogas al ARNm diana se denominan "secuencias iniciadoras". Las secuencias de ADN que codifican secuencias iniciadoras de ARN individuales que se usaron para crear ARNh incluyen OsDSP1 (SEQ ID NO: 40), OsDSP2 (SEQ ID NO: 41): OsGWD1 (SEQ ID NO: 42), OsGWD2 (SEQ ID NO: 43), OsPWD1 (SEQ ID NO: 44), OsPWD2 (SEQ ID NO: 45), SbGWD (SEQ ID NO: 46), SbGWD1 (SEQ ID NO: 47), SbGWD2 (SEQ ID NO: 48), ZmGWD1 (SEQ ID NO: 49) y ZmGWD2 (SEQ ID NO: 50).

La estrategia para expresar secuencias iniciadoras invertidas fue transcribirlas de manera que las copias invertidas estuvieran separadas por una secuencia espaciadora. Este espaciador en sí correspondía a un intrón. Intrones que se utilizaron incluyen el intrón de alcohol deshidrogenasa de *Zea mays* (ZmAdh1i6; SEQ ID NO: 51), el intrón de alcohol deshidrogenasa de *Oryza sativa* (OsAdh1i; SEQ ID NO: 52), el intrón de alcohol deshidrogenasa de *Sorgo bicolor* (SbAdh1-2i; SEQ ID NO: 53) y el intrón de glucoano agua dicinasa de *Sorgo bicolor* (SbGWDi; SEQ ID NO: 54). En un casete de expresión, para dirigir la transcripción del microARN o ARNh, se unió una secuencia iniciadora al promotor de ubiquitina de *Z. mays* (ZmUbi1P; SEQ ID NO: 55), al promotor de fosfoenolpiruvato carboxilasa de *Z. mays* (ZmPepCP; SEQ ID NO: 56) o al promotor de ubiquitina de *O. sativa* (OsUbi3P; SEQ ID NO: 57). Se usó na señal de poliadenilación (terminador NOS; SEQ ID NO: 58) terminador de la transcripción.

La FIG. 4 ilustra un casete de expresión único compuesto por un gen sintético que codifica uno de tales ARNh. Esta figura muestra el casete de expresión que incluye (1) un elemento promotor, (2) un conjunto de las secuencias iniciadoras (negro) colocadas en orientaciones opuestas de modo que el transcrito de ARN sea autocomplementario en estas regiones, (3) un intrón o un elemento espaciador y (4) un terminador de transcripción/señal de poliadenilación. Ejemplos de tales casetes de expresión incluyen SEQ ID NO: 59 [OsUbi3P: amiRNA1wmd3 de OsGWD], SEQ ID NO: 60 [OsUbi3P: osa-MIR809aM1 de OsGWD], SEQ ID NO: 61 [OsUbi3P: OsDSP1hpRNA], SEQ ID NO: 62 [OsUbi3P:ARNh de OsDSP2], SEQ ID NO: 63 [OsUbi3P:ARNh de OsGWD1], SEQ ID NO: 64 [OsUbi3P: ARNh de OsGWD2], SEQ ID NO: 65 [OsUbi3:ARNh de OsPWD1], SEQ ID NO: 66 [OsUbi3:ARNh de OsPWD2], SEQ ID NO: 67 [OsUbi3P:ARNi de SbGWD], SEQ ID NO: 68 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD1], SEQ ID NO: 69 [ZmPepCP:ARNi de SbGWD2], SEQ ID NO: 70 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1] y SEQ ID NO: 71 [ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2].

Puede unirse múltiples casetes para diferentes ARNh en una sola construcción para ser introducidos en plantas transgénicas de modo que dos ARNh se expresen simultáneamente. La FIG. 5 ilustra un ejemplo de tal una construcción. Esta figura muestra (1) el primer elemento promotor, (2) un primer conjunto de secuencias iniciadoras (negro) colocadas en orientaciones opuestas de modo que el transcrito de ARN será complementario en estas regiones, (3) un primer intrón o un elemento separador, (4) un primer terminador de transcripción/señal de poliadenilación, (5) un segundo elemento promotor; (6) un segundo conjunto de secuencias iniciadoras (negro), (7) un segundo intrón o un elemento espaciador y (8) un segundo terminador de transcripción/señal de poliadenilación.

Se proporcionan ejemplos de construcciones con múltiples casetes de expresión de ARNh como la SEQ ID NO: 72 [OsDSP1 y OsGWD2], SEQ ID NO: 73 [OsPWD2 y OsGWD 1] y SEQ ID NO: 74 [OsDSP2 y OsPWD1].

### Ejemplo 3. Vectores

Pueden proporcionarse secuencias de cualquier gen relacionado con la regulación del almidón en un vector intermedio de ARNi, un vector de transformación, o en una planta transgénica en la presente memoria.

#### Vector pAL409 de ARNi

Un ejemplo de un vector intermedio de ARNi es pAL409, que se ilustra en la FIG. 2. Tal como se muestra en la FIG. 2, las copias invertidas de segmentos de una región transcrita de un gen a ser dirigido pueden introducirse en pAL409 en el sitio AvrII 220 (posición 4507) y en el sitio BspEI 210 (posición 4519) y nuevamente en el sitio AgeI 295 (posición 566) y en el sitio NheI 290 (posición 620). Cuando se transcriben desde el promotor 230 de ubiquitina de arroz (P-OsUbi3), las copias invertidas de los segmentos (las secuencias iniciadoras) permiten que el ARN resultante forme una horquilla en la que el intrón 200 de OsUbi3 sirve como un espaciador entre los elementos repetidos. Una señal de poliadenilación 280 (3' NOS) sirve como terminador transcripcional. El casete de expresión completo (desde el promotor hasta el terminador) se puede extraer de este plásmido como un fragmento PacI-XmaI mediante digestión en el sitio PacI 240 (posición 3574) y en el sitio XmaI 270 (posición 911). pAL409 también incluye un ColEI, origen de replicación 260 de *E. coli*; y un marcador de resistencia a ampicilina bla 250. La secuencia de pAL409 se proporciona a continuación, pero la numeración y orientación de nucleótidos difiere de la representada en la FIG. 2. El experto en la materia será capaz de alinear la secuencia a continuación con el mapa vectorial de la FIG. 2 dados los puntos de referencia del vector. Se puede usar un vector de ARNi intermedio como pAL409 para introducir, copias invertidas en tándem de prácticamente cualquier secuencia iniciadora.

#### > secuencia de pAL409

ES 2 774 426 T3

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAG  
CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAG  
CCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTAT  
GCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC  
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTACAG  
GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC  
AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG  
GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTCGGGCGGTAA  
TAACTAATCGACTCTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTAATTCGGCTT  
GTCGACCACCAACCCCATATCGACAGAGGATGTGAAGAACAGGTAATCAC  
GCAGAAGAACCATCTCTGATAGCAGCTATCGATTAGAACAACGAATCCATAT  
TGGGTCCGTGGGAAATACTTACTGCACAGGAAGGGGGCGATCTGACGAGGCC  
CCGCCACCGCCTCGACCCGAGGCCGAGGCCGACGAAGCGCCGGCGAGTACG  
GCGCCGCGGGCGCCTCTGCCCGTGCCTCTGCGCGTGGGAGGGAGAGGCCGC  
GGTGGTGGGGGCGCGCGCGCGCGCGCAGCTGGTGGGGCGGCGCGGGGG  
TCAGCCGCCGAGCCGGCGGCGACGGAGGAGCAGGGCGGCGTGGACCGGAACT  
TCCGATCGGTTGGTCAGAGTGCGCGAGTTGGGCTTAGCCAATTAGGTCTCAAC  
AATCTATTGGGCCGTAATAATTCATGGGCCCTGGTTTGTCTAGGCCCAATATCC  
CGTTCATTCAGCCACAAATATTTCCCGAGAGGATTATTAAGGCCACACGC  
AGCTTATAGCAGATCAAGTACGATGTTTCTGATCGTTGGATCGGAAACGTAC  
GGTCTTGATCAGGCATGCCGACTTCGTCAAAGAGAGGCGGCATGACCTGACGC  
GGAGTTGGTTCGGGACCGTCTGGATGGTCGTACCGGGACCGGACACGTGTC  
GCGCCTCCAACATACATGGACACGTGTGGTGTGCCATTGGGCCGTACGCGTGG  
CGGTGACCGCACCGGATGCTGCCTCGCACCGCCTTGCCACGCTTTATATAGA  
GAGGTTTTCTCTCCATTAATCGCATAGCGAGTCGAATCGACCGAAGGGGAGGG  
GGAGCGAGAGCTTTGCGTCTCTAATCGCCTCGTCAAGCCTAGGTGTGTGCC  
GGAGTCAAGGTAACATAATCAATCACCTCGTCTAATCTCGAATCTCTCGTGG  
TGCCCGICTAATCTCGCGATTTGATGCTCGTGGTGGAAAGCGTAGGAGGATC  
CCGTGCGAGTTAGTCTCAATCTCTCAGGGTTTCGTGCGATTTTAGGGTGATCCA  
CCTCTTAATCGAGTTACGGTTTCGTGCGATTTTAGGGTAATCCTCTTAATCTCT  
CATTGATTTAGGGTTTCGTGAGAAATCGAGGTAGGGATCTGTGTTATTTATATCG  
ATCTAATAGATGGATTGGTTTTGAGATTGTTCTGTGATGGGGATTGTTTCGA  
TATATTACCCTAATGATGTGTCAGATGGGGATTGTTTCGATATATTACCCTAAT  
GATGTGTCAGATGGGGATTGTTTCGATATATTACCCTAATGATGGATAATAAG  
AGTAGTTCACAGTTATGTTTGTGATCCTGCCACATAGTTTGTGATTTTGTGATCAG  
ATTTAGTTTTACTTATTTGTGCTTAGTTCGGATGGGATTGTTCTGATATTGTCC  
AATAGATGAATAGCTCGTTAGGTTAAAATCTTTAGGTTGAGTTAGGCGACACA  
TAGTTTATTTCTCTGGATTTGGATTGGAATTGTGTTCTTAGTTTTTTTCCCCTG  
GATTTGGATTGGAATTGTGTGGAGCTGGGTTAGAGAATTACATCTGTATCGTG  
TACACCTACTTGAAGTGTAGAGCTTGGGTTCTAAGGTCAATTTAATCTGTATTG  
TATCTGGCTCTTTGCCTAGTTGAACTGTAGTGTGATGTTGTACTGTGTTTTTTT  
ACCCGTTTTATTGCTTTACTCGTGCAAATCAAATCTGTCAGATGCTAGAACTA  
GGTGGCTTTATTCTGTGTTCTTACATAGATCTGTTGCTCTGTAGTTACTTATGTC  
AGTTTTGTTATTATCTGAAGATATTTTGGTTGTTGCTTGTGATGTGGTGTGA  
GCTGTGAGCAGCGCTCTTATGATTAATGATGCTGTCCAATTGTAGTGTAGTAT  
GATGTGATTGATATGTTTCATCTATTTTGGAGCTGACAGTACCGATATCGTAGGAT  
CTGGTGCCAACCTATTCTCCAGCTGCTTTTTTTTACCTATGTTAATCCAATCCT

ES 2 774 426 T3

TTCTTGCCTCTTCCAGGGATCCACCGGTCCGATCGAGCTTACTGAAAAAATTA  
ACATCTCTTGCTAAGCTGGGAGCGCTAGCTCCCCGAATTTCCCCGATCGTTCA  
AACATTTGGCAATAAAGTTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATG  
ATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAA  
TGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGAATTATAC  
ATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTAT  
CGCGCGGGTGTTCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTGGCGAGCTCGCCCCGG  
CGGGCGAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTT  
ATCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC  
CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC  
CCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA  
CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCAC  
TGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTGCGTGTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT  
GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTG  
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTC  
AAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC  
CCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC  
CTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGT  
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA  
ACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC  
CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG  
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC  
TAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC  
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC  
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA  
AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGGA  
ACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC  
ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA  
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT  
CAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGA  
TAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG  
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG  
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA

TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC  
 AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATG  
 GCTTCATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCAT  
 GTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA  
 AGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA  
 CTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGT  
 CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATA  
 CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAA  
 ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT  
 CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCA  
 GCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAT  
 AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTG  
 AAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA  
 GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCT  
 GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTAT  
 CACGAGGCCCTTTCGTC [SEQ ID NO:185]

Las realizaciones en la presente memoria proporcionan vectores de ARNi intermedios que se replican a elevadas copias en *E. coli*, tienen baja complejidad y varios sitios de restricción convenientes. pAL409 tiene estas características. Los vectores con tales características serían útiles para ensamblar casetes de expresión de ARNi que después pueden transferirse a un vector de transformación de *Agrobacterium*.

#### Vectores de transformación

Un vector de transformación ejemplar, pAG2004 se ilustra en la FIG. 6. pAG2004 [SEQ ID NO: 186]. pAG2004 incluye un intrón 300 de ubiquitina de arroz (intrón de OsUbi3), un promotor 330 de ubiquitina de arroz (P-OsUbi3), un sitio PacI 340 (posición 155), un sitio XmaI 370 (posición 214), una señal de poliadenilación 3' NOS 380 y un origen de replicación ColE1 360 de *E. coli*. pAG2004 también incluye un gen 390 de fosfomanosa isomerasa (PMI, por sus siglas en inglés), un RB 391, un st AT 392 y un aadA 393. pAG2004 o vectores similares pueden transferirse desde *E. coli* a *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por transferencia por conjugación, durante la cual el plásmido se integrará en pSB1 (un plásmido Ti residente) mediante recombinación homóloga. El cultivo conjunto de la cepa de *Agrobacterium* recombinante resultante con células vegetales puede dar como resultado la transferencia del ADN derivado de pAG2004 al genoma de la planta. Las realizaciones en la presente memoria incluyen un vector de transformación que tiene cualquier secuencia iniciadora relacionada con dianas para la alteración del Almidón Verde. Las realizaciones en la presente memoria incluyen un vector de transformación que tiene un fragmento de pAL409 que incluye secuencias iniciadoras relacionadas con dianas para la alteración del Almidón Verde. Las realizaciones en la presente memoria incluyen un vector de transformación que tiene un fragmento PacI-XmaI de pAL409 que incluye secuencias iniciadoras relacionadas con dianas para la alteración del Almidón Verde en lugar del fragmento PacI-XmaI de pAG2004.

Los vectores de transformación de plantas se ensamblaron insertando los casetes de expresión o las construcciones descritas en la presente memoria, entre las secuencias de borde derecho e izquierdo de ADN-T de *Agrobacterium* de un plásmido adecuado tal como pAG2005 o pAG4003 descrito a continuación. Las siguientes son descripciones de varios pAG2005, pAG4003 y vectores plasmídicos recombinantes derivados que pueden usarse para generar plantas transgénicas a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*:

pAG2005 (SEQ ID NO: 75) es un plásmido que porta un marcador de resistencia a la espectinomicina, un origen de replicación bacteriano, un borde derecho (RB, por sus siglas en inglés) del ADN-T de *Agrobacterium* y un borde izquierdo (LB, por sus siglas en inglés) del ADN-T de *Agrobacterium*. Entre el RB y el LB hay un sitio multiclonal (MCS, por sus siglas en inglés) y un marcador seleccionable de planta compuesto por un promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P), la secuencia codificante de la fosfomanosa isomerasa y el terminador NOS; este plásmido también porta un promotor Ubi3 de arroz añadido (OsUbi3P) y un terminador NOS en el MCS, entre los que se pueden añadir secuencias codificantes adicionales, microARN o unidades de transcripción de ARNh.

pAG2107 es pAG2005 con un microARN amiRNA1wmd3 de OsGWD (SEQ ID NO: 38) entre el promotor de Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.

- pAG2108 es pAG2005 con un microARN osa-MIR809aM1 de OsGWD (SEQ ID NO: 39) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- pAG2109 es pAG2005 con un casete-1 de silenciamiento de ARNh de OsDSP1 (SEQ ID NO: 40) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- 5 pAG2110 es pAG2005 con un casete-1 de silenciamiento de ARNh de OsGWD1 (SEQ ID NO: 42) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- pAG2111 es pAG2005 con un casete-2 de silenciamiento de ARNh de OsGWD2 (SEQ ID NO: 43) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- 10 pAG2112 es pAG2005 con un casete-2 de silenciamiento de ARNh de OsPWD2 (SEQ ID NO: 45) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- pAG2113 es pAG2005 con un casete-2 de silenciamiento de ARNh de OsDSP2 (SEQ ID NO: 41) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- pAG2114 es pAG2005 con un casete-1 de silenciamiento de ARNh de OsPWD1 (SEQ ID NO: 44) entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS.
- 15 pAG2115 es pAG2111 con un casete-1 de silenciamiento de ARNh de OsDSP1 adicional; los casetes en tándem para la expresión de los ARNh de OsGWD2 y OsDSP1 se proporcionan como la SEQ ID NO: 72.
- pAG2116 es pAG2110 con un casete-2 de silenciamiento de ARNh de OsPWD2 adicional; los casetes en tándem para la expresión de los ARNh de OsGWD 1 y OsPWD2 se proporcionan como la SEQ ID NO: 73.
- 20 pAG2117 es pAG2114 con un casete-2 de silenciamiento de ARNh de OsDSP2 adicional; los casetes en tándem para la expresión de los ARNh de OsPWD1 y OsDSP2 se proporcionan como la SEQ ID NO: 74;
- pAG4003 (SEQ ID NO: 76) es un plásmido que porta un marcador de resistencia a la espectinomicina, un origen de replicación bacteriano, un borde derecho (RB) del ADN-T de Agrobacterium y un borde izquierdo (LB) del ADN-T de Agrobacterium. Entre el RB y el LB hay un sitio multiclonal (MCS) y un marcador seleccionable de plantas compuesto por un promotor de ubiquitina de maíz (ZmUbi1P), la secuencia codificante de la fosfomanosa isomerasa y el terminador NOS.
- 25 pAG4101 es pAG4003 con un ARNi de SbGWD entre el promotor Ubi3 de arroz (OsUbi3P) y el terminador NOS (SEQ ID NO: 67).
- pAG4102 es pAG4003 con un ARNi de ZmGWD 1 entre el promotor ZmPepC de maíz (ZmPepCP) y el terminador NOS (SEQ ID NO: 70).
- 30 pAG4103 es pAG4003 con un ARNi de ZmGWD2 entre el promotor ZmPepC de maíz y el terminador NOS (SEQ ID NO: 71).
- pAG4104 es pAG4003 con un ARNi de SbGWD1 entre el promotor ZmPepC de maíz y el terminador NOS (SEQ ID NO: 68).
- 35 pAG4105 es pAG4003 con un ARNi de SbGWD2 entre el promotor ZmPepC de maíz y el terminador NOS (SEQ ID NO: 69).

Secuencias de las proteínas diana, genes, elementos de los casetes de expresión y vectores utilizados en la presente memoria se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de Secuencias.

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
1	Proteína SbGWD	secuencia de aminoácidos de proteína hipotética del registro de Genbank XM_002438374
2	Proteína ZmGWD	secuencia de aminoácidos de la proteína diana GWD de maíz
3	Proteína OsGWD	secuencia de aminoácidos de la proteína diana GWD de arroz

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
4	Proteína StGWD	secuencia de aminoácidos de la proteína diana GWD de patata
5	secuencia codificante de SbGWD	secuencia de nucleótidos que codifica la proteína hipotética del registro de Genbank XM_002438374
6	secuencia codificante de ZmGWD	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica la proteína no anotada del registro GRMZM2G412611 de maizegdb.org
7	secuencia codificante de OsGWD	secuencia de nucleótidos que codifica la proteína diana GWD de arroz
8	Gen SbGWD	secuencia genómica que contiene la secuencia similar a GWD no anotada en plantgdb.org/SbGDB (37970015-37957888)
9	Gen ZmGWD	secuencia genómica que contiene la secuencia GRMZM2G412611 similar a GWD no anotada en maizegdb.org (110695290-110706982)
10	5'UTR y promotor del gen SbGWD	secuencia genómica cadena arriba de secuencia similar a GWD en plantgdb.org/SbGDB (37973102-37970016)
11	5'UTR y promotor del gen ZmGWD	secuencia genómica cadena arriba de la secuencia GRMZM2G412611 similar a GWD en maizegdb.org (110692290-110695289)
12	3'UTR del gen SbGWD	secuencia genómica cadena abajo de la secuencia similar a GWD en plantgdb.org/SbGDB (37957887-37956500)
13	3'UTR del gen ZmGWD	secuencia genómica cadena abajo de la secuencia GRMZM2G412611 similar a GWD en maizegdb.org (110706983-110708982)
14	Proteína SbPWD	secuencia de aminoácidos de la posible proteína diana PWD de sorgo
15	Proteína ZmPWD	secuencia parcial de aminoácidos de la posible proteína diana PWD de maíz
16	Proteína AtPWD	secuencia de aminoácidos de la proteína PWD funcionalmente caracterizada de Arabidopsis (registro de Genebank AY747068)
17	secuencia codificante de SbPWD	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica la proteína hipotética del registro de Genbank XM_002453614
18	secuencia codificante de ZmPWD	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica la proteína similar a PWD compilada de la secuencia genómica en el cromosoma 10 de maíz (20383422-20409795)
19	secuencia codificante de OsPWD	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica la proteína similar a PWD compilada a partir de la secuencia genómica de arroz
20	Gen SbPWD	secuencia genómica del gen SbPWD que contiene la secuencia similar a PWD no anotada en plantgdb.org/SbGDB (13092874-13068592)

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
21	Gen ZmPWD	secuencia genómica del gen ZmPWD que contiene la secuencia parcial similar a PWD no anotada en maizgdb.org (20383406-20409795)
22	5'UTR y promotor del gen SbPWD	secuencia genómica de 5'UTR y promotor del gen SbPWD cadena arriba de la secuencia similar a PWD en plantgdb.org/SbGDB (13095874-13092875)
23	3'UTR del gen SbPWD	secuencia genómica de la 3'UTR del gen SbPWD cadena abajo de la secuencia similar a PWD en plantgdb.org/SbGDB (13068591-13066592)
24	3'UTR del gen ZmPWD	secuencia genómica de la 3'UTR del gen ZmPWD cadena abajo de la secuencia similar a PWD en maizgdb.org (20409796-20411795)
25	Proteína ZmDSP	Secuencia de aminoácidos de la supuesta proteína ZmDSP de la proteína diana de maíz
26	Proteína SbDSP	Secuencia de aminoácidos de la supuesta proteína SbDSP de la proteína diana de sorgo
27	Proteína AtDSP	secuencia de aminoácidos de la proteína AtDSP de la proteína DSP caracterizada funcionalmente de Arabidopsis (registro de Genebank Q9FEB5)
28	Proteína OsDSP	supuesta proteína tirosina fosfatasa OsDSP de arroz, registro de Genebank ABF93554.1
29	secuencia codificante de ZmDSP	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica la proteína no caracterizada LOC 100216768 del registro de Genbank NM_001143167
30	secuencia codificante de SbDSP	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica una secuencia similar a DSP no anotada en plantgdb.org/SbGDB (73074312-73079318)
31	secuencia codificante de OsDSP	secuencia de nucleótidos (ADNc) que codifica la proteína similar a DSP compilada a partir de la secuencia genómica del arroz
32	Gen ZmDSP	Secuencia genómica del gen ZmDSP en maizgdb.org (2544510-2538556) que contiene la proteína no caracterizada LOC 100216768 del registro de Genbank NM_001143167
33	Gen SbDSP	secuencia genómica del gen SbDSP que contiene la secuencia similar a DSP no anotada en plantgdb.org/SbGDB (73074312-73079318)
34	5'UTR y promotor del gen ZmDSP	secuencia genómica de 5'UTR y promotor del gen ZmDSP en maizgdb.org (2538555-2536556) cadena arriba de la proteína LOC100216768 no caracterizada del registro de Genbank NM_001143167
35	5'UTR y promotor del gen SbDSP	secuencia genómica de 5'UTR y promotor del gen SbDSP cadena arriba de la secuencia similar a DSP no anotada en plantgdb.org/SbGDB (73071312-73074311)

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
36	3'UTR del gen ZmDSP	secuencia genómica de la 3'UTR del gen ZmDSP en maizegdb.org (2538555- 2536556) cadena abajo de la proteína LOC100216768 no caracterizada del registro de Genbank NM_001143167
37	3'UTR del gen SbDSP	secuencia genómica de la 3'UTR del gen SbDSP cadena abajo de la secuencia similar a DSP no anotada en plantgdb.org/SbGDB (73079319-73081318)
38	amiRNA 1 wmd3 de OsGWD	secuencia de ADN que codifica el microARN amiRNA1wmd3 de OsGWD
39	osa-MIR809aM1 de OsGWD	secuencia de ADN que codifica el microARN osa-MIR809aM1 de OsGWD
40	OsDSP1	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de OsDSP1
41	OsDSP2	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de OsDSP2
42	OsGWD1	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de OsGWD1
43	OsGWD2	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de OsGWD2
44	OsPWD1	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de OsPWD1
45	OsPWD2	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de OsPWD2
46	SbGWD	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de SbGWD
47	SbGWD1	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de SbGWD1
48	SbGWD2	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de SbGWD2
49	ZmGWD1	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de ZmGWD1
50	ZmGWD2	secuencia iniciadora de ARN de horquilla de ZmGWD2
51	ZmAdh1i6	secuencia de ADN correspondiente al intrón ZmAdh1i6
52	OsAdh1i	secuencia de ADN correspondiente al intrón OsAdh1
53	SbAdh1-2i	secuencia de ADN correspondiente al intrón SbAdh1-2i
54	SbGWDi	secuencia de ADN correspondiente al intrón SbGWDi
55	ZmUbi1P	promotor Ubi1 de maíz con intrón
56	ZmPepCP	promotor ZmPepC
57	OsUbi3P	promotor Ubi3 de arroz con intrón

ES 2 774 426 T3

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
58	terminador NOS	terminador transcripcional NOS y señal de poliadenilación
59	OsUbi3P:amiRNA1wmd3 de OsGWD	OsUbi3P:casete de expresión de amiRNA1wmd3 de OsGWD para un micro ARN
60	OsUbi3P:osa-MIR809aM1 de OsGWD	OsUbi3P:casete de expresión de osa-MIR809aM1 de OsGWD para un micro ARN
61	OsUbi3P:ARNh de OsDSP1	OsUbi3P:casete de expresión del ARNh de OsDSP1 para un ARN de horquilla
62	OsUbi3P:ARNh de OsDSP2	OsUbi3P:casete de expresión del ARNh de OsDSP2 para un ARN de horquilla
63	OsUbi3P:ARNh de OsGWD1	OsUbi3P:casete de expresión del ARNh de OsGWD1 para un ARN de horquilla
64	OsUbi3P:ARNh de OsGWD2	OsUbi3P:casete de expresión del ARNh de OsGWD2 para un ARN de horquilla
65	OsUbi3P:ARNh de OsPWD1	OsUbi3P:casete de expresión del ARNh de OsPWD1 para un ARN de horquilla
66	OsUbi3P:ARNh de OsPWD2	OsUbi3P:casete de expresión del ARNh de OsPWD2 para un ARN de horquilla
67	OsUbi3P:ARNi de SbGWD	OsUbi3P:casete de expresión del ARNi de SbGWD para un ARN de horquilla
68	ZmPepCP:ARNi de SbGWD1	ZmPepCP:casete de expresión del ARNi de SbGWD1 para un ARN de horquilla
69	ZmPepCP:ARNi de SbGWD2	ZmPepCP:casete de expresión del ARNi de SbGWD2 para un ARN de horquilla
70	ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1	ZmPepCP:casete de expresión del ARNi de ZmGWD1 para un ARN de horquilla
71	ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2	ZmPepCP:casete de expresión del ARNi de ZmGWD2 para un ARN de horquilla
72	OsDSP1 y OsGWD2	construcción de OsDSP1 y OsGWD2 que contiene dos casetes de expresión de ARNh
73	OsPWD2 y OsGWD1	construcción de OsPWD2 y OsGWD1 que contiene dos casetes de expresión de ARNh
74	OsDSP2 y OsPWD1	construcción de OsDSP2 y OsPWD1 que contiene dos casetes de expresión de ARNh
75	pAG2005	vector de transformación pAG2005 con marcador seleccionable de plantas de fosfomanosa isomerasa
76	pAG4003	vector de transformación pAG4003 con marcador seleccionable de plantas de fosfomanosa isomerasa
77	proteína O43097	secuencia de aminoácidos de la enzima O43097
78	proteína BD22308	secuencia de aminoácidos de la enzima BD22308
79	proteína BD25243	secuencia de aminoácidos de la enzima BD25243
80	proteína EU591743	secuencia de aminoácidos de la enzima EU591743

ES 2 774 426 T3

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
81	proteína NtEGm	secuencia de aminoácidos de la enzima NtEGm
82	proteína P0C2S1	secuencia de aminoácidos de la enzima P0C2S1
83	proteína P77853	secuencia de aminoácidos de la enzima P77853
84	proteína O68438	secuencia de aminoácidos de la enzima O68438
85	proteína O33897	secuencia de aminoácidos de la enzima O33897
86	secuencia codificante de O43097	secuencia codificante de la enzima O43097
87	secuencia codificante de BD22308	secuencia codificante de la enzima BD22308
88	secuencia codificante de BD25243	secuencia codificante de la enzima BD25243
89	secuencia codificante de EU591743	secuencia codificante de la enzima EU591743
90	secuencia codificante NtEGm	secuencia codificante de la enzima NtEGm
91	secuencia codificante de P0C2S1	secuencia codificante de la enzima P0C2S1
92	secuencia codificante de P77853	secuencia codificante de la enzima P77853
93	secuencia codificante de O68438	secuencia codificante de la enzima O68438
94	secuencia codificante de O33897	secuencia codificante de la enzima O33897
95	polipéptido de inteína AS 146-7	secuencia de aminoácidos de inteína AS146-7
96	polipéptido de inteína S158-30-108-35	secuencia de aminoácidos de inteína S158-30-108-35
97	polipéptido de inteína T134-100-101	secuencia de aminoácidos de inteína T134-100-101
98	secuencia codificante AS 146-7	secuencia de ADN AS 146-7 que codifica una inteína
99	secuencia codificante de S158-30-108-35	secuencia de ADN S158-30-108-35 que codifica una inteína
100	secuencia codificante de T134-100-101	secuencia de ADN T134-100-101 que codifica una inteína
101	EU591743:enzima modificada con inteína AS146-7	EU591743: secuencia de aminoácidos de la enzima modificada con inteína AS146-7
102	P77853:enzima modificada con inteína S158-30-108-35	P77853: secuencia de aminoácidos de la enzima modificada con inteína S158-30-108-35
103	P77853:enzima modificada con inteína T134-100-101	P77853: secuencia de aminoácidos de la enzima modificada con inteína T134-100-101
104	EU591743:secuencia codificante de AS146-7	EU591743:secuencia codificante de la enzima modificada con inteína AS146-7
105	P77853:secuencia codificante de S158-30-108-35	P77853:secuencia codificante de la enzima modificada con inteína S158-30-108-35
106	P77853:secuencia codificante de T134-100-101	P77853:secuencia codificante de la enzima modificada con inteína T134-100-101
107	péptido señal BAASS	señal BAASS de direccionamiento de proteínas
108	péptido señal SEKDEL	secuencia de aminoácidos de la señal SEKDEL de direccionamiento de proteínas

ES 2 774 426 T3

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
109	señal de direccionamiento xHvVSD	secuencia de aminoácidos de la señal xHvVSD de direccionamiento de proteínas
110	fusión traduccional ZmUBQm	secuencia de aminoácidos de la fusión traduccional ZmUBQm
111	xGZein27ss	secuencia de aminoácidos de la señal xGZein27ss de direccionamiento de proteínas
112	señal HvAle	secuencia de aminoácidos de la señal HvAle de direccionamiento de proteínas
113	secuencia codificante de BAASS	secuencia de ADN de BAASS que codifica una señal de direccionamiento de proteínas
114	secuencia codificante de SEKDEL	secuencia de ADN de SEKDEL que codifica una señal de direccionamiento de proteínas
115	secuencia codificante de xHvVSD	secuencia de ADN de xHvVSD que codifica una señal de direccionamiento de proteínas
116	secuencia codificante de ZmUBQm	secuencia de ADN de ZmUBQm que codifica una fusión traduccional
117	secuencia codificante de xGZein27ss	secuencia de ADN de xGZein27ss que codifica una señal de direccionamiento de proteínas
118	secuencia codificante HvAle	secuencia de ADN de HvAle que codifica una señal de direccionamiento de proteínas
119	ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD	expresión de ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD para un casete para una enzima
120	ZmPepCP:xGZein27ss:BD25243:SEKDEL	casete de expresión de ZmPepCP:xGZein27ss:BD25243:SEKDEL para una enzima
121	OsUbi3P:EU591743	casete de expresión de OsUbi3P:EU591743 para una enzima
122	ZmUbi1P:EU591743:AS146-7:SEKDEL	casete de expresión de ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL para una enzima modificada con inteína
123	ZmUbi1P:HvAle:NtEGm:SEKDEL	casete de expresión de ZmUbi1P:HvAle:NtEGm:SEKDEL para una enzima
124	ZmPepCP:HvAle:NtEGm:SEKDEL	casete de expresión de ZmPepCP:HvAle:NtEGm:SEKDEL para una enzima
125	OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL	casete de expresión de OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL para una enzima
126	OsUbi3P:BAASS:O33897	casete de expresión de OsUbi3P:BAASS:O33897 para una enzima
127	ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL	casete de expresión de ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL para una enzima
128	OsUbi3P:O68438	casete de expresión de OsUbi3P:O68438 para una enzima

ES 2 774 426 T3

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
129	OsUbi3P:P0C2S1	casete de expresión de OsUbi3P:P0C2S1 para una enzima
130	ZmUbi1P: P77853:S158-30-108-35 ZmUBQm:BAASS:	casete de expresión ZmUbi1P: ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35 para una enzima modificada con inteína
131	ZmUbi1P:BAASS:P 77853:T134-100-101:SEKDEL	casete de expresión de ZmUbi1P:BAASS:P77853:T134-100-101:SEKDEL para una enzima modificada con inteína
132	2379	construcción 2379 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
133	2380	construcción 2380 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
134	4106	construcción 4106 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
135	4107	construcción 4107 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
136	4108	construcción 4108 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
137	4109	construcción 4109 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
138	4110	construcción 4110 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
139	4111	construcción 4111 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
140	4112	construcción 4112 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
141	4113	construcción 4113 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
142	4114	construcción 4114 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
143	4115	construcción 4115 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
144	4116	construcción 4116 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
145	4117	construcción 4117 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
146	4120	construcción 4120 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
147	4121	construcción 4121 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
148	4124	construcción 4124 que contiene casetes de expresión para dos CWDE y un ARNh
149	4125	construcción 4125 que contiene casetes de expresión para dos CWDE y un ARNh

ES 2 774 426 T3

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
150	4514	construcción 4514 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
151	4515	construcción 4515 que contiene casetes de expresión para tres CWDE y un ARNh
152	Construcción sintética, Sitio de empalme de intrones de ZmGWD1	Ácido nucleico del sitio de empalme de intrones de ZmGWD1
153	Construcción sintética, cebador directo de GWD	ob1659, ácido nucleico de cebador directo
154	Construcción sintética, cebador inverso de GWD	ob1660, ácido nucleico de cebador inverso
155	Construcción sintética, cebador directo de beta-actina	ob1555, ácido nucleico de cebador directo
156	Construcción sintética, cebador inverso de beta-actina	ob1556, ácido nucleico de cebador inverso
157	Construcción sintética, cebador directo de GADPH	ob1567, ácido nucleico de cebador directo
158	Construcción sintética, cebador inverso de GADPH	ob1568, ácido nucleico de cebador inverso
159	osa-MIR528	Secuencia de ARN de osa-MIR528 incluida en la FIG.1
160	Proteína amilasa 19862	Secuencia de aminoácidos de la amilasa 19862
161	Proteína Glucoamilasa 20082	Secuencia de aminoácidos de glucoamilasa 20082
162	Proteína Glucoamilasa 20707	Secuencia de aminoácidos de glucoamilasa 20707
163	Proteína amilasa 21853	Secuencia de aminoácidos de la amilasa 21853
164	Secuencia codificante de amilasa 19862	Secuencia codificante de amilasa 19862
165	Secuencia codificante de glucoamilasa 20082	Secuencia codificante de glucoamilasa 20082
166	Secuencia codificante de glucoamilasa 20707	Secuencia codificante de glucoamilasa 20707
167	Secuencia codificante de amilasa 21853	Secuencia codificante de amilasa 21853
168	Secuencia codificante AmyS	Secuencia codificante de amilasa AmyS
169	Proteína AmyS	Secuencia de aminoácidos de amilasa AmyS
170	secuencia codificante de G1aA	secuencia codificante de G1aA
171	proteína G1aA	Secuencia de aminoácidos de G1aA
172	Un complemento invertido de OsDSP1	Una secuencia complementaria a OsDSP1 (SEQ IDNO: 40) con un orden inverso de nucleótidos
173	Os06 g30310 del gen GWD	Secuencia genómica Os06 g30310 del gen GWD
174	Os03 g01750 del gen DSP	secuencia genómica Os03 g01750 del gen DSP
175	Os09 g29404 del gen ISA3	secuencia genómica Os09 g29404 del gen ISA3

ES 2 774 426 T3

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
176	Secuencia codificante-1 de GWD	secuencia de nucleótidos que codifica la proteína diana GWD de arroz [similar a la SEQ ID NO: 7 más 147 nucleótidos adicionales en el extremo 5' y 12 nucleótidos adicionales en el extremo 3']
177	Secuencia codificante-1 de DSP	secuencia codificante de DSP de arroz [similar a la SEQ ID NO: 31 más 18 nucleótidos adicionales en el extremo 5' y 12 nucleótidos adicionales en el extremo 3']
178	secuencia codificante de ISA3	secuencia codificante de ISA3
179	Construcción sintética, Secuencia iniciadora de GWD1	Secuencia iniciadora de GWD1
180	Construcción sintética, Secuencia iniciadora de GWD2	Secuencia iniciadora de GWD2
181	Porción de GWD2 en la Fig. 4	Porción de GWD2 en la Fig. 4
182	Porción del gen GWD de S. lyco. en la Fig. 4	Porción del gen GWD de S. lyco. en la Fig. 4
183	Secuencia iniciadora de DSP1	Secuencia iniciadora de DSP1
184	Secuencia iniciadora de ISA3	Secuencia iniciadora de ISA3
185	Construcción sintética, pAL409	pAL409
186	Construcción sintética, pAG2004	pAG2004
187	Construcción sintética, pAG2100	pAG2100
188	Construcción sintética, pAG2101	pAG2101
189	Construcción sintética, pAG2102	pAG2102
190	Construcción sintética, pAG2103	pAG2103
191	gen-1 de GWD de Sorghum bicolor	Supuesto gen de GWD de Sorghum bicolor
192	Porción del supuesto gen GWD de Sorghum bicolor	Porción del supuesto gen GWD de Sorghum bicolor correspondiente a la región GWD2 del gen de arroz
193	Construcción sintética, sbGWDk02a	sbGWDk02a
194	Construcción sintética, sbGWDk2b	sbGWDk2b
195	Construcción sintética, pAG2106	pAG2106
196	Fragmento 1 de OsGWD	Fragmento 1 de OsGWD
197	Fragmento 1 de sbGWD	Fragmento 1 de sbGWD
198	Fragmento de ZmGWD 1, n, es cualquier nucleótido	Fragmento 1 de ZmGWD
199	Fragmento 1 de S1GWD	Fragmento 1 de S1GWD
200	Fragmento 2 de OsGWD	Fragmento 2 de OsGWD
201	Fragmento 2 de SbGWD	Fragmento 2 de SbGWD
202	Fragmento 2 de ZmGWD	Fragmento 2 de ZmGWD
203	Fragmento 2 de S1GWD	Fragmento 2 de S1GWD

(continuación)

Las SEQ ID NO	Nombre de la Secuencia	Descripción de la Secuencia
204	Construcción sintética, dgGWDup2 (Cebador de PCR)	dgGWDup2 (Cebador de PCR)
205	Construcción sintética, dgGWD down 2 (Cebador de PCR)	dgGWD down 2 (Cebador de PCR)
206	PvGWD-2	PvGWD-2
207	PvGWD-5	PvGWD-5
208	PvGWD-1	PvGWD-1
209	Construcción sintética, Secuencia iniciadora del ARNi de PvGWDko2	Secuencia iniciadora del ARNi de PvGWDko2
210	Construcción sintética, pAG2104	pAG2104
211	PvGWDi-1	PvGWDi-1
212	PvGWDi-2	PvGWDi-2
213	PvGWDi-3	PvGWDi-3
214	PvGWDi-4	PvGWDi-4
215	Secuencia fusionada de mijo; n, es cualquier nucleótido	Secuencia fusionada de mijo
216	Secuencia sintética, secuencia flanqueante no codificante de sbGWDko2a	Secuencia sintética, secuencia flanqueante no codificante de sbGWDko2a
217	Secuencia sintética, antisentido de sbGWDko2b	Secuencia sintética, antisentido de sbGWDko2b
218	Secuencia sintética, pAL409jSbGWDko2	Secuencia sintética, pAL409jSbGWDko2
219	Construcción sintética, 4206	Construcción 4206 que contiene casetes de expresión para tres CWDE

#### Ejemplo 4. Construcciones de ARNi de arroz

5 Tres genes ejemplares que se dirigen a la interferencia de ARN en el arroz son GWD, DSP e ISA3. Las SEQ ID NOS: 173 [os06 g30310 del gen GWD] - 175 [os09 g29404 del gen ISA3] enumeran las secuencias para los genes GWD, DSP e ISA3 de arroz, respectivamente. Las SEQ ID NOS: 176 [secuencia codificante de GWD] - 178 [secuencia codificante de ISA3] enumeran las secuencias codificantes previstas para los genes GWD, DSP e ISA3, respectivamente. Las secuencias de los genes GWD, DSP e ISA3 son de la base de datos RiceGE: números de registro Os06 g30310 (GWD); Os03 g01750 (DSP); y Os09 g29404 (ISA3).

10 Basándose en las secuencias codificantes en las SEQ ID NO: 176 [secuencia codificante de GWD] - 178 [secuencia codificante de ISA3], se sintetizaron ADNc artificiales y proporcionaron un recurso para expresar las proteínas correspondientes en sistemas heterólogos (p. ej., E. coli o levaduras), lo que a su vez permitiría generar anticuerpos para su uso en el análisis de las plantas transgénicas deseadas.

15 Los ADN plasmídicos que portan las secuencias codificantes completas de las SEQ ID NOS: 176 [secuencia codificante de GWD] - 178 [secuencia codificante de ISA3] se usaron como plantillas en las reacciones de PCR para preparar secuencias iniciadoras para su uso en las construcciones de ARNi. Para el gen GWD, se prepararon dos secuencias iniciadoras separadas.

> Secuencia iniciadora GWD1 (una copia)

TAGCGCTAAGGAAGGGAGAGATATCCATCCGGATCCCGGAAGCCGAAT  
 CCATCCATCCATCCATCCCATACTGCCCTTACGATCGAGCTGTTTGATA  
 TTCGTGCAGATGAGCGGATTCTCCGCGGCAGCTGCTGCGGCCGAGCGC  
 TTGTCCGGAAGGTTACCCCTGGATGCCAACTCCGAGCTTAAGGTGACATT  
 GAACCCAGCACCGCAGGGTTCGGTGGTGGAGATCAATCTAGAGGCAAC  
 TAACACCAGCGGCTCCCTGATACTGCATTGGGGCGCCCTTCGCCCCGGAT  
 AGAGGAGAATGGCTCCTACCAT [SEQ ID NO: 179]

> Secuencia iniciadora GWD2 (una copia)

AGCAGATCTAGTTGACCAAGCAAGAGATAATGGATTATTGGGTATTAT  
 TGAATTTTTGTTTGGATTAGGTTTCATGGCTACAAGGCAACTAATATGG  
 AACAGAAGCAACTACAATGTGAAGCCACGTGAGATAAGCAAAGCACAAGA  
 TAGGTTTACAGATGATCTTGAGAATATGTACAGAACTTACCCACAATAT  
 CAGGAGATCTTAAGAATGATAATGTCTGCTGTTGGTCGGGGAGGTGAA  
 GGTGATGTTGGTCAACGCATTTCGTGATGAGATATTAGTAATCCAGAGA  
 AATAATGACTGCAAAGGTGGAATGATGGAGGAGTGGCACCAGAAACT  
 GCACAACAATACAAGCCCAGATGATGTAGTGATCTGCCAGGCCCTACT  
 TGATTATATCAAGAGTGATTTTATGATTTGGTGTACTGGGACACCTTG  
 AAAAAAGATGGTATAACAAAAGAGCGTCTATTGAGCTATGATCGACCG  
 ATTCATTAGAGCCAAATTCAGGAGTGAACAGAAAGATGGCTTACTC  
 CGTGACTTGGGCAATTATATGAGAAGCCTCAAGATGGAGGGTACCC  
 [SEQ ID NO: 180]

5 GWD1 deriva de una región cerca del extremo 5' de la secuencia codificante de GWD. La segunda secuencia iniciadora  
 de GWD, GWD2 deriva de una región más cercana a la mitad de la secuencia codificante de GWD, que corresponde  
 a una región de conservación de secuencia relativamente más alta entre los genes GWD de especies divergentes.  
 Véase la FIG. 7, que ilustra una comparación entre GWD2, derivada del gen de la glucano agua dicinasa de arroz y  
 del gen GWD del tomate (*Solanum lycopersicon*). Inesperadamente, El análisis BLAST [Zhang Z, Schwartz S, Wagner  
 L y Miller W, A greedy algorithm for aligning DNA sequences (2000) J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14] de estas dos  
 10 secuencias revela una extensa homología, a pesar de la distancia filogenética que separa estas dos especies (el arroz  
 es una monocotiledónea, mientras que el tomate es una dicotiledónea). Esto sugiere que esta porción del gen GWD  
 serviría como una diana ampliamente aplicable para la interferencia con ARN. En la FIG. 7, la Consulta (secuencia  
 superior) es una porción de la secuencia iniciadora de GWD2 de arroz [SEQ ID NO: 181; y la Objeto (secuencia  
 inferior) es la secuencia de ADNc de GWD de tomate [SEQ ID NO: 182]. Debido a la homología de secuencia en esta  
 15 región, es posible que una construcción de ARNi dirigida contra esta región en el gen del arroz también pueda ser útil  
 para suprimir la expresión de genes GWD homólogos en otras especies de plantas. Las realizaciones incluyen  
 métodos, vectores y plantas transgénicas que incluyen secuencias para ARNi dirigidas a GWD.

También se seleccionaron porciones de los genes DSP e ISA3 del arroz para servir como secuencias iniciadoras.

> Secuencia iniciadora DSP1

CTCCAATCGTGGGATCCAGGTCCATGAGGCGGCCCTCGCCGCTCAATCT  
 GACGATGGTTCGTGGCGGGAGTCGCCGATCAAACACTGTCAAACCCGC  
 ATCCGGGGCGTCTACTTCTAGCGCCGAGAGTGCCGCAGTGGAGGCGGG  
 CACGGAGAAATCCGATACGTACAGCACCAACATGACGCAAGCTATGGG  
 AGCAGTGTTGACGTATAGACATGAGCTTGAATGAACTACAATTTTCAT  
 ACGCCAGACTTGATCGTGGGCTCCTGCTTACAGAGCCCACCTTGATGTT  
 GATAAACTTAGGGACATTGGTGTA AAAACAGTATTCTGCCTGCAGCAA  
 GATCCAGACCTTGAATATTTTGGAGTTGACATCTGTGCCATT [SEQ ID  
 NO: 183]

> Secuencia iniciadora ISA3

CTAGCGAATACTGAACTGCAACCATCCTGTTGTCAAGGAGCTCATTC  
 TTGACAGCTTGAGACACTGGGTTGAGGAGTATCACATAGATGGATTTC  
 GATTTGACCTTGCAAGTGTCTTTTGTCTGGACCAGATGGTTGTCTCTT  
 GATGCACCTCCACTCATCAAGGAAATTGCCAAAGATGCTGTATTATCTA  
 GATGTAAGATCATTGCTGAACCTTGGGATTGCGGCGGCCTTTATCTCGT  
 AGGGCGTTTCCCTAACTGGGACAGGTGGGCTGAATGGAACGGCAAATA  
 CAGAGATGATCTTCGAAGATTTATTAAGGGTGACCCTGGTATGAAGGG  
 GGTGTTTGC GACTCGTGTGTCTGGATCTGCTGATCTCTATCAGGTGAAC  
 GAGCGGAAGCCTTACCATGGTGTA AATTTTGTGATTGCACATGATGGAT  
 TTACTTTATGTGACCTTGTCTTACA ACTTAAAGCACAATGATGCTAAT  
 GGAGAAGGTGGCTGTGATGGATC [SEQ ID NO: 184]

5 Las secuencias iniciadoras GWD1, GWD2, DSP1 e ISA3 se amplificaron cada una por PCR de modo que cada una estaba flanqueada por sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (p. ej., NheI y XmaI). Los fragmentos se unieron primero en pCRBlunt II TOPO (Invitrogen), confirmado mediante múltiples productos de digestión de enzimas de restricción y secuenciación, después se cortaron (usando enzimas de restricción que escinden los sitios flanqueantes introducidos) y se unieron primero a los sitios BspEI y AvrII y después a los sitios NheI y AgeI de pAL409 (Figura 2), que colocaron las dos copias en orientaciones opuestas. Los casetes de ARNi resultantes se cortaron de los derivados de pAL409 como fragmentos PacI-XmaI y se unieron a pAG2004 (figura 6), dando como resultado los plásmidos pAG2100, pAG2102 e pAG2103. La FIG. 6 muestra casetes de ARNi dirigidos a genes GWD, DSP e ISA3 de arroz, donde los dos segmentos superiores derivan del gen GWD, el medio de DSP y el inferior de los genes ISA3. Cada uno de los elementos iniciadores se representa como copias invertidas duplicadas separadas y próximas al intrón de OsUbi3. A la izquierda se enumeran los nombres de las construcciones que se ensamblaron en el plásmido pAL409. A la derecha se enumeran los nombres de los plásmidos que resultaron cuando los casetes de ARNi se cortaron de pAL409 como fragmentos PacI-XmaI y se insertaron en pAG2004.

20 Todavía en referencia a la FIG. 6, la construcción pAL409-GWDko1 incluye el promotor 331 de P-OsUbi, secuencia iniciadora 310 de GWD1, intrón OsUbi 301, secuencia iniciadora 311 de GWD1 invertida y secuencia de poliadenilación 381 3' NOS. La construcción pAL409-GWDko2 incluye el promotor 332 de P-OsUbi, secuencia iniciadora 312 de GWD2, intrón OsUbi 302, secuencia iniciadora 313 de GWD2 invertida y secuencia de poliadenilación 382 3' NOS. La construcción pAL409-DSPko1 incluye el promotor 333 de P-OsUbi, secuencia iniciadora 314 de DSP1, intrón OsUbi 303, secuencia iniciadora 315 de DSP1 invertida y secuencia de poliadenilación 383 3' NOS. La construcción pAL409-ISA3ko1 incluye el promotor 334 de P-OsUbi, secuencia iniciadora 316 de ISA3, intrón OsUbi 304, secuencia iniciadora 317 de ISA3 invertida y secuencia de poliadenilación 384 3' NOS. El reemplazo del fragmento PacI-XmaI de pAG2004 con los fragmentos PacI-XmaI de las construcciones pAL409-GWDko1, pAL409-GWDko2, pAL409-DSPko1 y pAL409-ISA3ko1 produjo los plásmidos pAG2100 [SEQ ID NO: 187], pAG2101 [SEQ ID NO: 188], pAG2102 [SEQ ID NO: 189] y pAG2103 [SEQ ID NO: 190], respectivamente.

**Ejemplo 5. Construcción de ARNi de sorgo**

30 Se obtuvo una propuesta de la secuencia genómica correspondiente al supuesto gen GWD de Sorghum bicolor [SEQ ID NO: 191] a través de la página de inicio del Joint Genome Institute (JGI) Sorghum bicolor (<http://genome.jgi->

psf.org/Sorbil /Sorbil.home.html). De esta secuencia, se identificó una región que corresponde aproximadamente a la región GWD2 del gen del arroz [SEQ ID NO: 192]. En sorgo, las secuencias codificantes en esta región están interrumpidas por uno o más intrones, según lo identificado por el JGly los intrones están en aproximadamente los nucleótidos 140-342, nucleótidos 507-628 y nucleótidos 723-795 en [SEQ ID NO: 192]. Se utilizó un intrón natural derivado del genoma del sorgo para ensamblar un casete de ARNi para reducir la expresión del gen GWD de sorgo. Se amplificó una porción del gen GWD de sorgo. La porción amplificada incluía un exón completo (basado en la predicción del JGI) en la región media altamente conservada (descrita anteriormente, véase la FIG. 7, el intrón adyacente y 10 bases del exón posterior (para conservar el límite 3' intrón/exón). Se incorporó un sitio XmaI cadena arriba del primer exón y se incorporaron sitios AgeI y NheI cadena abajo del segundo exón truncado durante la amplificación por PCR de este producto. Este producto (SbGWDko2a) se unió primero en pCRBluntII TOPO (Invitrogen) y su composición se confirmó a través de múltiples productos de digestión de enzimas de restricción y secuenciación.> SbGWDko2a (con sitios de restricción flanqueantes)

```
GGTTCAATAACCCGGGAGTGAGATAAGCAAAGCACAAGATAGGTTTAC
AGATGATCTTGAGAATATGTACAGAACTTATCCTCAGTACAGAGAGAT
ACTAAGAATGATAATGGCTGCTGTTGGTCGTGGAGGTGAAGGTGACGT
TGGTCAACGCATTCGTGATGAGATATTAGTAATACAGGTAAAAGTAT
GGTCTTGGTGAATATACAGTTATTTTCGTTTCATTGCTCTGCTGAATTGA
GCAGTTGGTAGTGCTCATCCAAAACGTAGACATTGTCAACAATAAAAT
GTTTGGTGTGTTACAGAGAAATACCGGTGCAAAGCTAGCATGATGGAA
GAATGG [SEQ ID NO: 193]
```

Un segundo producto de PCR (SbGWDko2b), que corresponde solo al primer exón mencionado anteriormente, también se amplificó por PCR con sitios flanqueantes NheI y XmaI introducidos en los extremos 5' y 3' (en relación con la dirección de transcripción) y se unió a pCRBluntII TOPO. La composición de este fragmento también se confirmó mediante múltiples productos de digestión de enzimas de restricción y secuenciación.

> SbGWDko2b (con sitios de restricción flanqueantes)

```
GGTTCAATAAGCTAGCAGTGAGATAAGCAAAGCACAAGATAGGTTTAC
AGATGATCTTGAGAATATGTACAGAACTTATCCTCAGTACAGAGAGAT
ACTAAGAATGATAATGGCTGCTGTTGGTCGTGGAGGTGAAGGTGACGT
TGGTCAACGCATTCGTGATGAGATATTAGTAATACAGCCCAGGCTGAT
GGTCC [SEQ ID NO: 194]
```

A continuación, se cortó SbGWDko2b de pCRBlunt II como un fragmento NheI-XmaI y se unió a los sitios NheI y AgeI del plásmido que portaba SbGWDko2a, colocando SbGWDko2b cadena abajo del intrón y en la orientación opuesta de SbGWDko2a. En esta orientación, las secuencias en la porción sbGWDko2b del plásmido se presentan como un complemento invertido de las secuencias dentro de la porción sbGWDko2a. Con referencia a la FIG. 8, todo este casete se cortó como un fragmento XmaI-NheI y se unió a pAL409j, dando como resultado el plásmido pAL409j SbGWDko2 [SEQ ID NO: 218]. pAL409j porta un casete de ARNi dirigido al gen GWD de Sorghum bicolor. La secuencia iniciadora 510 (sbGWDko2a) se ilustra en la FIG. 8 cadena arriba del intrón 520 (sbGWDi), que se ilustra cadena arriba de la secuencia iniciadora 530 (sbGWDko2b). pAL409j difiere de pAL409 solo en que la unión entre el promotor de OsUbi3 y el intrón de OsUbi3i se ha modificado para reflejar su contexto nativo en el genoma del arroz. Como tales, esta orientación puede preservar las funciones potenciadoras de OsUbi3i con respecto al promotor de OsUbi3. Tal como se muestra en la FIG. 8, las dos secuencias iniciadoras invertidas, homólogas derivadas de un exón dentro del gen GWD de sorgo (GWDex) están separadas por un exón de GWD de sorgo natural (SbGWDi). Otros elementos se nombran como en la FIG. 2.

El casete completo de ARNi de pAL409j SbGWDko2 se cortó después como un fragmento PacI-XmaI y se unió a los sitios PacI y XmaI de pAG2004, produciendo el vector de transformación de Agrobacterium pAG2106 [SEQ ID NO: 195] de una manera similar a la descrita en referencia a la FIG. 6. Se usó una cepa de E. coli que portaba pAG2106 para la conjugación con Agrobacterium y la posterior transformación del sorgo.

### Ejemplo 6. Secuenciación del o de los genes GWD de miho

Se detectaron homólogos para GWD e ISA3 en el genoma de miho y se estimó el número de homólogos presentes para cada uno utilizando una estrategia de transferencia Southern. Los resultados con la transferencia Southern usando la sonda de ISA3 de arroz se muestran en la FIG. 9. La FIG. 9 muestra la detección de homólogos de ISA3

mediante transferencia Southern. Se extrajo el ADN genómico de arroz, sorgo, maíz y mijo, se digirió con HindIII y se separó por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, los ADN se transfirieron a membranas de nailon mediante transferencia capilar y las transferencias se sondearon con ADN marcado con DIG derivado del gen ISA3 de arroz clonado. Mientras que la sonda se hibridó a fragmentos únicos en arroz y sorgo, la misma sonda se hibridó a 3-5 fragmentos en los genomas de maíz y mijo. El control era ADN plasmídico que portaba la secuencia codificante de ISA3 de arroz; y el marcador era patrones de peso molecular de ADN. Se obtuvieron resultados similares cuando se usó el fragmento de GWD2 de arroz como sonda (no se muestra). Se determinó que, a diferencia del arroz y el sorgo, que contienen solo copias individuales de GWD e ISA3, el mijo contiene múltiples homólogos de cada uno de estos genes.

Se identificó una porción del gen GWD de mijo y se clonó utilizando un enfoque de PCR degenerada. La PCR degenerada emplea cebadores oligonucleotídicos con una o más bases ambiguas que permiten a los cebadores emparejarse con las secuencias plantilla para las cuales solo se dispone de información de secuencia aproximada. Es decir, en regiones de fuerte conservación de secuencia entre genes de especies ampliamente divergentes, se puede inferir el intervalo de posibles secuencias que podrían estar presentes en el gen correspondiente de una especie poco caracterizada tal como el mijo. Entonces se pueden diseñar cebadores degenerados que se emperajarán con las secuencias previstas, permitiendo la amplificación por PCR y la clonación de una porción del gen en cuestión.

Siguiendo la estrategia de PCR degenerada, se alinearon las porciones de los genes GWD derivados de arroz, sorgo, maíz y tomate. Las alineaciones más fuertes se produjeron en la región de los genes GWD que se describió en la FIG. 7. Se seleccionaron regiones cortas (~40 nt) cerca de los extremos de estas regiones de homología para realizar una comparación de secuencia más detallada (FIG. 10). La FIG. 10 ilustra la alineación de fragmentos de los genes GWD de arroz (OsGWD) [SEQ ID NO: 24 (arriba) y 28 (abajo)], sorgo (SbGWD) [SEQ ID NO: 25 (arriba) y 29 (abajo)], maíz (ZmGWD) [SEQ ID NO: 198 (arriba) y 202 (abajo)] y tomate (SlGWD) [SEQ ID NO: 199 (arriba) y 203 (abajo)]. Las posiciones de nucleótidos que se conservan en al menos dos de las cuatro secuencias están resaltadas en gris claro y subrayadas. Debajo de cada conjunto se presenta la secuencia de consenso para la cual se diseñaron los cebadores degenerados (dgGWDup2 y dgGWDdown2 [SEQ ID NO: 204 y 205, respectivamente]) para la amplificación por PCR. Téngase en cuenta que solo está disponible una secuencia parcial para el homólogo de maíz, con una región de secuencia desconocida representada por Ns. Las cuatro secuencias alineadas en el segmento superior corresponden a la porción de las secuencias codificantes de GWD que se pueden encontrar a partir de los nucleótidos 1803-1840 de la secuencia codificante de tomate (como se define en la FIG. 7), mientras que las alineaciones en el segmento inferior corresponden a los nucleótidos 2208-2249 de la secuencia del tomate. Las abreviaturas de nucleótidos para nucleótidos degenerados son las siguientes: Y, C o T; W, A o T; K, G o T; R, A o G, M, A o C; H, A o C o T; S, G o C; D, A o G o T. A partir de esta información, se diseñaron cebadores degenerados (dgGWDup2:5'-TGG AATTYTTGTWTGGATKAGRTTCATGGCTACMAGGCA-3' [SEQ ID NO: 204] y dgGWDdown2:5'GGYTCWGAATGRATMGSWGRTCA TARCTCAADAGACGCTCT-3' [SEQ ID NO: 205]). El ADN genómico que se había aislado del sorgo se utilizó después como plantilla en las reacciones de PCR con estos cebadores. La PCR degenerada con ADN genómico de sorgo como plantilla dio lugar a un producto de PCR de aproximadamente 800 pb. La secuenciación de este producto de PCR reveló que este coincidía estrechamente con la secuencia prevista para el gen GWD de sorgo por la base de datos del JGI (véase anteriormente), lo que indicaba que los cebadores degenerados amplificarían de manera confiable un segmento del gen GWD.

Después se usaron los mismos cebadores en reacciones de PCR que usaron ADN genómico de mijo (ecotipo Alamo) como plantilla. Estas reacciones produjeron productos de PCR discretos de aproximadamente 1100 pb. Estos productos se unieron a pCRBluntII TOPO y se secuenciaron cinco de los plásmidos resultantes. De estas cinco secuencias, se determinó que:

- Cada producto de PCR clonado deriva de un gen con una homología muy fuerte con el gen GWD de arroz
- Entre los cinco productos secuenciados, claramente había tres clases de secuencias (altamente homólogas), sugiriendo que los clones derivaron de tres homólogos diferentes de GWD dentro del genoma de mijo. Esta observación concuerda con los datos de las transferencias Southern que sugirieron que dentro del genoma de mijo residen múltiples genes GWD.
- Las principales diferencias en los tamaños de los productos que surgieron de la PCR degenerada de sorgo y mijo se pueden atribuir a diferencias en las longitudes de los supuestos intrones en cada uno de los respectivos genes.

Con referencia a la FIG. 11, se ilustra una comparación de la longitud relativa y el posicionamiento de los intrones dentro del segmento de homología central de los genes GWD de arroz, sorgo, Arabidopsis y mijo. Las cajas oscuras representan exones y las cajas claras representan intrones. Las secuencias de exones están muy bien conservadas y se reconocen fácilmente. Si bien las posiciones relativas de cada uno de los intrones también están bien conservadas entre especies, la longitud y secuencia de los intrones no está bien conservada. Las longitudes de los intrones y exones se indican en pb dentro de cada elemento.

Como se muestra a continuación, una alineación de las secuencias de tres de los productos de PCR degenerada derivados de mijo, demuestra que relativamente pocos cambios de un solo nucleótido y dos inserciones/delecciones

# ES 2 774 426 T3

algo más largas distinguen estos tres homólogos de GWD en esta región. Estos tres productos son PvGWD-2 [SEQ ID NO: 206], PvGWD-5 [SEQ ID NO: 207] y PvGWD-1 [SEQ ID NO: 208]

## Alineación de secuencias múltiples con CLUSTAL 2.0.10

```
PvGWD-2  TGGAATCTTGTTGGATGAGATTCATGGCTACCAGGCAACTAACATGGAATAAGAACTA 60
PvGWD-5  TGGAATCTTGTTGGATTAGGTTTCATGGCTACCAGGCAACTAACATGGAATAAGAACTA 60
PvGWD-1  TGGAATTTTGTGGATGAGATTCATGGCTACAAGACAACGACATGGAATAAGAACTA 60
```

\*\*\*\*\*

```
PvGWD-2  TAATGTGAAGCCCCGGTATATACCTGTCTTATCATTACTTCAGTGATGTTACTCTCT 120
PvGWD-5  TAATGTGAAGCCCCGGTATATACCTGTCTTATCATTACTTCAGTGATGTTACTCTCT 120
PvGWD-1  TAATGTGAAGCCACGGTATATACCTGTCTTATTATTACTTCAGTAATGTTACTCTCT 120
```

\*\*\*\*\*

```
PvGWD-2  GCTTAAAAATTTAAAGAATCTGAAGCTGTCCTTTTCTTTTGTGCGGGAACATAATTGAGA 180
PvGWD-5  GCTTAAAAATTTAAAGAATCTGAAGCTGTCCTTTTCTTTTGTGCGGGAACATAATTGAGA 180
PvGWD-1  GCTTAAAAAGTTAAAGAATCAGAAGTTGTCCTTTTCTTTTGTGCGGGAACATAATTGAAA 180
```

\*\*\*\*\*

```
PvGWD-2  AATTGGTGTTTTTGCCACTACTTCATGATGCAATTGTAATTTTCCCTCATTTTTTTCAA 240
PvGWD-5  AATTGGTGTTTTTGCCACTACTTCATGATGCAATTGTAATTTTCCCTCATTTTTTTCAA 240
PvGWD-1  AGTTGGTGTCTTGCCACTAC----- 201
```

\*\*\*\*\*

```
PvGWD-2  CTTTGTGATTTTGCCCTTACTATTACAAGTCAACGCAATTTGCTCCTGTTTGACCG 300
PvGWD-5  CTTTGTGATTTTGCCCTTACTATTACAAGTCAACGCAATTTGCTCCTGTTTGACCG 300
PvGWD-1  -----AAGTCAACGCGATTTACCCCT-CGTCACCG 232
```

\*\*\*\*\*

```
PvGWD-2  TTGACTGAG-GGAAAAATCGCGTTAACTTGTGAATAGTAAGTGCAAAATTGCAAAGTTGA 359
PvGWD-5  TTGACTGAG-GGAAAAATCGCGTTAACTTGTGAATAGTAAGTGCAAAATTGCAAAGTTGA 359
PvGWD-1  TCAAAACAGTAGCAAAATCGCGTTGACTTGTGAATAGTAAGGGCAAA-TCAAAAGTTGG 291
```

\*\*\*\*\*

```
PvGWD-2  AAAAAACAAGGACAAAATCACAATTGCACGTGCAAAGTAGGGGTGGAAACACAAATGCCCC 419
```

ES 2 774 426 T3

PvGWD-5 AAAAAACAAGGACAAAATCACAATTGCACTGCAAAGTAGGGGTGGAAACACAAATGCCCC 415

PvGWD-1 AAAAAACAAGGACAAAATCACAATTGCACTGCAAAGTAGTCGCGGAAACACAAATGCCCC 351

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 AAAATAATTTGGCTGTTTGTCTGATAGAAAACAATACAATTCAGTACTCAGAGAATATT 479

PvGWD-5 AAAATAATTTGGCTGTTTGTCTGATAGAAAACAATACAATTCAGTACTAAGAGAATATT 479

PvGWD-1 AAAATAATTTGGCTGTTTGTCTGATAAAAAACAATACAATTCAGTACTCAGAGAATATT 411

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 ATATTTCTATAAATGAAAAACATAACTCATGTCACATTCTTT-----GGCATCTCAT 531

PvGWD-5 ATATTTCTATAAATGAAAAACATAACTCATGTCACATTCTTT-----GGCATCTCAT 531

PvGWD-1 ATATTTCTATAAATGAAAAACATAACTCATGTCGCATTCTTTCATTCTTTGGCATCTCAT 471

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 ATCGATCAATAACTATGCAGTGAGATAAGCAAAGCACAAGATAGGTTTACAGATGATCTT 591

PvGWD-5 ATCGATCAATAACTATGCAGTGAGATAAGCAAAGCACAAGATAGGTTTACAGATGATCTT 591

PvGWD-1 ATTGATTAATAACTACGCAGTGAGATAAGCAAAGCACAAGATAGGTTTACAGATGATCTT 531

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 GAGAACATGTACAAAGCTTATCCTCAGTGCAGAGAGATATTAAGAATGATAATGGCTGCT 651

PvGWD-5 GAGAACATGTACAAAGCTTATCCTCAGTGCAGAGAGATATTAAGAATGATAATGGCTGCT 651

PvGWD-1 GAGAACATGTACAAAGCTTATCCTCAGTGCAGAGAGATATTAAGAATGATAATGGCTGCT 591

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 GTTGGTCGTGGAGGTGAAGGTGATGTTGGTCAACGTATTCGTGATGAGATATTAGTAATA 711

PvGWD-5 GTTGGTCGTGGAGGTGAAGGTGATGTTGGTCAACGTATTCGAGATGAGATATTAGTAATA 711

PvGWD-1 GTTGGTCGTGGAGGTGAAGGTGATGTTGGTCAACGTATTCGTGATGAGATATTAGTAATA 651

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 CAGGTAAAATTAATGGTCCTAGGTGAATATACACTTACTTTTATTCATTGCTTCACCGAA 771

PvGWD-5 CAGGTAAAATTAATGGTCCTAGGTGAATATACACTTACTTTTATTCATTGCTTCACCGAA 771

PvGWD-1 CAGGTAAAATTAATGGTCCTAGGTGAATATACACTTACTTTTATTCATTGCTTCACCGAA 711

\*\*\*\*\*

# ES 2 774 426 T3

PvGWD-2 TTATACGGTTGGTAGTTCTCATCCAAAAGATAGACATTGTGAATAATAATAAAATGCTTG 831

PvGWD-5 TTATACGGTTGGTAGTTCTCATCCAAAAGATAGACATTGTGAATAATAATAAAATGCTTG 831

PvGWD-1 TTATACGGTTGGTAGTTCTGATCCAAAAGATAGACATTGTGAATAATAATAAAATGCTTG 771

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 CTGCTTTAATAGAGAAATAATGACTGCAAAGGTGGAATGATGGAAGAATGGCACCAGAAA 891

PvGWD-5 CTGCTTTAATAGAGAAATAATGACTGCAAAGGTGGAATGATGGAAGAATGGCACCAGAAA 891

PvGWD-1 CTGCTTTTATAGAGAAATAATGACTGCAAAGGTGGAATGATGGAAGAATGGCACCAGAAA 831

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 TTGCACAACAATACAAGCCCAGATGATGTAGTGATATGCCAGGTAATGGATATTTTGAAT 951

PvGWD-5 TTGCACAACAATACAAGCCCAGATGATGTAGTGATATGCCAGGTAATGGATATTTTGAAT 951

PvGWD-1 TTGCACAACAATACAAGCCCAGATGATGTAGTGATATGCCAGGTAATGGATATTTTGAAT 891

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 TCTTAATACAGTAAGTATTTAAGCATTGAGGTTTTTCATGGTTATGTCTCTCCTTGGGCAG 1011

PvGWD-5 TCTTAATACAGTAAGTATTTAAGCATTGAGGTTTTTCATGGTTATGTCTCTCCTTGGGCAG 1011

PvGWD-1 TCTTAATACTGTAAGTATTTAAGCATTGAGGTTTTTATGGTTATGTCTCTCCTTGGGCAG 951

\*\*\*\*\*

PvGWD-2 GCACTAATTGATTATATCAAGAGTGATTTTGATATAAGTGTTTACTGGGACACCTTGAAC 1071

PvGWD-5 GCACTAATTGATTATATCAAGAGTGATTTTGATATAAGTGTTTACTGGGACACCTTGAAC 1071

PvGWD-1 GCATTAATTGATTATATCAAGAGTGATTTTGATATAAGTGTTTACTGGGACACCTTGAAC 1011

\*\*\* \*\*\*\*\*

PvGWD-2 AAAAAATGGCATAACCAAAGAGCGTCTTTGAGCTATGATCGAG-CTATCCATTCAGAACC 1130

PvGWD-5 AAAAAATGGCATAACCAAAGAGCGTCTATTGAGTTATGACCGTC-CGATCCATTCAGACC 1130

PvGWD-1 AAAAAATGGCATAACCAAAGAGCGTCTTTGAGCTATGATCGTTGCTATCCATTCAGAACC 1071

\*\*\*\*\*

Las secuencias de los exones de los genes GWD de mijo se infirieron de la información anterior. Las secuencias inferidas se usaron para (1) desarrollar una construcción de ARNi que se dirija a esta región central de uno o de la totalidad de los genes GWD de mijo y (2) determinar más de la secuencia genómica para cada uno de estos (al menos tres) homólogos de GWD en mijo.

Para desarrollar una construcción de ARNi, se usó PCR para amplificar porciones de dos de los exones abarcados en los productos de PCR degenerada descritos anteriormente. Estos dos productos se fusionaron después mediante SOE PCR (Horton RM, Hunt HD, Ho S.N., Pullen J.K., Pease L.R., Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension (1989) Gene 77(1):61-8)). Los productos fusionados incluían una secuencia contigua que se esperaba que coincidiera más estrechamente con uno o más de los ARNm de GWD de miijo. Los sitios NheI y XmaI se incorporaron a los extremos del producto fusionado para permitir la posterior clonación en pAL409. La secuencia de este producto (llamada "PvGWDko2" junto con los sitios de restricción flanqueantes) se muestra a continuación.

> Secuencia iniciadora del ARNi de PvGWDko2

GGCTAGCGAGATAAGCAAAGCACAAAGATAGGTTTACAGATGATCTTGA  
 GAACATGTACAAAGCTTATCCTCAGTACAGAGAGATATTAAGAATGAT  
 AATGGCTGCTGTTGGTCGTGGAGGTGAAGGTGATGTTGGTCAACGTATT  
 CGTGATGAGATATTAGTAATACAGGAGAAATAATGACTGCAAAGGTGG  
 AATGATGGAAGAATGGCACCAGAAATTGCACAACAATACAAGCCCAG  
 ATGATGTAGTGATATGCCCGGGAGG [SEQ ID NO: 209]

Se unió una copia de este elemento a los sitios AvrII y BspEI de pAL409, después, se unió una segunda copia en los sitios NheI y AgeI del plásmido resultante, produciendo el casete pAL409 PvGWDko2 del ARNi, que tenía los elementos dispuestos en orientaciones opuestas, separados por el intrón de OsUbi3, como se describe en referencia a la FIG. 6. El casete del ARNi se cortó de este plásmido como un fragmento PaeI-XmaI y se unió a los sitios PaeI y XmaI de pAG2004 (FIG. 6). El vector de transformación de Agrobacterium resultante se denominó pAG2104 [SEQ ID NO: 210]. Se usó una cepa de E. coli que portaba este plásmido para la conjugación con Agrobacterium y la posterior transformación de miijo.

Al aprender las secuencias genómicas completas de cada uno de los genes GWD en miijo, puede ser posible la identificación de las secuencias potencialmente exclusivas (regiones 5' y 3' no traducidas) que pueden flanquear a cada uno de estos genes. Con esta información, puede ser posible diseñar construcciones de ARNi que se dirijan específicamente a uno u otro de estos genes.

Para identificar más de las secuencias asociadas con cada uno de los homólogos de GWD, se siguió una estrategia que empleaba PCR inversa (iPCR) así como PCR degenerada. El ADN genómico de miijo se digirió con EcoRI, HindIII o Bgl II. Después se sometieron a autounión, se diluyeron aproximadamente 100 veces y se usaron como plantillas en reacciones de PCR inversa. Las secuencias de los primeros cebadores utilizados en las reacciones de iPCR se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizados para PCR inversa

PvGWDi-1	CCGTGGCTTCACATTATAGTTCTTATTCCA	SEQ ID NO: 211
PvGWDi-2	GAGATAAGCAAAGCACAAAGATAGGT	SEQ ID NO: 212
PvGWDi-3	GCCTGCCCAAGGAGAGACATAACCA	SEQ ID NO: 213
PvGWDi-4	GATATAAGTGTTTACTGGGACACCT	SEQ ID NO: 214

Las reacciones de PCR inversa con los cebadores PvGWDi-1 y PvGWDi-2 o con los cebadores PvGWDi-3 y PvGWDi-4 se llevaron a cabo utilizando las plantillas digeridas con EcoRI o HindIII (y autounidas). Estas reacciones dieron lugar a una pequeña cantidad de productos claros, que se purificaron a partir de geles de agarosa y se unieron a pCRBluntII-TOPO. El análisis de secuencia de los plásmidos resultantes permitió extender la secuencia conocida de los genes GWD de miijo tanto en los extremos 5' como 3' a un total de 3,4kb. De nuevo, las secuencias de clones individuales diferían en aproximadamente un 1-2 %, coherente con la idea de que los productos de PCR clonados derivaban de homólogos de GWD separados pero muy similares en el genoma de miijo. Este ejercicio se repitió con cebadores de nuevo diseño, incorporando tanto PCR inversa como PCR degenerada para extender aún más la secuencia conocida. Se identificaron aproximadamente 7 kb de secuencias de GWD de miijo.

Se proporciona una secuencia fusionada que representa las secuencias del gen GWD de miijo descubiertas en la presente memoria. La secuencia presentada no incluye todas las variaciones identificadas entre los homólogos. Por lo tanto, la secuencia podría verse como una quimera de estos homólogos. Esta secuencia abarca un segmento de aproximadamente 1-2 kb para el que no hay datos de secuencia. Este segmento se representa como una cadena de Ns. Con referencia a la FIG. 12, se ilustra una representación de matriz de puntos de alineaciones BLASTn entre las

secuencias genómicas de mijo y arroz para los genes del glucano agua dicinasa. El eje horizontal representa la secuencia de mijo; y el eje vertical representa la secuencia de arroz. Los segmentos diagonales representan regiones donde las dos secuencias son altamente homólogas. Este diagrama muestra la similitud de la secuencia de mijo a continuación con la secuencia correspondiente del gen GWD de arroz.

5 > homólogos de GWD de mijo

GGAACGACAGTGTACAAGAACAGGGCTCTTCGGACGCCTTTTCTAAAG  
 GTCAGTCTTGTTACATTATGGATCTCTTTGTTACCACAGAACAGTCTGG  
 TTAGCAGTAATGTCCATAACTGTGCAGTCAGGAGGTGATAACTCCACG  
 CTTAGAATTGAGATAGATGATCCTGCGGTGCAAGCTATTGAATTTCTCA  
 TCTTTGATGAGACACAGAACAAATGGTAACCCAGCTGTTTTCTGTACCA  
 TGTAGCACTGTTTGTGTTTGAATGCAAAAGGTATATAAACTATGCAA  
 AACTCTACATTGCACAGGTTTAAAAATAATGGCCAGAATTTTCAAATTC  
 AGCTCCAATCGAGCCACCATCATGGTAGTGGCGCATCTGGTGCCTCATC  
 TTCTGCTACTTCTGCCTTGGTGCCAGAGGATCTTGTGCAGATCCAAGCT  
 TACCTACGGTGGGAAAGAAATGGAAAGCAGTCATACACACCCGGAGCA  
 AGAAAAGGAAAGCTTTTAGTTGTTTTTTTTTATCTTCAGTCTGGAAGGA  
 ACTCAATGTACTAAGTTGATTAATAAATAAGAGGTGGTGTATTTTTTCTC  
 CAGGAGGAGTATGAAGCTGCACGAGCTGAGTTAATAGAAGAATTAAT  
 AGAGGTGTTTCTTTGGAGAAGCTTCGAGCTAAATTGACAAAAGCACCT  
 GAAGTGCCCGACTCAGATGAAAATGATTCTCCTGCATCTCAAATTAATG  
 TTGATAAAATTCAGAGGACCTTGTACAAGTCCAGGCTTATATAAGGTG  
 GGAGAAAGCAGGCAAGCCAACTATCCTCCTGAGAAGCAACTGGTAAT  
 GCATTGATTCAATAGCGTAAATACCTTGTGGCTTTACACTTTATGGA  
 GGTTCCTATCTCACAATTCGCTAGGTCGAGTTTGAGGAAGCAAGGAAG  
 GAACTGCAGGCTGAGGTGGACAAGGGAATCTCGATTGATCAGTTGAGG  
 AAGAAGATTTTGAAAGGAAACATTGAGAGTAAAGTTTCGAAGCAGCTG  
 AAGAATAAGAAGTACTTCTCTGTAGAAAGGATTCAGCGCAAAAAGAGA  
 GATATCATGCAGATTCTTAGTAAACATAAGCATACTGTCATAGAAGAG  
 CAAGCAGAGGTTGCACCAAAACAATACTGTTCTTGATCTCTTCACCA  
 ATTCATTACAGAAGGATGGCTTTGAAGTTCTAAGCAAAAACTGTTCA  
 AGTTCGGTGATAAACAGATCCTGGTTAGGATCCTTAAGATATTCTTTGT  
 ATCTCCAGATCTTTTTCTACCATGCTAATTAAGCTTCTCTCTTCTTAAGG  
 CAATCTCCACCAAGGTTCTAAACAATCAAAGTTTACTTGCCAACAA  
 ATCATACGGAGCCACTTATCCTTCACTGGTCACTAGCGAAAAAGGCTG  
 GAGAGTGGAAGGTAAATTTCAAATTTGTTTCCAGTAGTTAAAGCCAC  
 AAACTCAGCAGCTTTTTTAAACACTGCTATCAGTACCAATGCGGTGTTA  
 TTTAACTGTGCAGGCACCTCCTTCAAACATATTGCCATCTGGTTCAAAA  
 TTGTTAGACATGGCATGCGAAACTGAATTTACTAAGTCTGAATTGGATG  
 GTTTGCATTATCAGGTGGAATAACATCTTCAACCTGTTATTTTATTCTT  
 ATTTTTATTAGCCCTCCTGCTATCTCAAGGCTCTTAATTTCCAGGTTGTT

GAGATAGAGCTTGATGATGGAGGATATAAAGGGATGCCATTCGTTCTT  
 CGGTCTGGTGAAATGTGGATAAAAAATAATGGCTCTGATTTTTACCTTG  
 ATCTCAGCACCCGTGATACCAGAAATATTAAGGCAAGTGTCTGTCCA  
 TTTTACCTTTCAAACCTTTAAACTATTGTCTTTGTTTTGTCTATGCAACTA  
 GTCGCTAAATTGTGAAGTAACCGATCTGTTCTTAATTGAAGGACACTGG  
 TGATGCTGGTAAAGGTAAGGCTGCTAAGGCATTGCTGGAAAGAATAGCAGA  
 GCTGGAGGAAGATGCCAGCGATCTCTTATGCACAGGTCAGGCACTAA  
 AATATCCATAATAATATGACTGAATTTTACATGGAAAATTCTCCTAAAC  
 TACTTCTACTCCTTGACAGATTCAACATTGCAGCAGATCTAGTTGACCA  
 AGCCAGAGATGCTGGACTATTGGGTATTGTTGGACTTTTTGTTTGGATT  
 AGATTCATGGCTACAAGACAAGTACATGGAATAAGAAGTATAATGTG  
 AAGCCACGGTATATACCTGTCTTTATTATTTACTTCAGTAATGTTTACTC  
 TCTGCTTTAAAAGTTAAAGAATCAGAAGTTGTCCCTTTCTTTTGTGCGG  
 GAACATAATTGAAAAGTTGGTGTCTTGCCACTACAAGTCAACGCGATT  
 TTACCCCTCGTCAACGGTCAAACAGTAGCAAAAATCGCGTTGACTTGIG  
 AATAGTAAGGGCAAATCACAAAGTTGGAAAAACAAGGACAAAATCA  
 CAATTGCACTGCAAAGTAGTCGCGGAAACACAAATGCCCCAAAATAAT  
 TTGGCTGTTTGTCTGATAAAAAACAATACAATTCAGTACTCAGAGAAT  
 ATTATATTTCTATAAATGAAAAACATAACTCATGTGCGCATTCTTTCATTC  
 TTTGGCATCTCATATTGATTAATAACTACGCAGTGAGATAAGCAAAGCA  
 CAAGATAGGTTTACAGATGATCTTGAGAACATGTACAAAGCTTATCCTC  
 AGTACAGAGAGATATTAAGAATGATAATGGCTGCTGTTGGTCGTGGAG  
 GTGAAGGTGATGTTGGTCAACGTATTTCGTGATGAGATATTAGTAATACA  
 GGTAATAATAATGGTCCTAGGTGAATATACACCTACTTTTATTTCATTGC  
 TTCACTGAATTATACGGTTGGTAGTTCTGATCCAAAAGATAGACATTGT  
 GAATAATAATAAAATGCTTGCTGCTTTTATAGAGAAATAATGACTGCA  
 AAGGTGGAATGATGGAAGAATGGCACCAGAAATTGCACAACAATACA  
 AGCCCAGATGATGTAGTGATATGCCAGGTATTGGATATTTTGAATTCTT  
 AATACTGTAAGTATTTAAGCATTGAGGTTTTTATGGTTATGTCTCTCCTT  
 GGGCAGGCATTAATTGATTATATCAAGAGTGATTTTGATATAAGTGTTT  
 ACTGGGACACCTTGAACAAAAATGGCATAACCAAAGAGCATCTCTTGA  
 GCTATGATCGTGCATTTCATTGAGAACCAATTTGAGAAAGTGAACAGA  
 AGGAGGGTTTACTCCATGACCTGGGTAAATTACATGAGAAGCCTGAAGG  
 TATGTAAAACACTTAATATGGATATAAAAAAAGGCATGCAAAAAAATC

TGTGCATTATCTTTGAAATTGAGTATGGTATTTTCTAAAGAAAACATAG  
 AAAAACACATATTGCCCTTTCAGTTCCGGAAAAAAATGATCTGCCATA  
 AAGAGCATAACAGTCAACTCATGTATTAGCACTCGCCTTTTCTGCTAATG  
 GTATGTTGTGTTGTGTTCTGTTCTATTCAATATATGCTTTCAGTAATAAT  
 ATTCTAGTGTTGACAACATCATTGCTCACAAACATACAGAACTGTAGTA  
 TGCCCGGTACAGTATGAACTTGTCCCTTGAGTCTCCTCATTFTTTCCCTTAT  
 TCACGTCACAGCTTTATATCCTTCCAATGAATAATGATCAACTTGGAAA  
 TCATTGGCATCTACAGTGAACCGTCCATTGTATTCTGATTTTGAACAAC  
 TTTTTTCCCCTCAGAACACACAGTAATAGCCAAGTATAACGACCTTAC  
 ATGGCCAAAACAACAACCTTACATGGCCAAAATAGCCAGGTAAGGGAC  
 AGAAGAAGAGAGAGGGTTGCCCTGCGGCAGATGTGGACAATGACTGAT  
 GATGTGGCTGTCCCAGTTATCAAAACAGGCCAAATCCACTGTTTCATGTGG  
 CCNAAGCCAGTAATGAGCTGGTTTTGGGAAACCCTGGGGGATTGAGTA  
 AACAATTAGAGGGTTATGTGGATTGGTGCATAGTTGGGGGTAGGAATTT  
 GGAAATTTCCCTTTTGCTTGATAATTATGTTAGTCAAGAGATTAGACAA  
 GTATTGTTAGGAGTTTGTTCAGCTGGTTGAGATTGGATTTGGTTTCTTA  
 GGTGATTGGTTAGTGCTACCCTTGCTCTATAATTGGGGATTGCTTTTAA  
 TAAAGAAAGCAGAAATAAACCCAATCCTTCTCCGGTTCTCCCTCTTTTG  
 TCCGATGTTTGCAGATGCGGCCACTGATAAGGTCCAGGTCCATGTCCTC  
 CCATCAACCACACACACATACAGCCTAAGATCTAATTCACCCAGGAC  
 ACCCAAGCTCGTGAAAATATACCATGTCATCCCACTATTCATACTTTTT  
 TTAATAAAATCCCACTAATCCTGCAAATGTCCTAATATAAGAACAACA  
 TCATTTTCAGTCATGTTGTACCTTTTCTTGGTGACAAAAAGAAGACATC  
 CATTTTCATCTCTTTTAAAGGGGCATTTTCTCATCGTTTCTGCAATTGAAT  
 ATTCTTTCCCTGATGTAATCTTTGAATGAATGCTATTGTGATTTGCTCAT  
 TCTGTTAGGCTGTGCATTCTGGTGCTGATCTTGAGTCTGCTATAGCAAC  
 TTGCATGGGATACAAATCGGAGGTATCATTCTCATTCCCTTTTCATTCCG  
 CTAGAATTCTTTAGATACCTGTGCTCATATCTAATGAACTAACTTTTGG  
 GTACAGGGTGAAGGTTTCATGGTCGGTGTTCAGATCAATCCAGTGAAG  
 GGTTTGCCATCTGGATTTCCCTGTAAAAATCCCTCACCTTCTTTTCTCAAC  
 ACATGTACTTTCTAAGTTTCTTATACTTGTGACATTTACCTTTATAGGAA  
 TTGCTCAAATTTGTGCTTGACCATGTTGAGGACAAGTCAGCGGAACCAC  
 TTCTTGAGGTCAGTGATATAATCGAAGTTCCTGTTTGTAAATAAACGAA  
 GAGAAGAAGCTGGGTTTTTCATCACAACCTCAAATAATCAGATCTCACAT

AGCTGATTGAATTTTAAACCACCATTTTTGCGGNTACTATGNGAATC  
ACTTGTGCTAACAAAATGCTACCTTGNAGGGGNNGGTGGAAAGCTCNA  
GTTGAACTCCNCCCTNNNCTTCNTGNTTACCNGNACGCATGAAAGAA  
NNTATTTTTTTGGNCATTGCNCCTGATTCNACTTTTANGACAGCTATNG  
AAAGGNCATATGANGAGCTCCNCCATGGANNCCCCGANGNTGGGCNCC  
CNAATATTGNCCCCATGATNNGNNNNANGNNNAGNNCCNNNANNNNN  
NNCNNNNNNNNNTNNNNNANANNNGNNTNNNNNANNNNNNNNNNN  
NNGNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAAN  
NNNNNNNNNNNNANNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNAN  
NNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNAANNNNNNNNNATNCNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNCNCCNNNN  
NNNNNNNNNNNTNNNNNNNNANNNNCAACNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NCCNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNAN  
NNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNA  
NNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNTNANNNCNNNNA  
NTANNCNNNNNNNNNTNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NGANNNNNNNNNNNNNNAGNNNTNNNANNNNNCNNNNNNNNNNNG  
NNNTNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNN  
NNNNNNNNNNNNNGNNNNNTNNNNNNNNNGNNNNNNNNCNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNACNNNNNNNNNNNNNTCNCNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCNTNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNCNNNNNNNNNNCNNN  
NNNNNNNNNTNNNNNNCNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNTGNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNCANNNCNNNNG  
NAGATCTCGGAGAGTGAACCTCAGCAATCAAGTTCTCCGGATGCAGAA  
GCTGGCCATGCAGTACCATCTATTTCATTGGTCAATAAGAAGTTTCTTG  
GAAAATATGCAATATCAGCTGAAGAATTCTCTGAGGAAATGGTTAGTA  
ATATAAAATTTTGCATTAGGAAATCTGCCATTCGTAAGGAAGTCTTGAT  
GAAACCAATTGTTATTATGCTGGTTTCCTTTTCTTTGGCCTTGTGCTC

TAGTACTCACTTTTATGTTTTAGGTTGGGGCTAAGTCTCGGAATATAG  
 CATACTCAAAGGAAAAGTACCTTCGTGGGTTGGTGTCCCAACATCAGT  
 TGCATACCAATTTGGCACTTTTGAGAAGGTTTTATCAGATGGGCTTAAT  
 AAGGTTGGTGGTGGTTTATTTGATGTATATACTTGAATAATAGAACT  
 GCATGGTTCTTGGAGAAGTCAGATTCTTTAACATGTTTGAAATACACTA  
 CTGGGAAGGTAACAACGTGCAATTTAATGTCCACCAATATCTAAACAG  
 CCATTTTGGCATTCAATTCATATATATTTATTTTCATGAGCCTGCTCT  
 ATAAGTAGCGTCTTCAGTAGTTGTAGCTCATAGCTTCATAGTCTCATT  
 TACCATGAACTAATTTTGCTAACTTACATCTACTCTTCAAATAAGTAAT  
 ACTTGTATATTATTATCTTTGATTGTAAAAGAACTCCCTTGCTCGTTTG  
 TCAAGGTGCTTTTAGACAGGAGATGGAATTGACTGTTATCAAAGCAA  
 ATGATAACAAGAAACCTCTTGTGATTGGTTGAGCAGTTTCAACTAATC  
 CATTTTTTTTTCTTTTTGGCATGTGATCTTTGTATTATTGGCCCAAATGA  
 AATTCTATTTCTCCATTAACCACCCACAATGGCAGGTTTGGGTACATA  
 TAGGCCAACCATGGGTAGGTGGCTTAAAAGTTGAGTAAAGCATAATTG  
 GGGATAAGGTGCACATAGGCACGGACCACCCACAGACAAAGTGCTTGC  
 AGGCACTACTAATACATTATTCTATCACCATCAGGATTCAATTCTAACA  
 TGTACTGTTTCTTCTTTTCTTCTTTGTACAGTTCTGTATAGACCCTTTT  
 GTACAGTTTCCTAACAAATGAAAAAGATCAGTAGGAGACCCTCTTCTCC  
 TGTTCCACAAAAAATGTTAAAATGGTCTTTCTAATATTTGATTGTTCTTT  
 CTTTTATGGCAGGAAGAGCGCAAAACATAGAAAAGCTT [SEQ ID NO:  
 215]

**Ejemplo 7. Clonación de casetes de silenciamiento ZmGWD1RNAi y ZmGWD2RNAi**

5 Las repeticiones invertidas específicas de gen dentro de los casetes de silenciamiento ZmGWD1 y ZmGWD2 en los  
 vectores iniciales pAG4102 y pAG4103 se seleccionaron en dos regiones independientes del ADNc de ZmGWD de  
 maíz (GDB de maíz, número de registro GRMZM2G412611). La secuencia de repetición de ZmGWD1 de 497 pb, que  
 se usó en la construcción del vector pAG4102, corresponde a la posición 389-885 nt en el extremo 5' del ADNc de  
 GWD de maíz previsto. La ZmGWD1 tiene dos faltas de coincidencia de nucleótidos (posiciones 449 y 483) en  
 10 comparación con el ADNc de ZmGWD, que derivan del ensamblaje de la etiqueta de secuencia expresada (EST)  
 TC458260 (The Gene Index Database) que representa la secuencia expresada GWD de maíz. ZmGWD1 (SEQ ID  
 NO: 49)

ES 2 774 426 T3

TCCTCCCGTC CAGAAAACCT GATGGAACGA CAGTGTACAA  
 GAACAGGGCT CTCAGGACAC 60  
 CTTTTGTAAA GTCAGGTGAT AACTCCACTC TAAGGATTGA GATAGATGAT  
 CCTGGGGTGC 120  
 ACGCCATTGA GTTCCTCATC TTTGACGAGA CACAGAACAA ATGGTTTAAA  
 AACAATGGCC 180  
 AGAATTTTCA GGTTTCAGTTC CAGTCGAGCC GCCATCAGGG TACTGGTGCA  
 TCTGGTGCCT 240  
 CCTCTTCTGC TACTTCTACC TTGGTGCCAG AGGATCTTGT GCAGATCCAA  
 GCTTACCTTC 300  
 GGTGGGAAAG AAGGGGAAAG CAGTCATACA CACCAGAGCA  
 AGAAAAGGAG GAGTATGAAG 360  
 CTGCACGAGC TGAGTTAATA GAGGAAGTAA ACAGAGGTGT  
 TTCTTTAGAG AAGCTTCGAG 420  
 CTAAATTGAC AAAAGCACCT GAAGCACCCG AGTCGGATGA  
 AAGTAAATCT TCTGCATCTC 480  
 GAGTGCCCAT CGGTAAA 497

5 La secuencia de repetición de ZmGWD2 de 540 pb, que se usó en la construcción del vector pAG4103, corresponde a la posición 2986-3525 nt del ADNc de GWD de maíz previsto. La secuencia ZmGWD2 se extiende sobre un triplete de nucleótidos que codifica Hys1072 que se ha propuesto que es un resto de aminoácido crucial en la actividad de fosforilación de la proteína GWD (Mikkelsen, 2004). ZmGWD2 (SEQ ID NO: 50)

CTTCTGAACC GATTTGATCC TGTTTTAAGG AATGTTGCTC ACCTCGGAAG  
 TTGGCAGGTT 60  
 ATAAGCCCGG TTGAAGTATC AGGTTATGTG GTTGTGGTTG ATGAGTTACT  
 TGCTGTCCAG 120  
 AACAAATCTT ATGATAAACC AACCATCCTT GTGGCAAAGA  
 GTGTCAAGGG AGAGGAAGAA 180  
 ATACCAGATG GAGTAGTTGG TGTAATTACA CCTGATATGC CAGATGTTCT  
 GTCTCATGTG 240  
 TCAGTCCGAG CAAGGAATAG CAAGGTACTG TTTGCGACCT GTTTTGACCA  
 CACCACTCTA 300  
 TCTGAACTTG AAGGATATGA TCAGAACTG TTTTCTTCA AGCCTACTTC  
 TGCAGATATA 360  
 ACCTATAGGG AGATCACAGA GAGTGAAGTT CAGCAATCAA  
 GTTCTCCAAA TGCAGAAGTT 420  
 GGCCATGCAG TACCATCTAT TTCATTGGCC AAGAAGAAAT TTCTTGGA  
 ATATGCAATA 480  
 TCAGCCGAAG AATTCTCTGA GGAAATGGTT GGGGCCAAGT CTCGGAATAT  
 AGCATACTC 540

Antes de la construcción de los vectores pAG4102 y pAG4103, ambas secuencias ZmGWD1 y ZmGWD2 se verificaron para determinar posibles sitios de empalme de intrones con solo uno de esos sitios identificado en ZmGWD1 (AAAGGAGGAGT: SEQ ID NO: 152). Esta secuencia se dejó intacta para la construcción del vector pAG4102.

5 La región espaciadora ZmAdh1i6 en los casetes de silenciamiento ZmGWD1RNAi y ZmGWD2RNAi (vectores correspondientes pAG4102 y pAG4103) representa la secuencia de 342 pb del intrón 6 previsto del gen Adh1 de maíz (Número de registro de Gene Bank X04049). Esta secuencia intrónica se clonó en casetes de silenciamiento con su gen natural que codifica secuencias flanqueantes que consisten en 11 pb en el extremo 5' o 10 pb en el extremo 3' del intrón. Las secuencias flanqueantes se incluyeron para asegurar un empalme de intrones postranscripcional eficaz. Las secuencias de flanqueo se muestran en mayúsculas en ZmAdh1i6.

10 ZmAdh1i6 (SEQ ID NO: 51)

```

ATTCGAAGAA Ggtacagtac acacacatgt atatatgtat gatgtatccc ttcgatcgaa    60
ggcatgcctt ggtataatca ctgagtagtc attttattac tttgtttga caagtcagta    120
gttcatccat ttgtcccatt ttttcagctt ggaagtttgg ttgactggc acttggtcta    180
ataactgagt agtcatttta ttacgttgtt tcgacaagtc agtagctcat ccatctgtcc    240
catttttca gctaggaagt ttggttgcac tggccttga ctaataactg attagtcatt    300
ttattacatt gtttcgacaa gtcagtagct catccatctg tcccattttt cagCTAGGAA    360
GTT                                     363
    
```

15 Las partes de los casetes de silenciamiento ZmGWD1RNAi y ZmGWD2RNAi que contienen repeticiones invertidas con la secuencia espaciadora ZmAdh1i6, se sintetizaron como fragmentos BamHI-AvrII por el GenScript CRO. Los fragmentos sintetizados se clonaron entre el promotor PepC de maíz y las secuencias terminadoras del gen de nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* para producir los vectores de silenciamiento pAG4102 y pAG4103.

Ambos casetes ZmGWD1RNAi y ZmGWD2RNAi se usaron posteriormente para generar vectores apilados más complejos mediante la clonación de casetes de silenciamiento en regiones del ADN-T de los vectores que ya tenían varios casetes de expresión para la producción de las enzimas que degradan la pared celular (CWDE).

## 20 Ejemplo 8. Generación de plantas transgénicas

Se utilizaron cepas de *E. coli* que portan pAG2104, pAG2105, pAG2100, pAG2101, pAG2102, pAG2103, pAG2104, pAG2106, pAG4003, pAG4102, pAG4103 o vectores de transformación basados en plásmidos que portan las construcciones 2379, 2380, 4106, 4107, 4108, 4109, 4110, 4111, 4112, 4113, 4114, 4115, 4116, 4117, 4120, 4121, 4124, 4125, 4514 o 4515 para la conjugación con *Agrobacterium* y posterior transformación del arroz, maíz, sorgo y mijo.

## 30 Ejemplo 9. Supresión de ARNm de genes implicados en la movilización del almidón vegetativo

Para determinar si los vectores de ARNi descritos anteriormente estaban ejerciendo un efecto sobre los ARNm dirigidos en plantas transgénicas, se aisló el ARN de varias plantas de control y transgénicas y se utilizó PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa en tiempo real, RT-qPCR) para medir la abundancia relativa de especies de ARNm (FIG. 13, 14 y 15). Estos resultados confirmaron que el ARNi puede usarse para reducir el nivel de ARNm naturales en el arroz transgénico.

35 Con referencia a las FIG. 13, 14 y 15, estas figuras ilustran que los vectores de ARNi suprimen la acumulación de ARNm dirigidos en el arroz transgénico. Se empleó RT-PCR en tiempo real para medir la abundancia de diferentes especies de ARNm en relación con la de los genes de referencia ("genes constitutivos" que se expresan nominalmente de forma constitutiva en el arroz). En varias de las líneas transgénicas, se encontró que los niveles de los ARNm dirigidos estaban muy por debajo de los observados entre las plantas de control. FIG. 13, niveles de ARNm de GWD entre plantas que portan pAG2100 o pAG2101 debilitados y controles de tipo silvestre (TS); FIG. 14, niveles de ARNm de DSP entre plantas que portan pAG2102 y controles de TS; FIG. 15, niveles de ARNm de ISA3 entre plantas que portan pAG2103 y controles de TS.

40 La eficacia del silenciamiento del gen GWD en plantas de maíz transgénicas transformadas con las construcciones de silenciamiento pAG4102 o pAG4103 se evaluó de manera similar mediante RT-qPCR. El material de la hoja verde de las plantas de maíz transgénicas y no transformadas se muestreó al anochecer, cuando se observan los niveles de expresión más altos del gen GWD en monocotiledóneas (datos no publicados de Agrivida). El material foliar recogido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se transfirió a un congelador a -80 °C para el almacenamiento antes del aislamiento del ARN. El aislamiento de ARN total se realizó a partir de 0,1 - 0,2 g de los tejidos de la hoja de maíz congelados usando reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante con modificaciones menores. Para eliminar cualquier cantidad residual del ADN genómico del maíz en las preparaciones

de ARN, posteriormente, se digirieron 10 microgramos del ARN total que se extrajo con TRIZol de cada muestra con DNasa usando el kit sin ADN TURBO (Applied Biosystems/Ambion). Las muestras de ARN tratadas con DNasa se purificaron adicionalmente con el kit de limpieza RNeasy MinElute (QIAGEN) y 1 microgramo del ARN purificado se sometió a síntesis de ADNc usando la transcriptasa inversa iScript (Bio-Rad) como se describe en el protocolo proporcionado por el fabricante. Todas las muestras de ADNc se diluyeron 1:50 con agua sin nucleasas. Un microlitro de la muestra de ADNc diluida (equivalente a 1 ng del ARN total que se utilizó para la síntesis del ADNc) se sometió al ensayo de qPCR con iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) como se especifica en el protocolo suministrado. La expresión del gen GWD en las plantas que se evaluaron se normalizó frente a la expresión de dos genes de referencia internos de maíz, tales como beta-Actina (Número de registro de GenBank U60508) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH, Número de registro de GenBank X07156.1). Los cebadores utilizados en el análisis RT-qPCR se diseñaron con el software Primer3 que está disponible en línea. Los cebadores de PCR se enumeran en la Tabla 3:

Tabla 3. Lista de los cebadores utilizados en RT-qPCR para el análisis de la expresión de GWD de maíz

Gen diana	Cebador directo	Cebador inverso	Temperatura de emparejamiento (°C)	Tamaño del producto, pb
GWD	ob1659 (SEQ ID NO: 153): ATGAAGGAGACAAGCGT TGG	ob1660 (SEQ ID NO: 154): AAGTTTCACCTTGCGTG TGC	55	104
Beta-actina	ob1555 (SEQ ID NO: 155): CAACTGCCAGCAATGT ATG	ob1556 (SEQ ID NO: 156): CGTAGATAGGGACGGT GTGG	55	119
GADPH	ob1567 (SEQ ID NO: 157): CGCTGAGTATGTCGTGGA GT	ob1568 (SEQ ID NO: 158): AACAACTTCTTGGCAC CAC	55	88

Todos los cebadores de PCR para ensayos de expresión de GWD se habían validado previamente mediante RT-PCR regular seguida de electroforesis en gel de agarosa para verificar la especificidad de los cebadores. Además, los cebadores seleccionados se validaron mediante los análisis de Calibración de Curva Patrón y Punto de Fusión para garantizar resultados de amplificación reproducibles. Las reacciones de amplificación por PCR en tiempo real se realizaron en un volumen de 12,5 microlitros en placas de 96 pocillos en un instrumento CFX-96 (Bio-Rad). Se ejecutó un ADNc de control que representa la planta no transformada número 37 (línea AxB de maíz de tipo silvestre) con cada placa experimental para asegurar la disponibilidad de una referencia cruzada entre diferentes ejecuciones de qPCR. También se incluyó un control sin plantilla (NTC, por sus siglas en inglés) con cada ejecución para cada gen. Cada muestra experimental se ejecutó por triplicado. El perfil térmico de la reacción de PCR fue de 95 °C durante 3 minutos de activación y desnaturalización, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos. El software CFX Manager (Versión 2.1) calculó automáticamente el valor del ciclo de cuantificación (Cq) para cada reacción. La expresión observada del gen GWD en la planta de control no transformada número 37 se ajustó a "1" y la expresión de GWD en cada planta transgénica analizada se comparó con este valor para generar datos relativos de expresión génica.

#### *Resultados del análisis de expresión de GWD en maíz transgénico*

Los casetes de silenciamiento ZmGWD1RNAi y ZmGWD2RNAi proporcionaron niveles significativos de supresión de la expresión del gen GWD alcanzando una reducción de nivel de transcripción de más de 13 veces en plantas transgénicas individuales, en comparación con la planta de maíz no transformada número 37. La expresión del gen GWD no se suprimió en una sola planta (4102.64) entre todas las plantas transgénicas analizadas. La eficacia de silenciamiento de GWD observada fue del 95,8-100%, con una reducción del nivel de transcripción de más de 3 veces en cada planta transgénica analizada en relación con el nivel de GWD en maíz no transformado (Tabla 4 y FIG. 16).

Tabla 4. Eficacia del silenciamiento de GWD en maíz transgénico por los casetes ZmGWD1RNAi y ZmGWD2RNAi

Casete de silenciamiento	Número de plantas transgénicas analizadas	Número de plantas con niveles de transcripción de GWD suprimidos	La eficacia observada del silenciamiento de GWD (% de plantas silenciadas)
ZmGWD1RNAi (pAG4102)	24	23	95,8
ZmGWD2RNAi (pAG4103)	12	12	100

**Ejemplo 10. Las plantas modificadas acumulan niveles elevados de almidón y de glucosa total más altos**

5 Se recogieron tejidos de plantas de control, así como plantas de arroz y mijo que portan copias integradas de los transgenes de ARNi descritos anteriormente. Estos tejidos se secaron después y se molieron hasta obtener un polvo fino. El contenido de almidón de estos tejidos se determinó después por métodos convencionales (Smith AM y Zeeman SC, Quantification of starch in plant tissues (2006) Nat. Protocols 1:1342-1345). Con referencia a la FIG. 17, se muestra almidón elevado entre líneas seleccionadas de arroz y mijo para aquellas líneas que portan construcciones de ARNi. Los resultados de Nipponbarre y Alamo (líneas de control no transformadas para arroz y mijo, respectivamente) representan los promedios de varias plantas diferentes. Otros resultados representan datos duplicados de 2-3 veces de plantas transgénicas individuales. Las plantas transgénicas se identifican de acuerdo con el gen de movilización de almidón dirigido. las plantas OsGWD-1 portan el vector de ARNi pAG2100; Las plantas OsGWD-2 portan pAG2101; Las plantas OsDSP portan pAG2102; las plantas OsISA3 portan pAG2103; las plantas PvGWD portan pAG2104, un vector de expresión de ARNi que se dirige específicamente a transcritos de GWD de mijo que se asemejan a las secuencias descritas anteriormente (véase la FIG. 12). Como se muestra en la FIG. 17, se identificaron varias líneas transgénicas de arroz y mijo que acumulan almidón por encima de los niveles observados entre las plantas de control. En estos ejemplos, el almidón se acumuló a niveles tan altos como un 6 % entre las líneas de arroz transgénico, mientras que solo se acumuló hasta aproximadamente un 3 % en la mayor de las líneas de control. En mijo, la línea más alta de Alamo acumuló aproximadamente un 2 % de almidón, mientras que la línea transgénica más alta acumuló aproximadamente un 3,5 % de almidón en peso seco.

Con referencia a la FIG. 18, se encontró que el contenido de almidón en varias plantas de arroz aproximadamente 5 semanas mayor que las representadas en la FIG. 17 era 2 a 3 veces mayor que la observada en plantas más jóvenes. La FIG. 18 ilustra el contenido de almidón en líneas de arroz transgénico, recolectado aproximadamente 19 semanas después de la siembra. La nomenclatura de las plantas es como en la FIG. 17. Entre estas, una línea que expresa un ARNi que se dirige a GWD acumuló almidón a ~16 % de peso seco, mientras que las líneas de control no acumularon más de ~8 % de almidón.

Para generar plantas transgénicas adicionales que expresen los microARN o ARNh descritos anteriormente, se introdujeron construcciones en los vectores plasmídicos para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* pAG2005 (SEQ ID NO: 75) y pAG4003 (SEQ ID NO: 76).

30 Se generaron plantas de arroz transgénicas y se cultivaron en invernaderos hasta la madurez, después de lo cual se cosecharon semillas y paja seca. El contenido de almidón de plantas individuales se midió mediante un ensayo de almidón total (Megazyme, Rebuznar, Condado de Wicklow, Irlanda). La FIG. 19 ilustra el contenido de almidón que se observó entre varios individuos de poblaciones que portaban cada una de las 11 construcciones diferentes, en donde las construcciones corresponden a las SEQ ID de la siguiente manera: 2107 (SEQ ID NO: 59), 2108 (SEQ ID NO: 60), 2109 (SEQ ID NO: 61), 2110 (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 63), 2111 (SEQ ID NO: 64), 2112 (SEQ ID NO: 66), 2113 (SEQ ID NO: 62), 2114 (SEQ ID NO: 65), 2115 (SEQ ID NO: 72), 2116 (SEQ ID NO: 73) y 2117 (SEQ ID NO: 74). Estos resultados indican que la supresión de la expresión de enzimas, tal como GWD, PWD y DSP, que participan en la renovación del almidón transitorio produce que las plantas acumulen almidón y que este almidón pueda persistir en la biomasa después de la senescencia.

40 Se recogieron muestras molidas de la paja de cada una de varias plantas transgénicas producidas a partir de pAG2110, pAG2115 y pAG2116 que acumulan > 8 % (> 80 mg/g) de almidón y estas se agruparon para preparar una "mezcla transgénica". Esta mezcla transgénica tenía un contenido de almidón total promedio de aproximadamente un 9,2 % (92 mg de almidón por gramo de peso seco). De manera similar, se agruparon muestras de paja de plantas de Nipponbarre para preparar una "mezcla de control NB" que tenía un contenido de almidón aproximado del 0,8% (8 mg de almidón por gramo de peso seco). Después se tomaron muestras de estas mezclas y se usó la hidrólisis ácida total para examinar su composición total de carbohidratos para determinar si la acumulación de almidón afectaba el contenido general de carbohidratos. Aproximadamente 0,20 g de tejido molido de cada mezcla se trató con ácido sulfúrico al 72 % a 30 °C durante 1 hora. El ácido se diluyó después al 4 % de concentración y las muestras se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 1 hora. Después del enfriamiento, el pH de las muestras se ajustó a pH 5-8. El análisis se realizó por HPLC y las concentraciones de azúcar se calcularon en relación con los patrones de azúcar

puro. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de carbohidratos de paja de control y de arroz transgénico.

Hidratos de carbono	Mezcla de control NB		Mezcla transgénica	
	Prom	Devst	Prom	Devst
Glucosa (g/100 g de biomasa)	36,32	0,07	43,39	0,39
Xilosa (g/100 g de biomasa)	14,64	0,09	13,84	0,06
Galactosa (g/100 g de biomasa)	1,26	0,09	0,91	0,53
Arabinosa (g/100 g de biomasa)	0,25	0,02	0,07	0,24
Manosa (g/100 g de biomasa)	2,16	0,06	2,01	0,45

5 Estos resultados confirman que el contenido adicional de almidón de la biomasa transgénica da como resultado un aumento en el contenido total de glucosa del material y no se produce a expensas de, por ejemplo, glucosa derivada de celulosa.

#### Ejemplo 11. Las plantas transgénicas que acumulan almidón vegetativo tienen una mayor biomasa aérea

10 Para determinar si el fenotipo de acumulación de almidón afectó el rendimiento de biomasa entre plantas transgénicas, se cultivaron 20 progenie de una sola planta de arroz que portaba la construcción 2116 y 9 progenie de plantas de control de tipo silvestre (NB) en un invernadero hasta la madurez, se recolectó la semilla y se cosechó, se secó y se pesó la biomasa total aérea (excluyendo semillas y panículas) (FIG.20). Con referencia a la FIG. 20, los pesos secos promedio de las plantas de la población de 2116 es un 17 % mayor que los de la población de control.

#### Ejemplo 12. Recuperación de glucosa después de la hidrólisis enzimática

15 En lugar de utilizar una hidrólisis ácida total para extraer glucosa de la biomasa lignocelulósica, con frecuencia se usa un tratamiento previo con ácido diluido para tratar previamente la biomasa con el fin de alterar la cristalinidad de los polímeros de carbohidratos que están presentes en el material vegetal y después se añaden cócteles de enzimas hidrolíticas (celulasas, hemicelulasas, etc.) para la hidrolización de los polímeros en sus azúcares componentes. Para determinar si la biomasa con alto contenido de almidón permitiría recuperar más glucosa durante dicho procedimiento de hidrólisis enzimática, se trataron previamente 20 mg de tejido molido de cada una de las muestras mezcladas (mezcla de control NB y mezcla transgénica) con ácido sulfúrico 0,25 M (pH 1,0) a 95 °C durante 4 o 16 horas, o a 20 120 °C durante 1 hora. Después de ajustar el pH de las muestras tratadas previamente, se realizó la hidrólisis enzimática con un cóctel enzimático disponible comercialmente, Accellerase® (Genencor, Palo Alto CA). La hidrólisis con una mezcla de Accellerase de "cóctel completo" (FCt) implica 200 µl de Accellerase® 1500 y 100 µl de Accellerase® XY por gramo de biomasa a 50 °C, pH 5,0, durante 72 horas. Después de la hidrólisis, el rendimiento de glucosa se midió usando HPLC (figura 21). Refiriéndose a esta figura, se observó, que en las tres condiciones de 25 tratamiento previo e hidrólisis, se recuperó más glucosa libre de la biomasa transgénica con alto contenido de almidón, de la que podría recuperarse de la biomasa de control.

30 Para determinar si se puede recuperar el aumento de glucosa de la paja transgénica cuando se emplearon métodos alternativos de tratamiento previo de biomasa, las muestras de la mezcla de control NB y la biomasa de la mezcla transgénica se sometieron a tres estrategias de tratamiento previo diferentes. Se trataron previamente 20 mg de tejido molido con un tratamiento previo con ácido diluido (ácido sulfúrico 0,25 M a pH 1,0), un tratamiento previo con base (NH<sub>4</sub>OH al 7,5 % a pH 12,0) o un tratamiento previo con bisulfito (NH<sub>4</sub>HSO<sub>3</sub> 0,175 M + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,18 M; bisulfito a pH 8,1). Después del tratamiento previo, las muestras se hidrolizaron con un cóctel de enzimas como se describió anteriormente. Las cantidades de glucosa y xilosa que se liberaron después de cada tratamiento previo e hidrólisis se 35 cuantificaron por HPLC (FIG. 22 y 23). Como se puede observar en la FIG. 22, para cada tratamiento previo se recuperó más glucosa de la biomasa transgénica que la recuperada de la biomasa de control. Por el contrario, como se puede observar en la FIG. 23, en cada condición de tratamiento previo, los rendimientos de xilosa de la biomasa transgénica fueron muy similares o ligeramente inferiores a los rendimientos de xilosa de la biomasa de control, reflejando el hecho de que la biomasa transgénica tenía un contenido de xilosa ligeramente más bajo por gramo en 40 peso seco, como se determinó anteriormente a partir del análisis de composición total (véase la Tabla 5).

45 Estas observaciones indican que aumentar el contenido de almidón de la biomasa permite la recuperación de más glucosa por unidad de biomasa. Además, la comparación del rendimiento de glucosa de la muestra de la mezcla de control NB tratada previamente con ácido (95 °C 16 h) con el rendimiento de glucosa de la muestra de mezcla transgénica de bisulfato tratada previamente (95 °C 16 h) como se muestra en la FIG. 22 indica que, aunque un tratamiento previo leve, tal como el tratamiento previo con bisulfato descrito anteriormente, podría liberar glucosa de manera menos eficaz que un tratamiento previo ácido o básico, se puede recuperar tanta o más glucosa de la biomasa

transgénica incluso con un tratamiento previo suave que la que se puede recuperar de la biomasa de control después de un tratamiento previo ácido o básico duro. El uso de un tratamiento previo suave permitiría instalaciones de procesamiento con equipos de capital menos costosos; por el contrario, el uso del material transgénico en un tratamiento previo más severo aumentaría los rendimientos de glucosa, mejorando el retorno de la inversión de ese equipo.

En un experimento similar, las muestras de dos plantas de arroz transgénicas individuales 2110\_13 y 2110\_21 y la mezcla de control NB se trataron previamente en cuatro condiciones diferentes, después se sometieron a hidrólisis enzimática (FIG. 24). Se trataron veinte miligramos de tejido molido con un tratamiento previo con ácido (ácido sulfúrico 0,25 M a pH 1,0), un tratamiento previo con base (NH<sub>4</sub>OH al 7,5 % a pH 12,0), un tratamiento previo con bisulfito (NH<sub>4</sub>HSO<sub>3</sub> 0,175 M + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,18 M a pH 8,1), o un tratamiento previo con hidróxido de calcio [Ca (OH)<sub>2</sub> saturado] a 120 °C durante 1 hora con una relación de líquidos a sólidos de 10, seguido de digestión enzimática como se describió anteriormente. Los rendimientos de glucosa se cuantificaron por HPLC. Con referencia a la FIG. 24, el rendimiento general de los tratamientos previos difiere notablemente, pero en cada caso se recuperó más glucosa de la biomasa de arroz transgénico que la recuperada de la biomasa de control. Estos resultados también muestran que el beneficio del aumento de la acumulación de almidón en las plantas transgénicas se puede ver en la biomasa derivada de una sola línea de plantas y no necesita implicar una mezcla de biomasa de múltiples líneas de plantas independientes.

### Ejemplo 13. Sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa

Se pueden producir etanol, ácidos orgánicos u otros productos bioquímicos a partir de biomasa lignocelulósica a través de la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, por sus siglas en inglés). Este proceso utiliza tratamiento previo de biomasa, como se describió anteriormente, seguido de la hidrólisis de la biomasa con cócteles enzimáticos en presencia de levaduras u otros microorganismos, que metabolizarán los azúcares resultantes para producir etanol, ácidos orgánicos y/o productos bioquímicos adicionales.

Para determinar si la biomasa del arroz transgénico con alto contenido de almidón apoyaría la producción de más etanol en relación con la biomasa de control a través de SSF, se trataron previamente 3 g de biomasa de la mezcla de control NB o de la mezcla transgénica con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M pH 1,0 a 120 °C durante 1 hora en una olla a presión. La hidrólisis se realizó a un pH 4,9 a 50 °C con el cóctel completo de Accellerase (FCT). FCT contiene 200 µl de Accellerase® 1500 por 1 g de biomasa y 100 µl de Accellerase® XY por 1 g de biomasa. Se añadió medio YP (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona) al hidrolizado para ayudar al crecimiento de las levaduras y después se añadió un inóculo de células de levadura D5A de una solución madre congelada. También se preparó una muestra de "control de glucosa" que empleaba glucosa pura (aproximadamente 20-22 g/l) en el medio en lugar de la biomasa hidrolizada.

La FIG. 25 ilustra los cambios en los títulos de cultivo de levaduras (UFC/ml) durante la sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa transgénica (cuadrado; mezcla transgénica), plantas de control no transgénicas (diamante: mezcla de control NB) y control de glucosa (triángulo). Como se puede observar en la FIG. 25, las tres muestras apoyaron el crecimiento del organismo fermentador, levadura en este ejemplo. La glucosa pura fomentó el crecimiento más rápido de la levadura y el crecimiento de la levadura alcanzó una meseta antes cuando se cultivó con glucosa pura que cuando se cultivó en los hidrolizados de biomasa. En 24 horas, la biomasa transgénica fomentó el crecimiento de más levadura que la biomasa de control.

La FIG. 26 ilustra la liberación y el consumo de glucosa durante la SSF y fermentación de biomasa transgénica, planta de control no transgénica y control de glucosa. Con referencia a la FIG. 26, se observó esa sacarificación; es decir, la hidrólisis de los polisacáridos en la biomasa a sus azúcares componentes, se produce al mismo tiempo que las células de levadura crecen durante la SSF y las concentraciones de glucosa en los hidrolizados de biomasa aumentan inicialmente, mientras que las concentraciones de glucosa en el medio de "control de glucosa" disminuyen inmediatamente. A medida que las poblaciones de levadura aumentan y la biomasa se agota, las concentraciones de glucosa comienzan a disminuir en medios que también contienen biomasa.

La FIG. 27 ilustra la producción de etanol durante la sacarificación y fermentación simultáneas de biomasa de arroz, plantas de control no transgénicas y control de glucosa. De acuerdo con el consumo rápido de glucosa visto en cultivos que contienen el "control de glucosa", los cultivos de control también producen etanol antes que los cultivos cultivados sobre hidrolizados de biomasa. En 48 horas, sin embargo, ambos tipos de hidrolizados de fomentan la producción de cantidades significativas de etanol. De acuerdo con un mayor contenido de almidón fácilmente hidrolizado, la biomasa de la mezcla transgénica fomenta una producción más rápida de etanol, así como una mayor concentración final de etanol (concentración final: 17,1 g de etanol/100 g de biomasa) que la biomasa de la mezcla de control NB (concentración final: 14,2 g de etanol/100 g de rastrojo).

Según las cantidades iniciales de glucosa que estaban presentes en cada cultivo como polímeros de glucano en las muestras de biomasa, es posible calcular el rendimiento eficaz de etanol en glucosa, usando la Ecuación 1:

$$\% \text{Conversión de celulosa} = \frac{[EtOH]_f - [EtOH]_0}{0,51 * f [biomasa]} \times 100 \%$$

donde el  $[EtOH]_f$  es la concentración final de etanol (g/l),  $[EtOH]_o$  es la concentración inicial de etanol (g/l), 0,51 es el factor de conversión de glucosa a etanol basado en la bioquímica estequiométrica de la levadura,  $f$  es la fracción de glucano (polisacárido de glucosa) de la biomasa seca y  $[Biomasa]$  es la concentración inicial (g/l) de la biomasa seca en la muestra. Usando esta ecuación, hubo una mayor tasa de conversión de etanol de la biomasa transgénica que de la biomasa de control, tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Tasas de conversión de etanol de biomasa control y transgénica.

% de conversión de EtOH			% de rendimiento de EtOH
Cepa	Mezcla de control NB	Mezcla transgénica	Control de glucosa
% de conversión	81,83	84,12	89,45

Se observó que la tasa de conversión de etanol en la biomasa transgénica era más cercana que la observada en glucosa pura, indicando que la fermentación de etanol puede proceder más eficazmente de biomasa transgénica, con alto contenido de almidón que de la biomasa de control.

#### Ejemplo 14. Combinación de acumulación de almidón con la expresión de enzimas que degradan polisacáridos

Si bien la mayor acumulación de almidón en la biomasa transgénica permite la liberación de más glucosa de la biomasa durante la hidrólisis o SSF, es posible convertir aún más glucano disponible en glucosa produciendo enzimas que degradan polisacáridos en la biomasa mientras las plantas crecen al mismo tiempo que se acumula el almidón. Las paredes celulares de las plantas están compuestas de numerosos polisacáridos, incluyendo polímeros de glucano tales como celulosa,  $\beta$ -glucano y xiloglucanos, así como otros polisacáridos complejos tal como hemicelulosas (heteroxilanos), pectinas, etc. Expresar enzimas que degradan estos polisacáridos hará posible descomponer estos polisacáridos en sus azúcares componentes más fácilmente, proporcionando así un beneficio adicional a la biomasa con alto contenido de almidón para piensos para animales o aplicaciones de fermentación, en la que los azúcares fermentables o digeribles se recuperan más eficazmente tanto del almidón vegetativo como de los polisacáridos estructurales.

Se pueden emplear varias enzimas que degradan polisacáridos para este objetivo. Se proporcionan ejemplos de estas enzimas que degradan polisacáridos como la SEQ ID NO: 77 (xilanasa 043097), SEQ ID NO: 78 (celobiohidrolasa BD22308), SEQ ID NO: 79 (endoglucanasa BD25243), SEQ ID NO: 80 (xilanasa EU591743), SEQ ID NO: 81 (endoglucanasa de NtEGm), SEQ ID NO: 82 (celobiohidrolasa P0C2S1), SEQ ID NO: 83 (xilanasa P77853), SEQ ID NO: 84 (celobiohidrolasa O68438), SEQ ID NO: 85 (endoglucanasa O33897), SEQ ID NO: 160 (amilasa 19862), SEQ ID NO: 161 (glucoamilasa 20082), SEQ ID NO: 162 (glucoamilasa 20707), SEQ ID NO: 163 (amilasa 21853), SEQ ID NO: 169 (AmyS) y SEQ ID NO: 171 (GlaA). Estas enzimas pueden codificarse mediante secuencias de ADN SEQ ID NO: 86 (xilanasa 043097), SEQ ID NO: 87 (celobiohidrolasa BD22308), SEQ ID NO: 88 (endoglucanasa BD25243), SEQ ID NO: 89 (xilanasa EU591743), SEQ ID NO: 90 (endoglucanasa de NtEGm), SEQ ID NO: 91 (celobiohidrolasa P0C2S1), SEQ ID NO: 92 (xilanasa P77853), SEQ ID NO: 93 (celobiohidrolasa O68438), SEQ ID NO: 94 (endoglucanasa O33897), SEQ ID NO: 164 (amilasa 19862), SEQ ID NO: 165 (glucoamilasa 20082), SEQ ID NO: 166 (glucoamilasa 20707), SEQ ID NO: 167 (amilasa 21853), SEQ ID NO: 168 (AmyS) y SEQ ID NO: 170 (GlaA).

Debido a que la actividad de las enzimas que degradan los polisacáridos en los tejidos de las plantas vivas puede interferir con el crecimiento o desarrollo de las plantas, puede ser útil expresar enzimas como precursores inactivos, por ejemplo, como proenzimas modificadas con inteína que pueden activarse después de que la biomasa se haya recolectado mediante la regulación de las condiciones bajo las cuales pueden activarse las inteínas (véanse las siguientes referencias para proenzimas modificadas con inteína que pueden utilizarse en la presente memoria. Solicitud de patente PCT/US03/00432 presentada el 01/07/2003, PCT/US2010/055669 presentada el 11/05/2010, PCT/US2010/055751 presentada el 11/05/2010, PCT/US2010/055746 presentada el 11/05/2010, Patente de EE. UU. 8.247.647 expedida el 21/08/2012 y Solicitud de patente de EE. UU. 12/590.444 presentada el 11/06/2009). Se proporcionan ejemplos de inteínas que pueden emplearse para este propósito como los polipéptidos SEQ ID NO: 95 (polipéptido de inteína AS146-7), SEQ ID NO: 96 (S158-30-108-35) y SEQ ID NO: 97 (T134-100-101), que pueden codificarse mediante las secuencias de ADN SEQ ID NO: 98 (AS 146-7), SEQ ID NO: 99 (S158-30-108-35) y SEQ ID NO: 100 (T134-100-101). Se proporcionan ejemplos de enzimas que incorporan tales inteínas como las SEQ ID NO: 101 (EU591743:AS146-7), SEQ ID NO: 102 (P77853:S158-30-108-35) y SEQ ID NO: 103 (P77853:T134-100-101), que pueden codificarse mediante las secuencias de ADN proporcionadas como la SEQ ID NO: 104 (EU591743:AS146-7), SEQ ID NO: 105 (P77853:S158-30-108-35) y SEQ ID NO: 106 (P77853:T134-100-101).

Los casetes de expresión pueden construirse de tal manera que la transcripción de CWDE esté dirigida por un promotor adecuado. Se proporcionan ejemplos de tales promotores como la SEQ ID NO: 55 (ZmUbi1P), SEQ ID NO: 56 (ZmPepCP) y SEQ ID NO: 57 (OsUbi3P). La transcripción de estos casetes se puede terminar empleando una señal de poliadenilación adecuada. Se proporciona un ejemplo de tal señal como la SEQ ID NO: 58 (terminador NOS). Además, la acumulación, la estabilidad y/o el direccionamiento subcelular de una enzima que degrada polisacáridos

dada puede modificarse expresándolas como fusiones con polipéptidos N-terminales o C-terminales adecuadamente elegidos. Se proporcionan ejemplos de tales polipéptidos como la SEQ ID NO: 107 (péptido señal BAASS), SEQ ID NO: 108 (péptido señal SEKDEL), SEQ ID NO: 109 (señal de direccionamiento xHvVSD), SEQ ID NO: 110 (fusión traduccional ZmUBQm), SEQ ID NO: 111 (xGZein27ss) y SEQ ID NO: 112 (señal HvAle), que puede codificarse mediante secuencias de ADN proporcionadas como SEQ ID NO: 113 (BAASS), SEQ ID NO: 114 (SEKDEL), SEQ ID NO: 115 (xHvVSD), SEQ ID NO: 116 (ZmUBQm), SEQ ID NO: 117 (xGZein27ss) y SEQ ID NO: 118 (HvAle).

La FIG. 28 ilustra la organización de un casete de expresión de CWDE que incluye (1) un elemento promotor, (2) péptido señal N-terminal, (3) una secuencia codificante para CWDE (negro), (4) péptido C-terminal y (5) un terminador transcripcional/señal de poliadenilación. En este ejemplo, la CWDE (negro) se expresa como una fusión traduccional con un péptido señal N-terminal así como con un péptido C-terminal.

Se proporcionan ejemplos de otros casetes de expresión de CWDE como la SEQ ID NO: 119 (ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD, SEQ ID NO: 120 (ZmPepCP: xGZein27ss:BD25243:SEKDEL), SEQ ID NO: 121 (OsUbi3P:EU591743), SEQ ID NO: 122 (ZmUbi1P:EU591743:AS146-7:SEKDEL), SEQ ID NO: 123 (ZmUbi1P:HvAle:NtEGm:SEKDEL), SEQ ID NO: 124 (ZmPepCP:HvAle:NtEGm:SEKDEL), SEQ ID NO: 125 (OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL), SEQ ID NO: 126 (OsUbi3P:BAASS:O33897), SEQ ID NO: 127 (ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL), SEQ ID NO: 128 (OsUbi3P:O68438), SEQ ID NO: 129 (OsUbi3P:P0C2S1), SEQ ID NO: 130 (ZmUbi1P: ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35 y SEQ ID NO: 131 (ZmUbi1P:BAASS:P77853:T134-100-101:SEKDEL).

Se pueden expresar múltiples CWDE y ARNh simultáneamente en plantas transgénicas mediante la construcción de un vector de transformación que tenga múltiples casetes de expresión unidos en tándem.

La FIG. 29 ilustra una de tales construcciones. La construcción incluye (1) un primer elemento promotor, (2) un conjunto de secuencias iniciadoras colocadas en orientaciones opuestas de modo que el transcrito de ARN sea autocomplementario en estas regiones, (3) un intrón o un elemento espaciador, (4) un primer terminador transcripcional/señal de poliadenilación, (5) un segundo elemento promotor, (6) un primer péptido señal N-terminal, (7) una secuencia codificante para una primera CWDE, (8) un primer péptido señal C-terminal, (9) un segundo terminador transcripcional/señal de poliadenilación, (10) un tercer elemento promotor, (11) un segundo péptido señal N-terminal, (12) una secuencia codificante para una segunda CWDE, (13) un tercer terminador transcripcional/señal de poliadenilación, (14) un cuarto elemento promotor, (15) una proteína de fusión N-terminal/ secuencia líder, (16) un tercer péptido señal N-terminal, (17) una secuencia codificante para una tercera CWDE y (18) un cuarto terminador transcripcional, señal de poliadenilación.

A continuación se encuentran descripciones de vectores que pueden usarse para introducir las construcciones descritas anteriormente en las células vegetales a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*.

pAG4003 (SEQ ID NO: 76) es un plásmido que porta un marcador de resistencia a la espectinomicina, un origen de replicación bacteriano, un borde derecho (RB) del ADN-T de *Agrobacterium* y un borde izquierdo (LB) del ADN-T de *Agrobacterium*. Entre el RB y el LB hay un marcador seleccionable de planta compuesto por un promotor de ubiquitina de maíz (ZmUbi1P), la secuencia codificante de la fosfomanosa isomerasa y el terminador NOS.

pAG4106 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 134) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35

pAG4107 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 135) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35

pAG4108 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 136) con ZmPepCP:ARNi de SbGWD1+ ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35

pAG4109 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 137) con ZmPepCP:ARNi de SbGWD2+ ZmUbi1P:xGZein27ss:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:ZmUBQm:BAASS:P77853:S158-30-108-35

pAG4110 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 138) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL:NOST + ZmPEPCP:BAASS:O43097:SEKDEL

pAG4111 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 139) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL:NOST + ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL

- pAG4112 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 140) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + ZmUbi1P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- 5 pAG4113 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 141) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + ZmUbi1P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- pAG4114 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 142) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + ZmPepCP:xGZein27ss:BD25243:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- 10 pAG4115 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 143) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + ZmPepCP:xGZein27ss:BD25243:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- 15 pAG4116 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 144) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- pAG4117 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 145) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- 20 pAG4120 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 146) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + OsUbi3P:P0C2S1 + OsUbi3P:HvAleSp:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:ZmUBQm: BAASS:P77853-T134-100-101:SEKDEL
- pAG4121 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 147) con ZmPEPCP:ARNi de ZmGWD2 + OsUbi3P:P0C2S1 + OsUbi3P:HvAleSp:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:ZmUBQm: BAASS:P77853-T134-100-101:SEKDEL
- 25 pAG4124 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento triple (SEQ ID NO: 148) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmPepCP:xGZein27ss:BD25243:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- pAG4125 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento triple (SEQ ID NO: 149) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmPepCP:xGZein27ss:BD25243:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- 30 pAG4206 es un derivado de pAG4003 que porta una construcción de apilamiento triple (SEQ ID NO: 219) con ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + OsUbi3P:HvAle:NtEGm:SEKDEL:NosT+ZmPepCP:BAASS:O43097:SEKDEL
- 35 pAG4514 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 150) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD1 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + ZmPepCP:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- pAG4515 es un derivado de pAG4003 (SEQ ID NO: 76) que porta una construcción de apilamiento cuádruple (SEQ ID NO: 151) con ZmPepCP:ARNi de ZmGWD2 + ZmUbi1P:xGZein27:BD22308:xHvVSD + ZmPepCP:HvAle:NtEGm:SEKDEL + ZmUbi1P:BAASS:EU591743:AS146-7:SEKDEL
- 40 **Ejemplo 15. Se puede recuperar más glucosa de las plantas transgénicas que acumulan almidón y expresan enzimas que degradan la pared celular**

Las plantas de control individual y de maíz transgénico que portaban la construcción 4110 o 4111 se cultivaron hasta la madurez en un invernadero. Se cosecharon hojas y tallos de las plantas maduras, senescentes, se secaron y se molieron. Se analizaron muestras de cada una para determinar el contenido de almidón, actividad de xilanasa y actividad de endoglucanasa usando (respectivamente) el Kit de ensayo de Almidón Total, sustratos cromogénicos Xylazyme y Cellazyme de Megazyme (Bray, Condado de Wicklow, Irlanda). Tal como se muestra en la FIG. 30, la biomasa de las plantas que portan las construcciones 4110 y 4111 acumulan más almidón que la planta de control, mientras que también expresa las enzimas xilanasa y endoglucanasa. Cuando la biomasa de estas plantas se trató previamente e hidrolizó como se describió anteriormente, fue posible recuperar más glucosa de las plantas transgénicas. Además, las plantas que acumularon almidón y enzimas que degradan la pared celular produjeron más glucosa que las plantas que solo expresaron las enzimas que degradan la pared celular, tal como se muestra en la FIG. 31.

Se entiende, por lo tanto, que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, pero está destinada a cubrir todas las modificaciones que están dentro del alcance de la invención tal como se define en las

reivindicaciones adjuntas; la descripción anterior; y/o se muestra en los dibujos adjuntos.

## Referencias

- Alvira, P et al., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technology*, 101(13), págs.4851-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042329> [Consultado el 18 de julio de 2012].
- An, G et al., 2005. Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant molecular biology*, 59(1), págs.111-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217606> [Consultado el 25 de julio de 2012].
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 2000. *Current Protocols in Molecular Biology Volumen 1*, John Wiley & Sons.
- Charles Abbas, Wuli Bao, Kyle Beery, Mike Cecava, Perry H. Doane, James L. Dunn, D.P.H., 2008. Solicitud de Patente Estadounidense de Abbas 2008 US20080220125.pdf., págs. 1-17.
- Chi-Ham CL et al., 2010. The intellectual property landscape for gene suppression technologies in plants. *Nature Biotechnology*, 28 (1):32-36.
- Christian, M et al., 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), págs.757-61. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2942870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado el 14 de julio de 2012].
- Frizzi A & Huang S, 2010. Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant biotechnology journal*, 8(6), págs.655-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331529> [Consultado el 24 de julio de 2012].
- Horiguchi G, 2004. RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. *Differentiation; research in biological diversity*, 72(2-3), págs.65-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066186>.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen J y Pease LR, 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77(1):61-68.
- Kavakli IH et al., 2002. Generation, characterization, and heterologous expression of wild-type and up-regulated forms of *Arabidopsis thaliana* leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta*, 215(3), págs.430-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111225> [Consultado el 25 de julio de 2012].
- Köttin, O et al., 2009. STARCH-EXCESS4 is a laforin-like Phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 21(1), págs.334-46. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado el 25 de julio de 2012].
- Krishnan A, Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Han CD, Lee MC, Yu SM, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Sundaresan V, Hirochika H, Leung H y Pereira A, 2009. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol.* 149:165-70.
- Maniatis T, Fritsch EF y J. Sambrook J, 1982. *Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Obana Y et al., 2006. Enhanced turnover of transitory starch by expression of up-regulated ADP-glucose pyrophosphorylases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 170(1), págs.1-11. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945205002670> [Consultado el 25 de julio de 2012].
- Puchta H, Dujon B y Hohn B, 1993. Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic acids research*, 21(22), págs.5034-40. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=310614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sikora P et al., 2011. Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International journal of plant genomics*, 2011, p.314829. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3270407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado el 25 de julio de 2012].
- Smith AM y Zeeman SC, 2006. Quantification of starch in plant tissues. *Nat. Protocols* 1:1342-1345
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG y Waterhouse PM, 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNA., *Nature* 407:319-20.
- Smith TF, Waterman MS, 1981. Identification of Common Molecular Subsequences. *J Mol Biol* 147: 195 -197.
- Stitt M & Zeeman, Samuel C, 2012. Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current opinion in plant biology*, 15(3), págs.282-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541711> [Consultado el 16 de julio

de 2012].

Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA y Green AG, 2002. hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol.* 129 (4): 1723-31.

5 Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, Comai L, 2007 Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.* 7:19.

Vainstein A et al., 2011. Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors. *Trends in biotechnology*, 29(8), págs.363-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536337> [Consultado el 30 de julio de 2012].

10 Warthmann N et al., 2008. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PloS one*, 3(3), p.e1829. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2262943&tool=pmcentre&rendertype=abstract> [Consultado el 25 de julio de 2012].

15 Wehrkamp-Richter S et al., 2009. Characterisation of a new reporter system allowing high throughput in planta screening for recombination events before and after controlled DNA double strand break induction. *Plant physiology and biochemistry: PPB/ Société française de physiologie végétale*, 47(4), págs.248-55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136269> [Consultado el 17 de julio de 2012].

Wright D et al., 2005. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 44(4), págs.693-705. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262717> [Consultado el 19 de julio de 2012].

20 Yu TS et al., 2001. The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *The Plant cell*, 13(8), págs.1907-18. Disponible en: =abstract.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L y Miller W, 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una planta genéticamente modificada que comprende un primer ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 50 y un segundo ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 86, una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 87 y una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 90.
2. La planta genéticamente modificada de la reivindicación 1 que comprende además un promotor operativamente unido a al menos uno del primer ácido nucleico aislado o del segundo ácido nucleico aislado.
- 10 3. Una construcción genética que comprende un primer ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 50 y un segundo ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 86, una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 87 y una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 90.
- 15 4. La construcción genética de la reivindicación 3 que comprende además un promotor operativamente unido a al menos uno del primer ácido nucleico aislado o del segundo ácido nucleico aislado.
- 20 5. Un método de procesamiento agrícola o preparación de piensos para animales que comprende proporcionar una planta genéticamente modificada que comprende un primer ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 50 que codifica un producto de ácido ribonucleico que inactiva o inhibe la expresión de al menos un gen que codifica una proteína implicada en la movilización de almidón en una planta y un segundo ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 86, una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 87 y una secuencia con al menos el 90 % de identidad con una secuencia de SEQ ID NO: 90.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en donde la planta genéticamente modificada comprende además un promotor operativamente unido a al menos el primer ácido nucleico aislado o el segundo ácido nucleico aislado.
- 30 7. El método de una de las reivindicaciones 5 a 6, que comprende además tratar previamente la planta genéticamente modificada con una formulación química para formar una mezcla, preferiblemente, en donde la mezcla tiene una relación líquida a sólido seleccionada del valor menor que o igual a uno de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; y/o en donde el tratamiento previo incluye incubar la mezcla durante un período de menos que o igual a uno de 16 horas, 15 horas, 14 horas, 13 horas, 12 horas, 11 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora; y/o en donde el tratamiento previo incluye proporcionar una temperatura de mezcla de 40 °C a 120 °C.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en donde la formulación química incluye al menos un resto que comprende un ion seleccionado del grupo que consiste en: sulfito, bisulfito, sulfato, carbonato, hidróxido y óxido; y/o en donde el tratamiento previo incluye proporcionar una mezcla a un pH que varía de 1,0 a 12,0.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el al menos un resto incluye además un contraión seleccionado del grupo que consiste en: amonio, sodio, magnesio y calcio.
- 40 10. El método de la reivindicación 7, en donde la formulación química incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un ácido sulfúrico, una base, bisulfito de amonio y carbonato de amonio.
- 45 11. El método de la reivindicación 7 que comprende además la hidrolización de la mezcla, preferiblemente, en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla durante un período de menos de o igual a uno de 144 horas, 140 horas, 130 horas, 120 horas, 110 horas, 100 horas, 90 horas, 80 horas, 70 horas, 60 horas, 50 horas, 40 horas, 30 horas, 20 horas, 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora; y/o en donde la etapa de hidrolización incluye incubar la mezcla a una temperatura de 100 °C o menos.
- 50 12. El método de la reivindicación 11 que comprende además la hidrolización de la planta genéticamente modificada con una o más enzimas exógenas.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende además la exposición de la planta genéticamente modificada a un organismo fermentador en condiciones de fermentación para producir un producto químico, preferiblemente, en donde la una o más enzimas exógenas se selecciona del grupo que consiste en: una glucosidasa, una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una glucosidasa, una β-xilosidasa, una celulasa, una xilanasa, una amilasa, una invertasa, una proteasa, una fitasa, una enzima hidrolítica, una glucanasa, una hemicelulasa, una esterasa, una lacasa, una

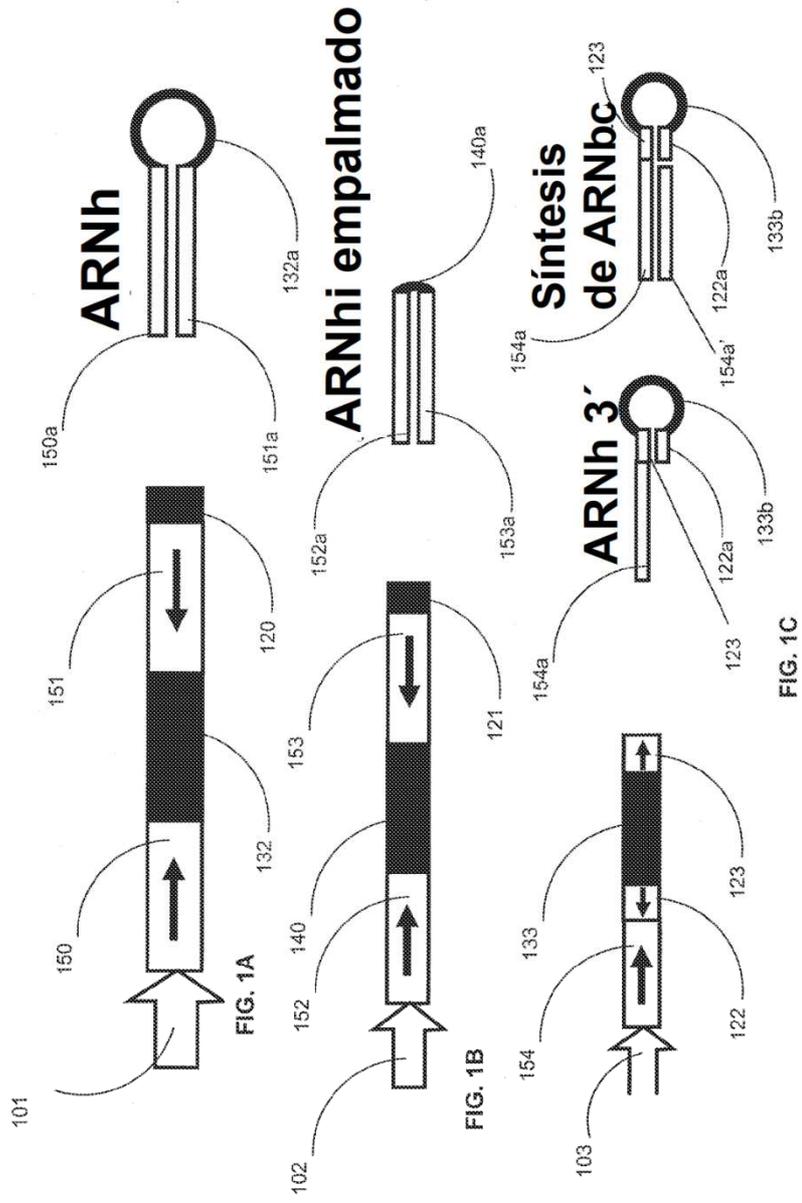
mananasa y una peroxidasa.

5 14. El método de la reivindicación 5 que comprende además al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en: secar la planta genéticamente modificada, granular la planta genéticamente modificada en gránulos de pienso, ensilar la planta genéticamente modificada para hacer ensilado y combinar la planta genéticamente modificada con granos destiladores o con una fuente de fibra comestible, preferiblemente, en donde la fuente de fibra comestible se selecciona del grupo de plantas que consiste en: maíz, sorgo, trigo, centeno, semillas de soja, grano de maíz, grano de sorgo, grano de trigo, grano de centeno, harina de soja, harina de maíz, aceite de maíz y germen de maíz.

10 15. El método de la reivindicación 5, que comprende además alimentar a un animal con la planta genéticamente modificada para promover el crecimiento del animal, preferiblemente, en donde el animal se selecciona del grupo que consiste en: pollos, cerdos y vacas.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 - 15, en donde la etapa de proporcionar incluye producir la planta genéticamente modificada usando transformación mediada por *Agrobacterium*-con la construcción genética.

15 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en donde la planta genéticamente modificada se selecciona del grupo que consiste en: maíz, soja, arroz, caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, mijo, miscanto, eucalipto, sauce y álamo.



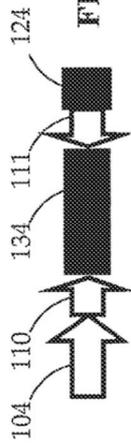


FIG. 1D

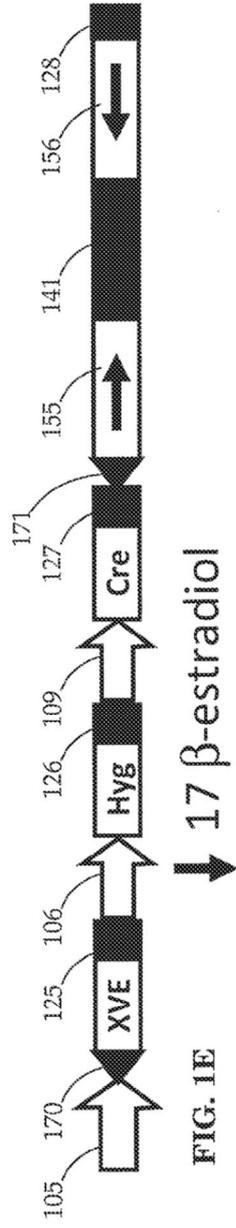


FIG. 1E

↓ 17 β-estradiol

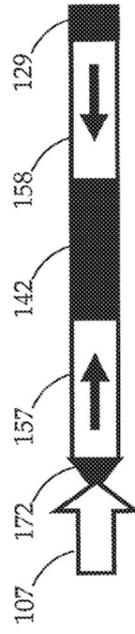


FIG. 1F

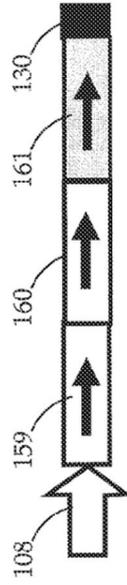


FIG. 1G

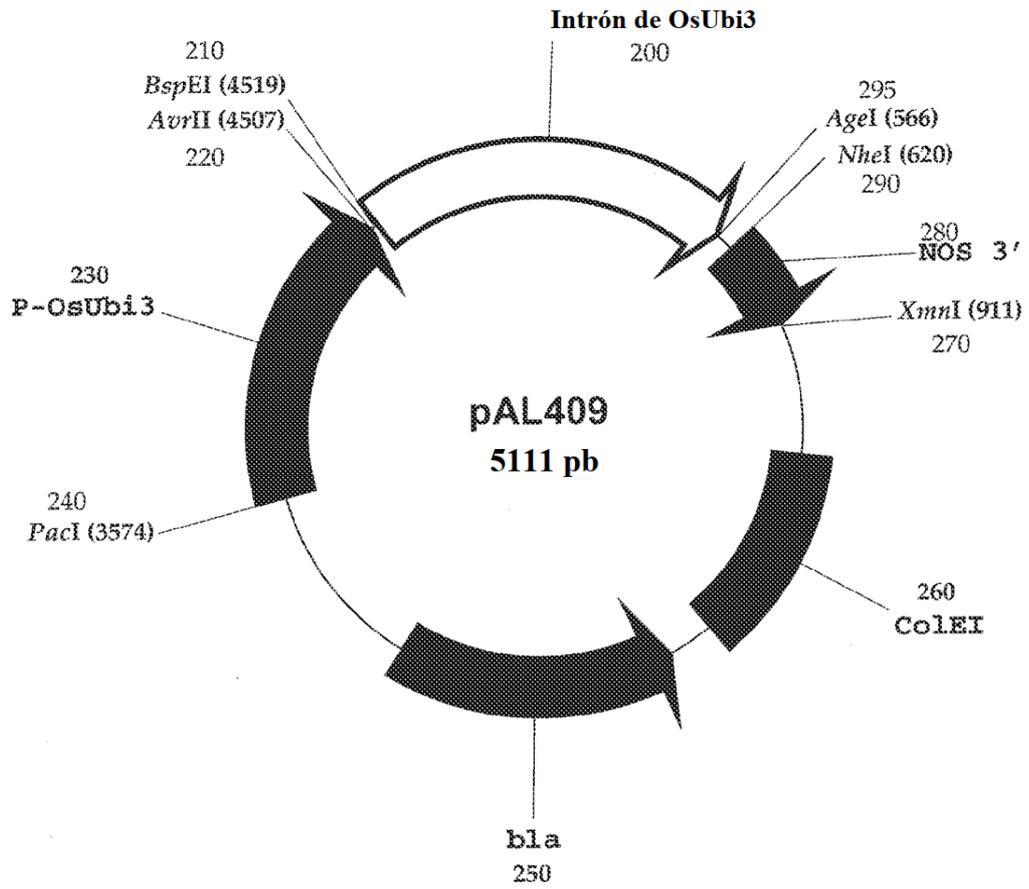


FIG. 2



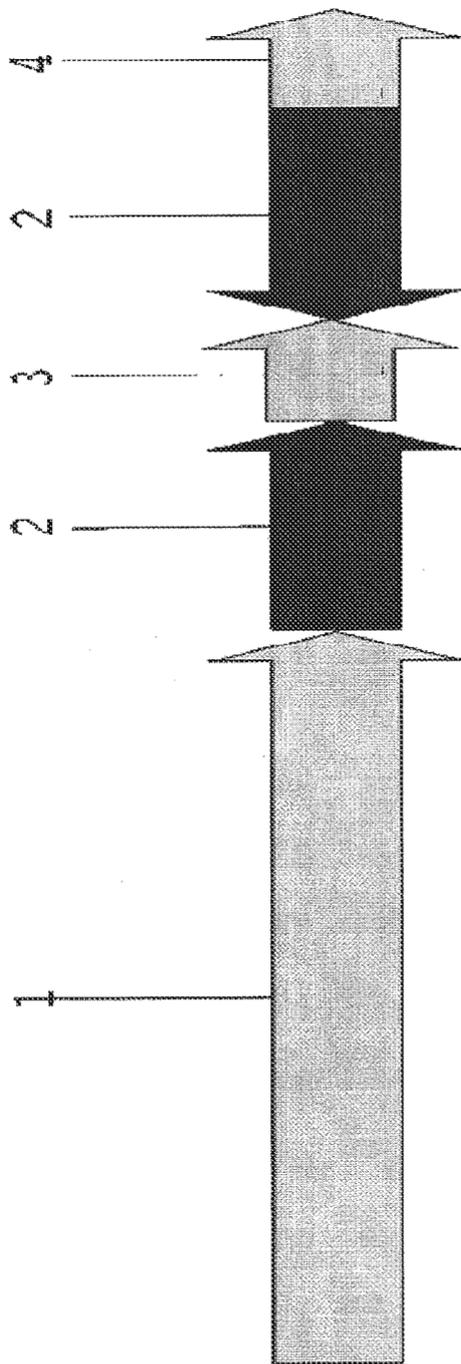


FIG. 4

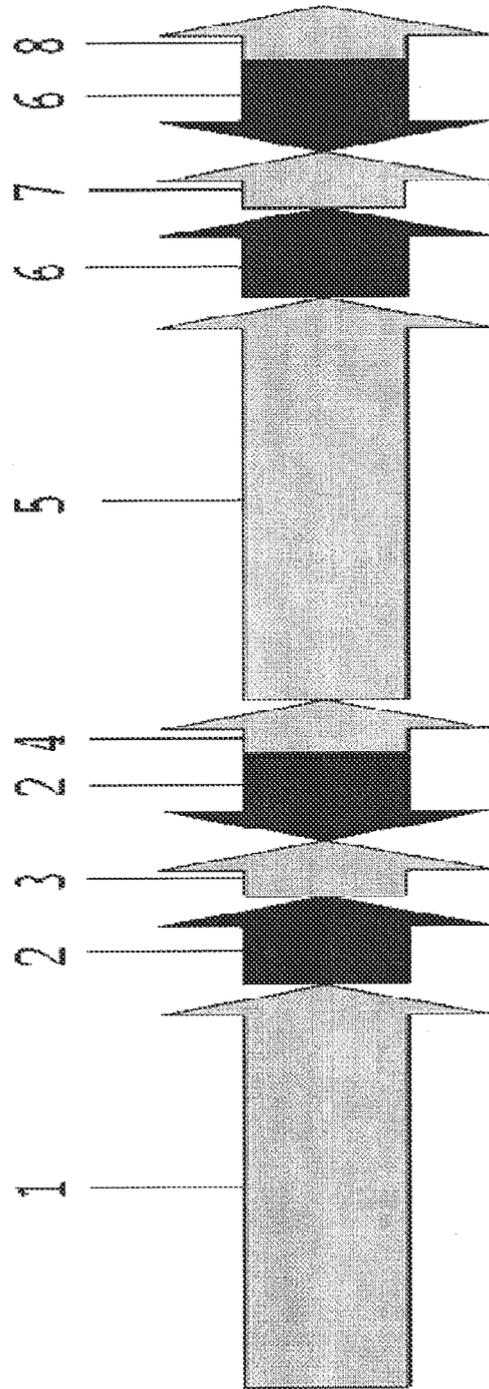


FIG. 5

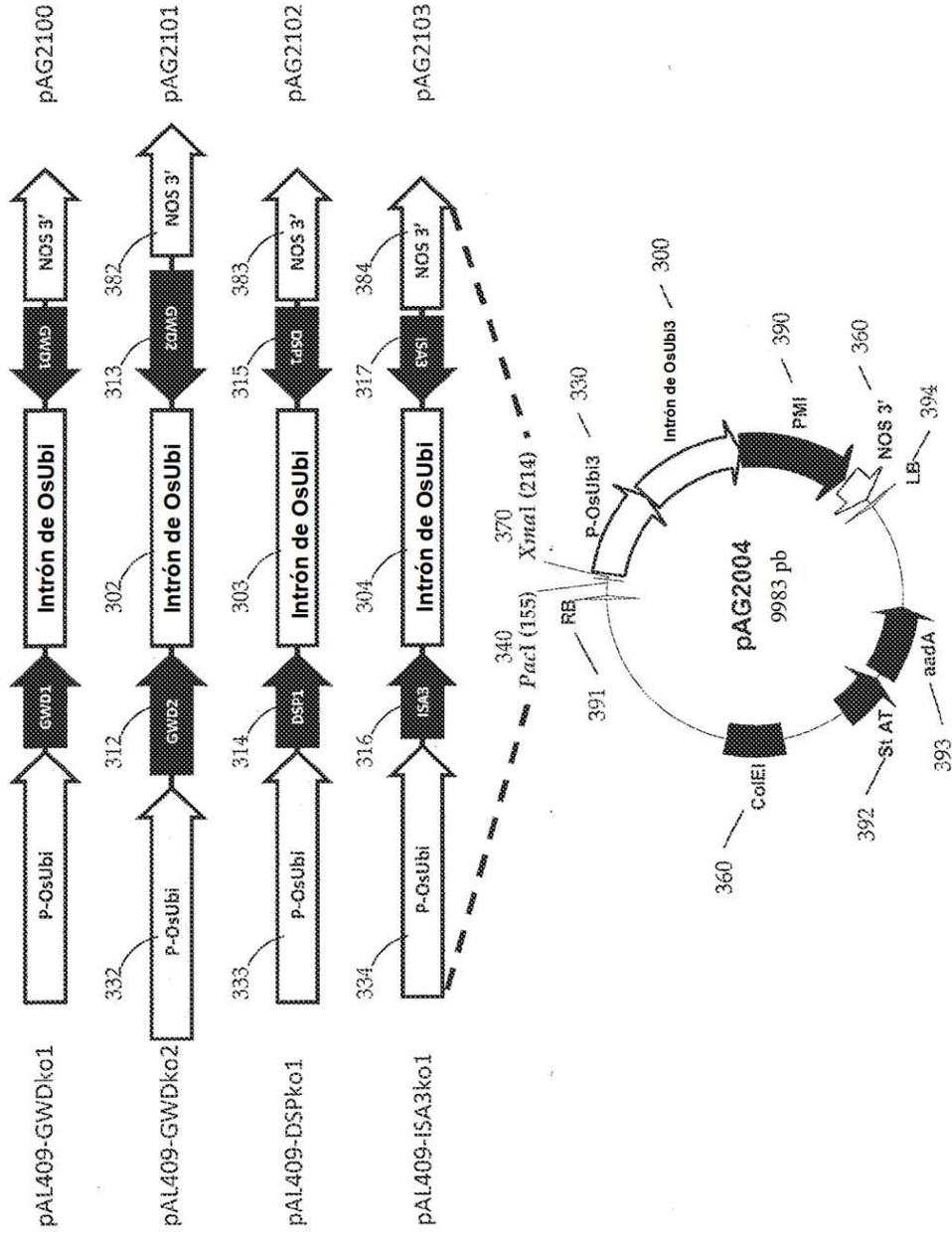


FIG. 6

ES 2 774 426 T3

gb | EU908574.1 | ARNm de glucano, agua dicinasa (GWD) de Solanum lycopersicum, cds completo  
 Longitud=4398

Puntuación = 292 bits (158), Esperado = 2e-82  
 Identidades = 403/519 (77 %),  
 Huecos = 26/519 (5 %) Cadena=Más/más

Consulta	49	TGGAATTTTGTGGATTAGGTTTCATGGCTACAAGGCAACTAATATGGAACAAGAACTA	108
Objeto	1803	TGGAATTCCTGTATGGATGAGGTTTCATGGCTACAAGGCAGCTGATA'GGAACAAAACTA	1862
Consulta	109	CAATGTGAAGCCACGTGAGATAAGCAAAGCACAGATAGGTTTACAGATGAT-CTTG-AG	166
Objeto	1863	TAACGTGAAACCACGTGAAATAAGCAAGGCTCAGGACAGACTTACAGA-CTTGC-TGCAG	1920
Consulta	167	AAT-ATGTACAGAACTTACCCACAATATCAG-GAGATC-TTAAAGAATGATAATGTCTGCT	223
Objeto	1921	AATGCT-TTCACCAGTCATCCTCAGTA-CCGTGA-AACTTTGCGGATGATTATGTCAACT	1977
Consulta	224	GTTGGTCGGGGAGGTGAAGGTGATGTTGGTCAACGCATTCGTGATGAGATAT'TAGTAATC	283
Objeto	1978	GTTGGACGTGGAGGTGAAGGGGATGTAGGACAGCGAATTAGGGACGAAATTTTGGTCATC	2037
Consulta	284	CAGA-GAAATAATGACTGCAAAGGTGGAATGATGGAGGAGTGGCACCAGAAATGCACAA	342
Objeto	2038	CAGAGGAAA-AATGACTGCAAGGGTGGTATGATGGAAGAATGGCATCAGAAATTCATAA	2096
Consulta	343	CAATACAAGCCAGATGATGTAGTGTATCTGCCAGGCCCT-ACTTGATTATATCAAGAGTG	401
Objeto	2097	TAACTACTAGTCTGTATGATGTTGTGATCTGTCAGGCACTGA-TTGACTACATCAAGAGTG	2155
Consulta	402	ATTTTGATATTTGGTGTTTACTGGGACACCTTGAAAAAAGAT-GGTATAACAAAAGAGCGT	460
Objeto	2156	ATTTTGATATTTGGTGTTTATTTGGAAAACCCTGAAATGA-GAACGGAATTACAAAAGAGCGT	2214
Consulta	461	CTATTTGAGCTATGATCGACCGATTCATTCAGAGCCAAAATTCAGGAGTGA-A-CAGAAAG	518
Objeto	2215	CTTTTGAGTTATGACCGTGCTATCCATTCGAAACCAAAATTTAG-AG-GAGATCA-AAAG	2271
Consulta	519	-ATGG-CTTACTCCGTGACTTGGG-CAATTATATGAGAA	554
Objeto	2272	GATGGTCTTT-TGCGTGATTTAGGTCCT-ATATGAGAA	2308

FIG. 7

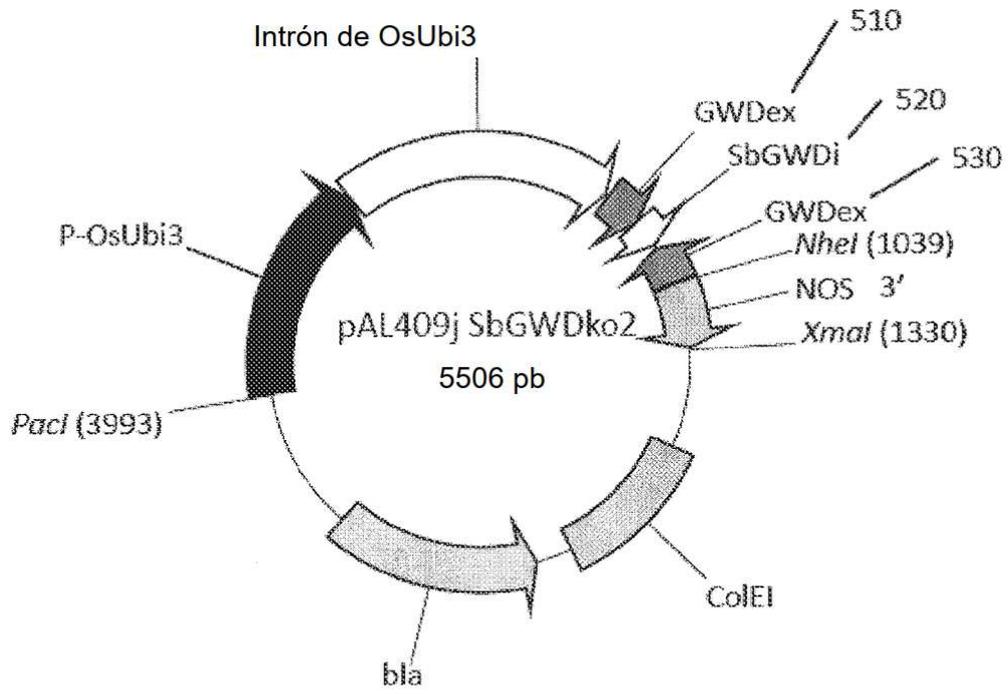


FIG. 8

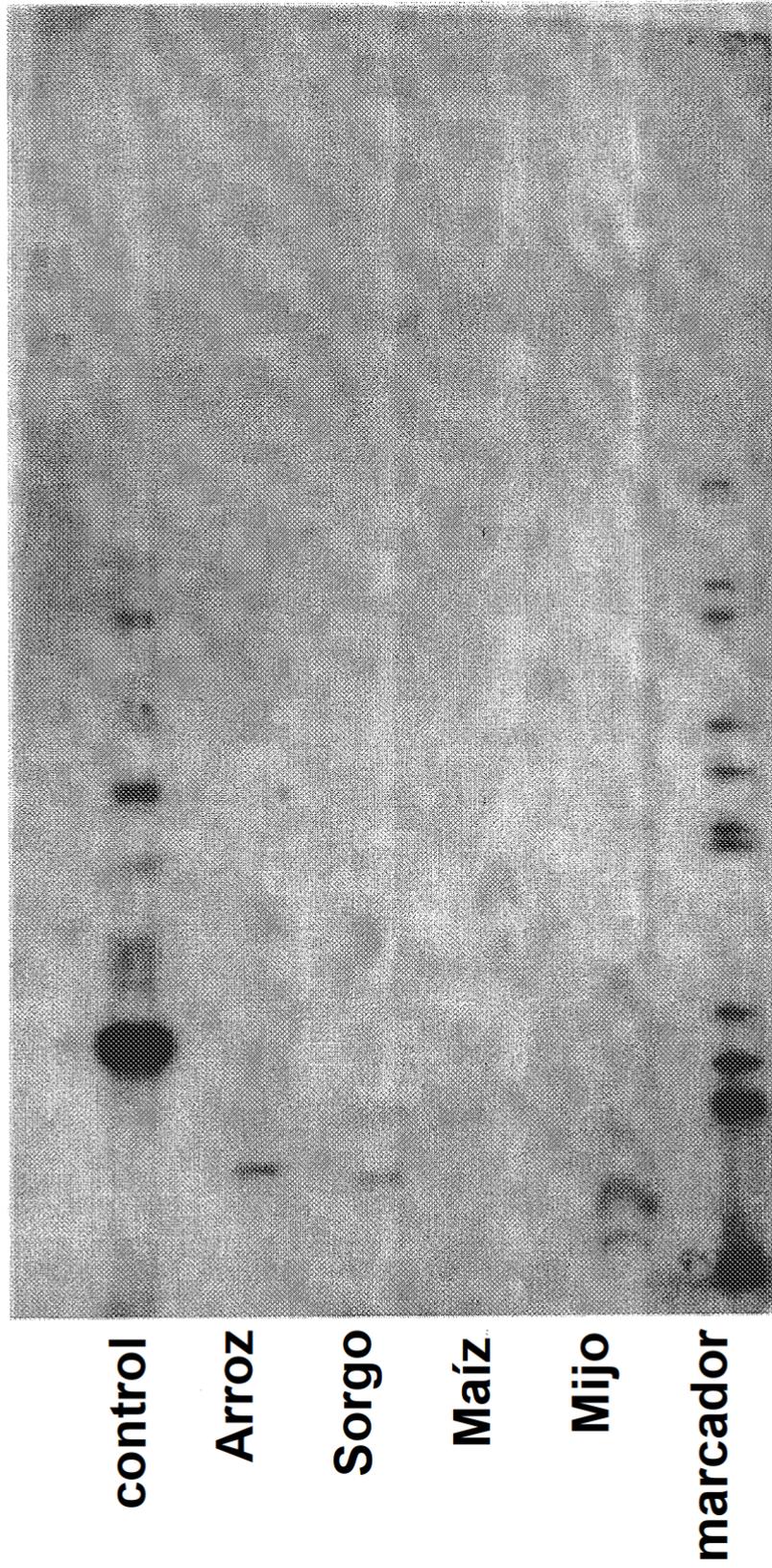


FIG. 9

Alineación de múltiples especies

OsCWD	TGGAATTTTTGTTTGGATTAGGTTTCATGGCTACAAGGCA
SbGWD	TGGACTTTTTGTTTGGATTAGGTTTCATGGCTACCAGGCA
ZmGWD	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGATTCATGGCTACCAGGCA
SlGWD	TGGAATTC TTGTATGGATGAGGTTTCATGGCTACAAGGCA
dgGWDup2	TGGAATTY TTGTWTGGATKAGR TTCATGGCTACMAGGCA
OsGWD	AGAGCGTCTATTGAGCTATGATCGACCGATTTCATTCAGAGCC
SbgWD	AGAGCGTCTCTTGAGCTATGATCGTGCTATTCATTCAGAACC
ZmGWD	AGAGCGTCTCTTGAGCTATGATCGTGCTATTCATTCAGAACC
SlGWD	AGAGCGTCTTTTGAGTTATGACCGTGCTATCCATTC TGAACC
dgGWDdown2	AGAGCGTCTHTTGAGYTATGAYCGWSCKATYCATTCWGARCC

FIG.10



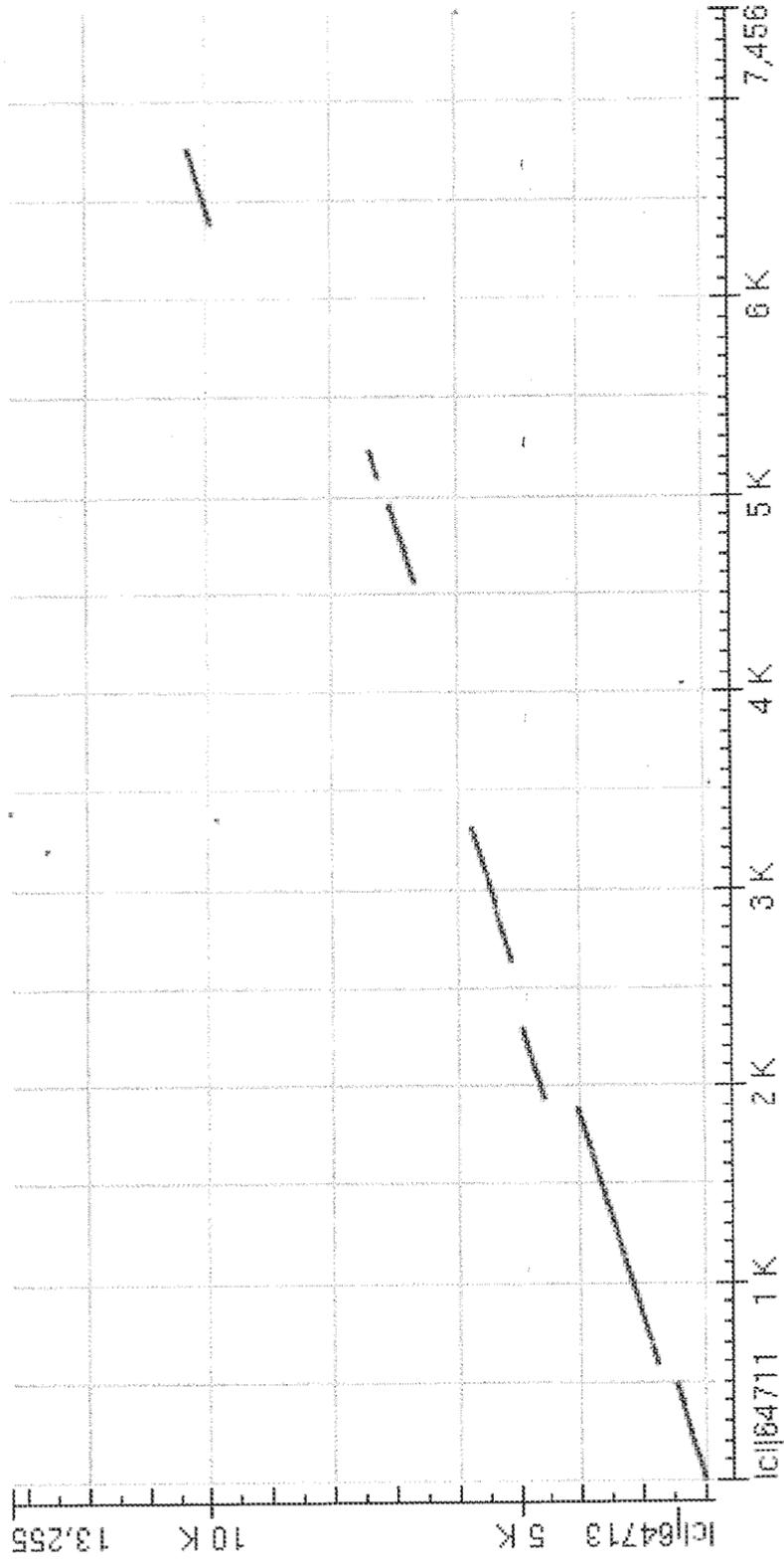


FIG. 12

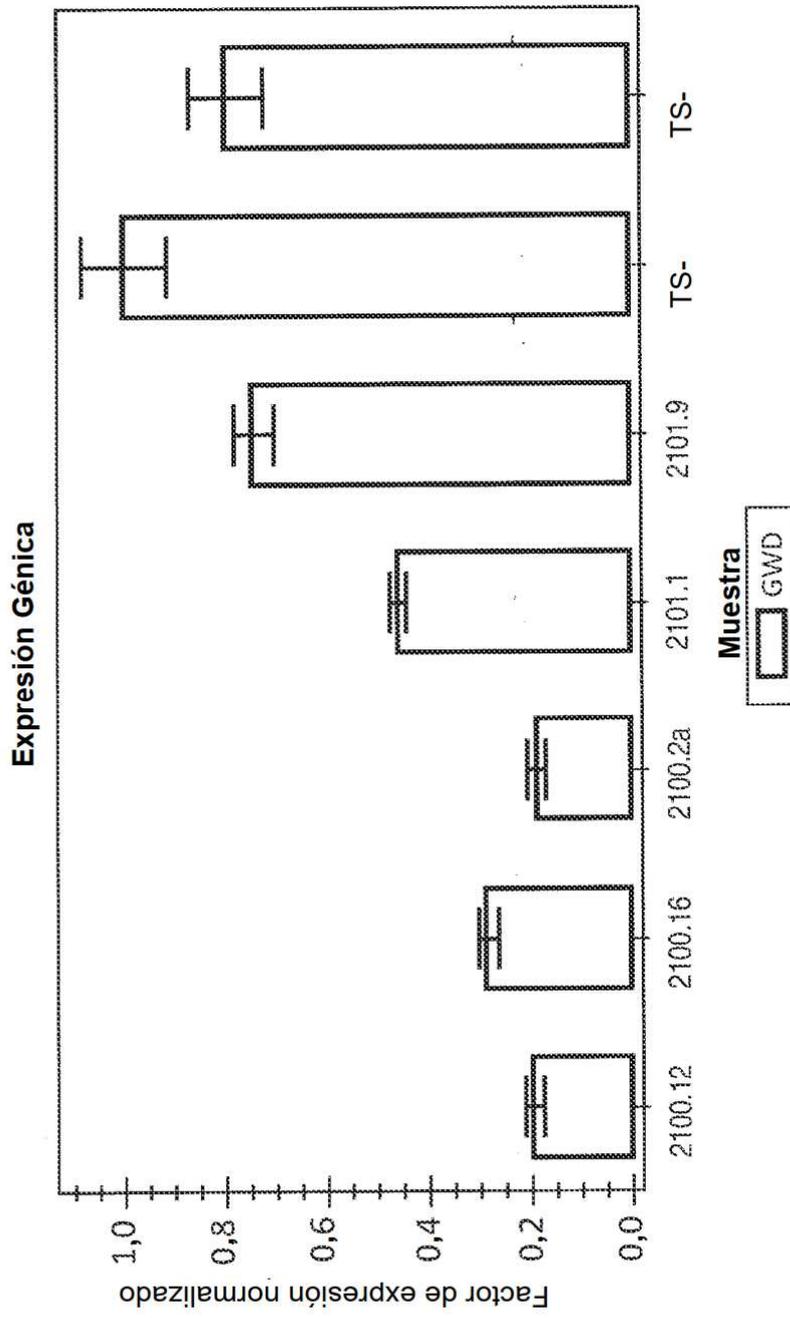


FIG. 13

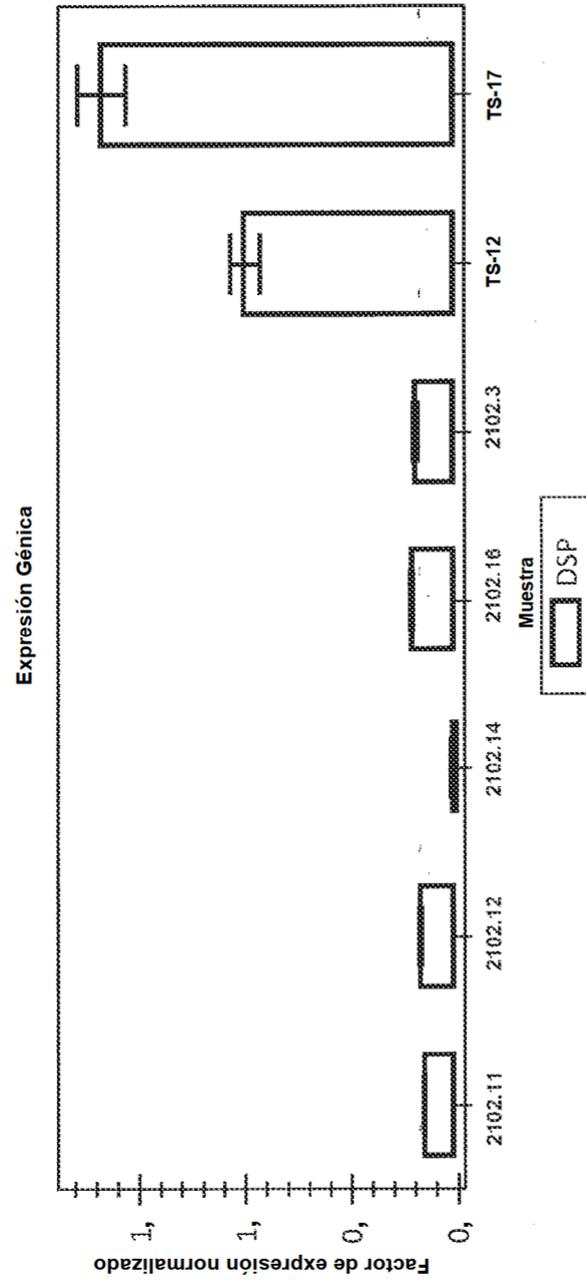


FIG. 14

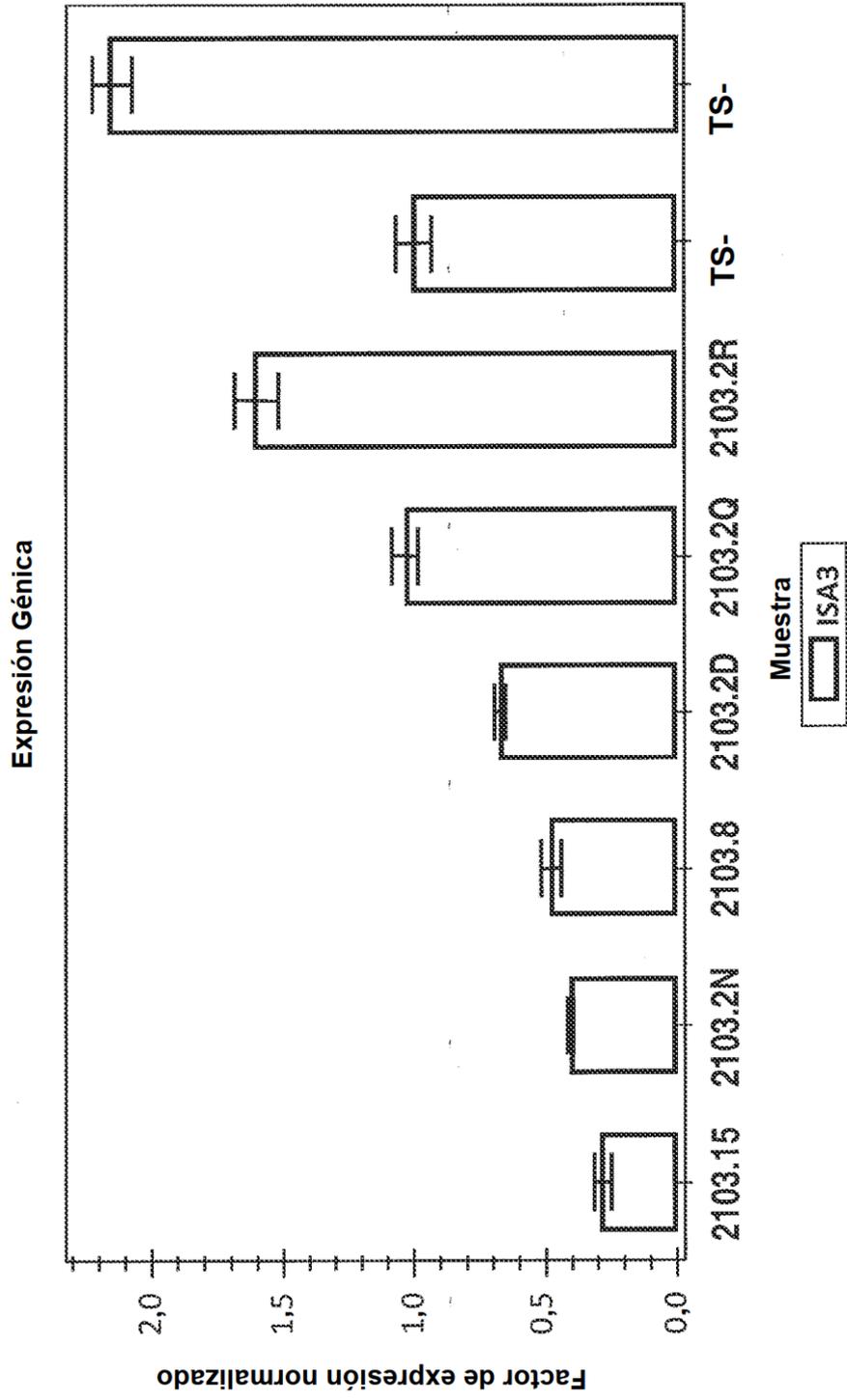


FIG. 15

Expresión del gen GWD en maíz transgénico silenciado con ARNi (pAG4102, pAG4103)

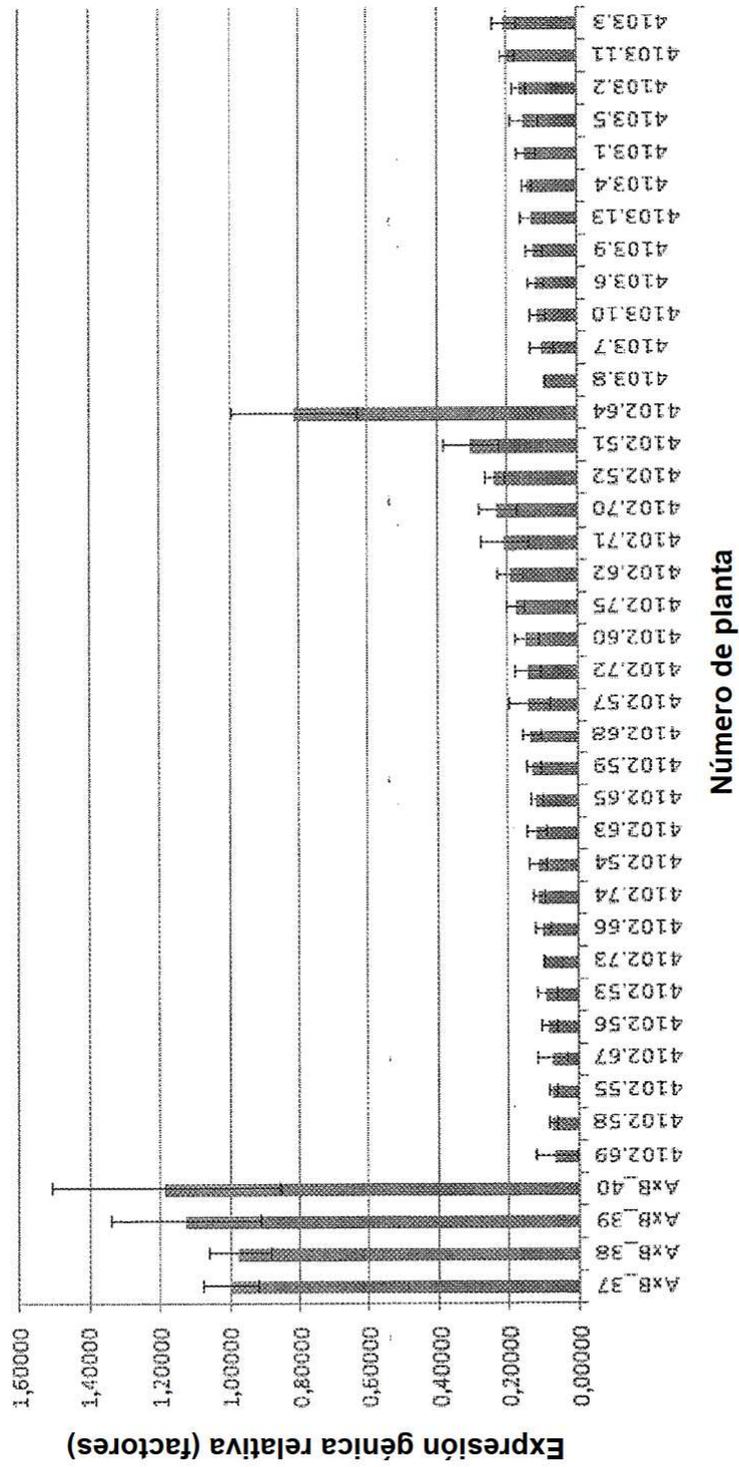
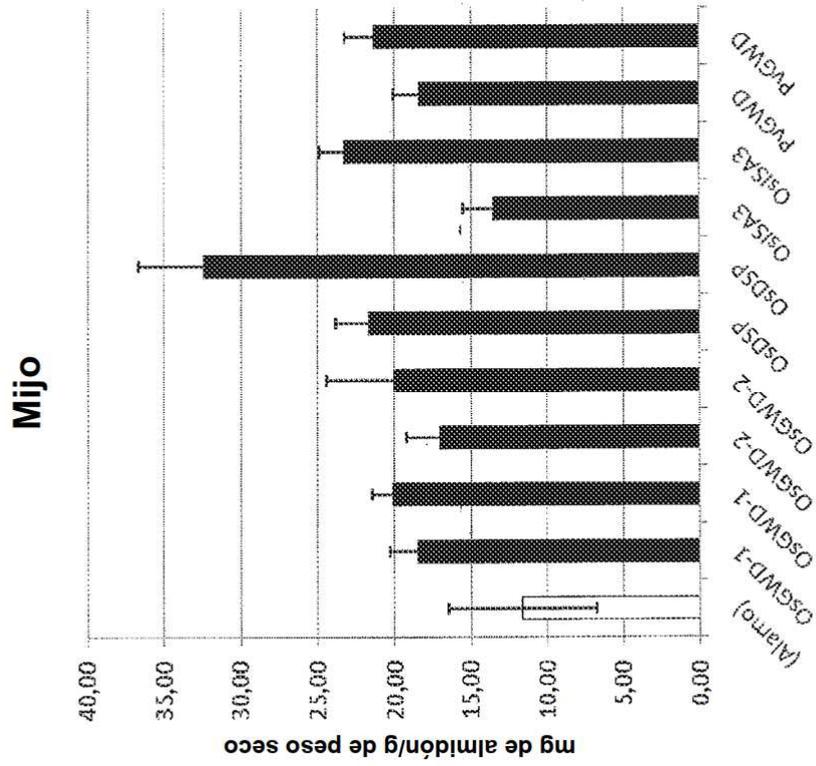
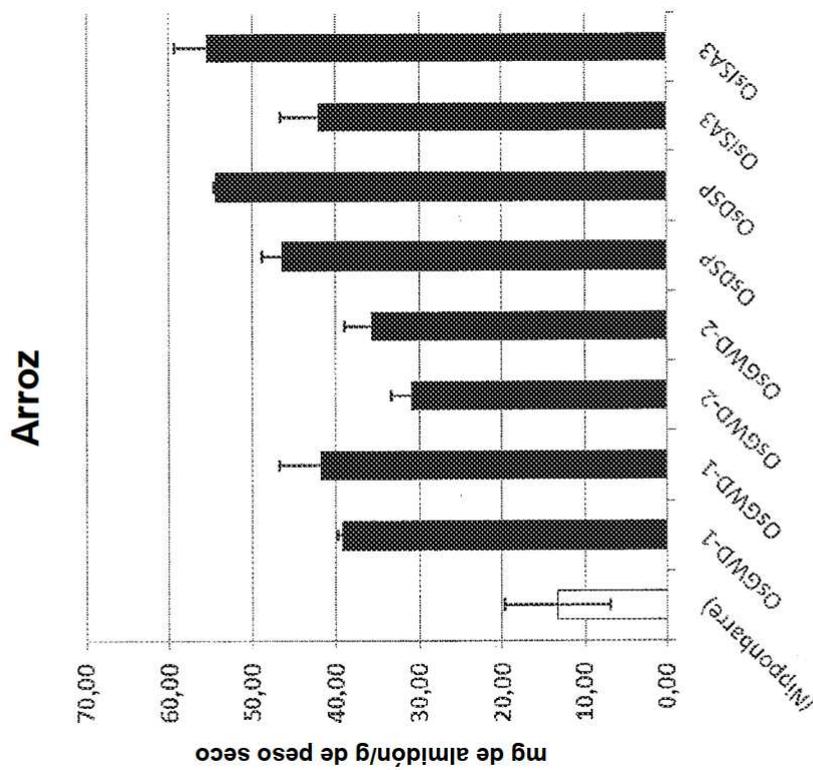


FIG.16



Gen dirigido

FIG. 17B



Gen dirigido

FIG. 17A



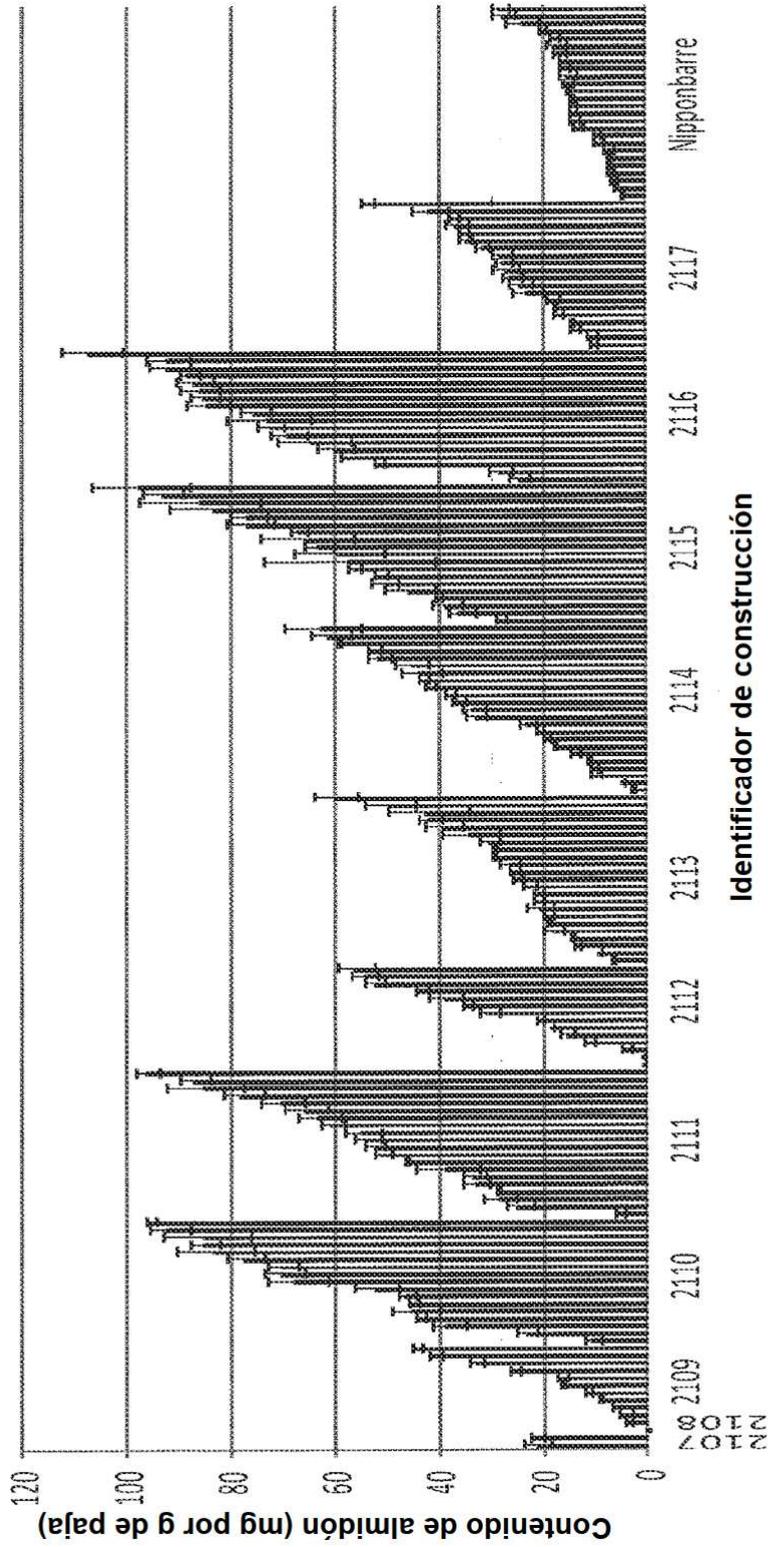


FIG.19

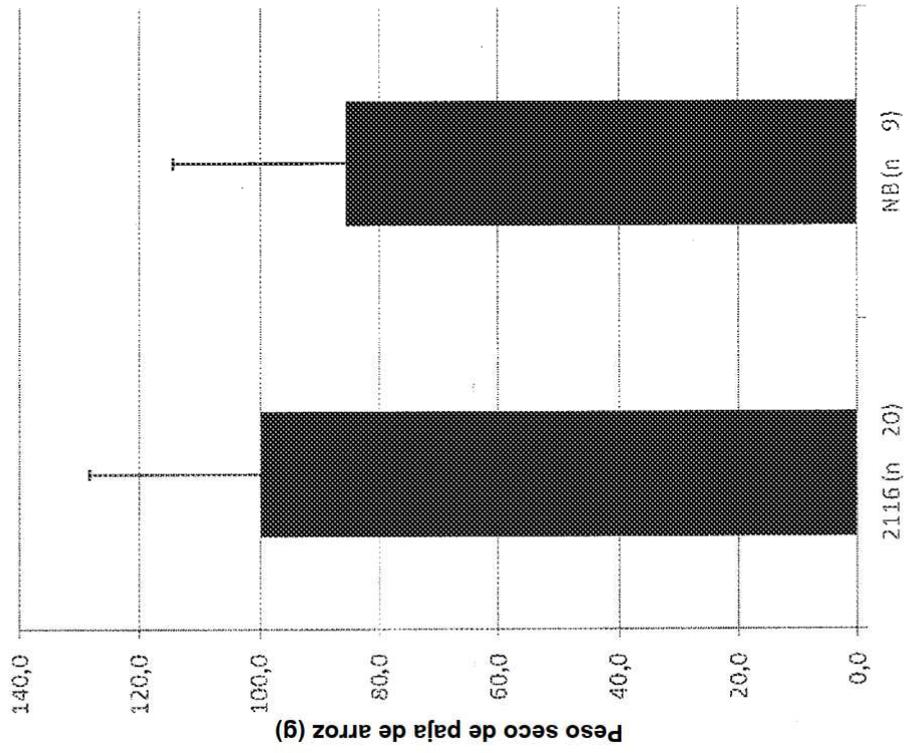


FIG.20

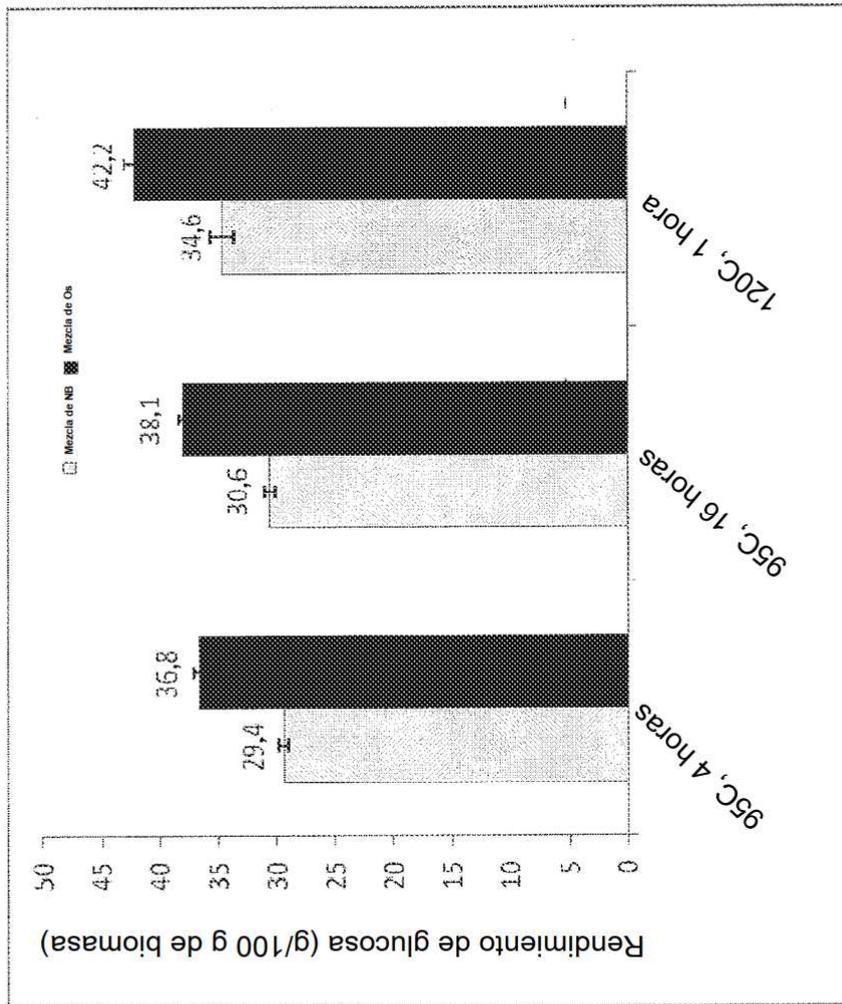


FIG.21

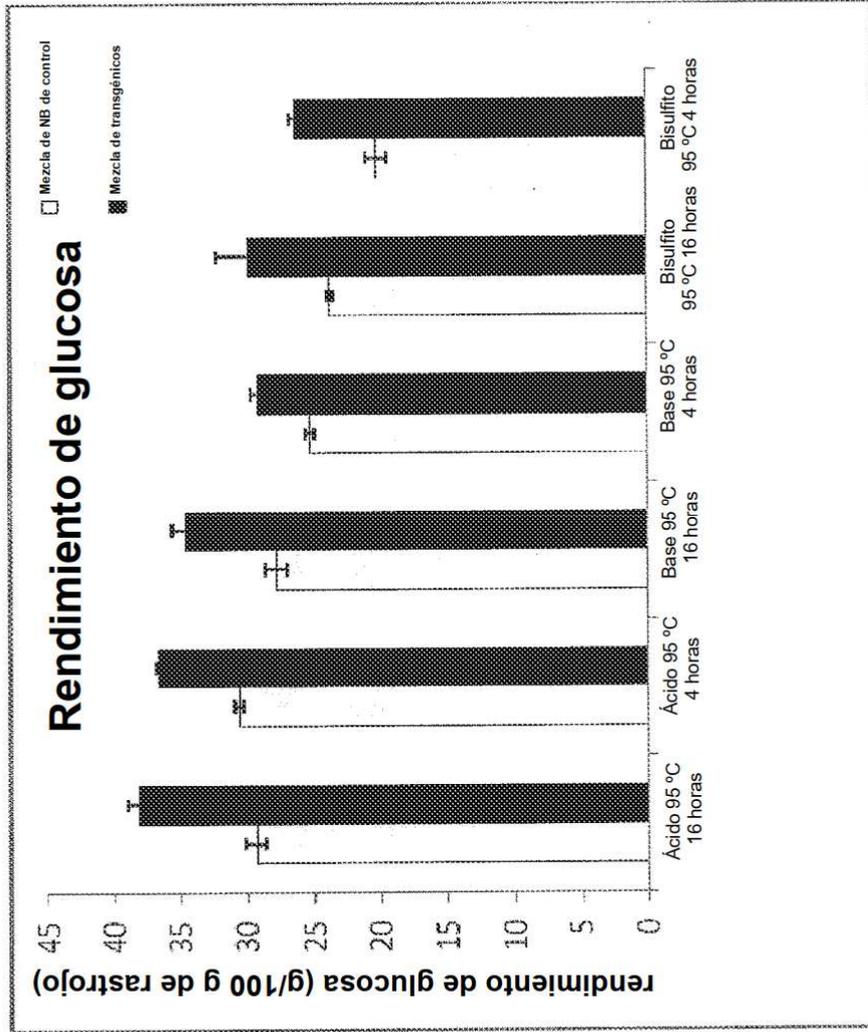


FIG.22

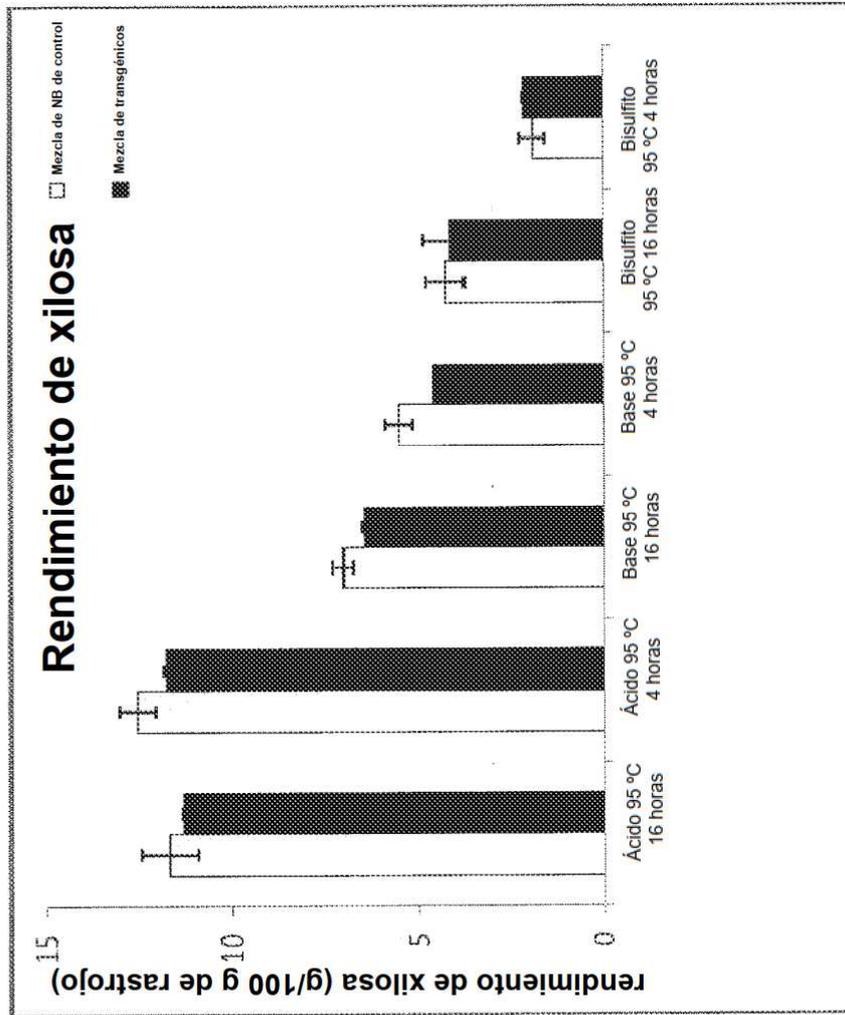


FIG.23

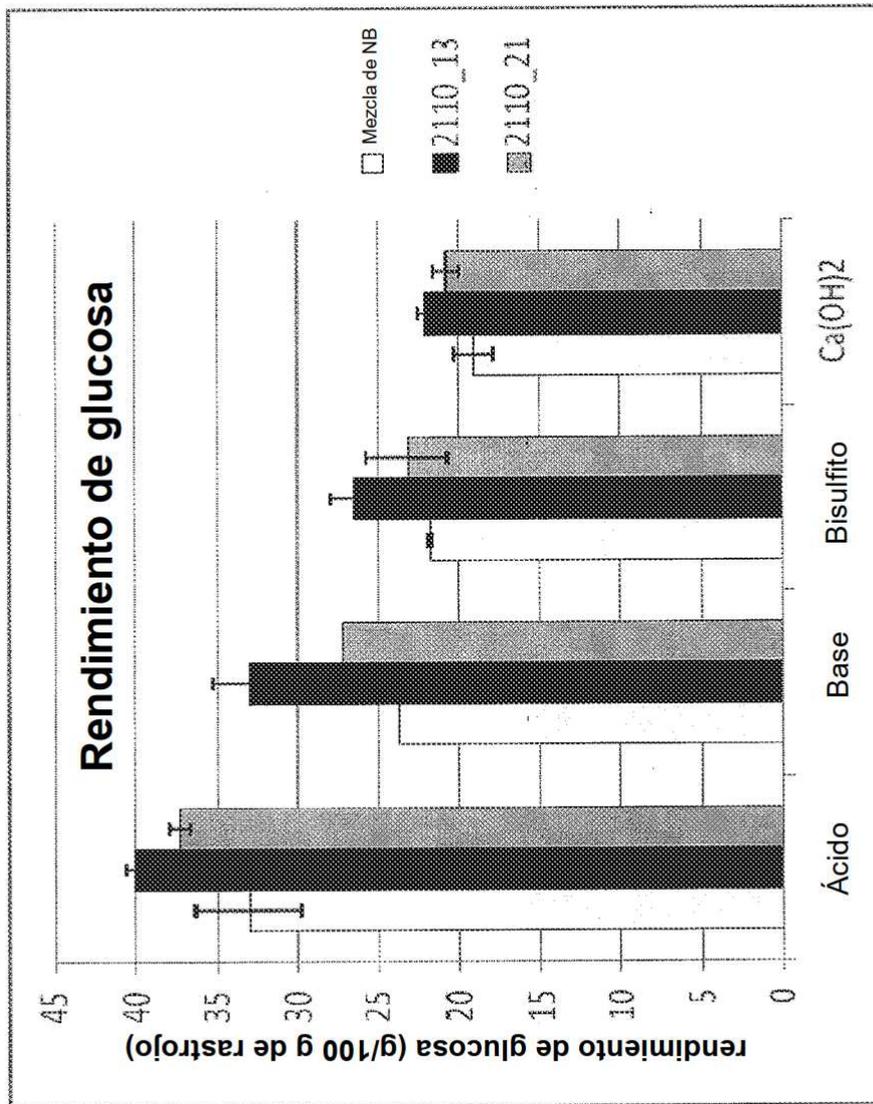


FIG.24

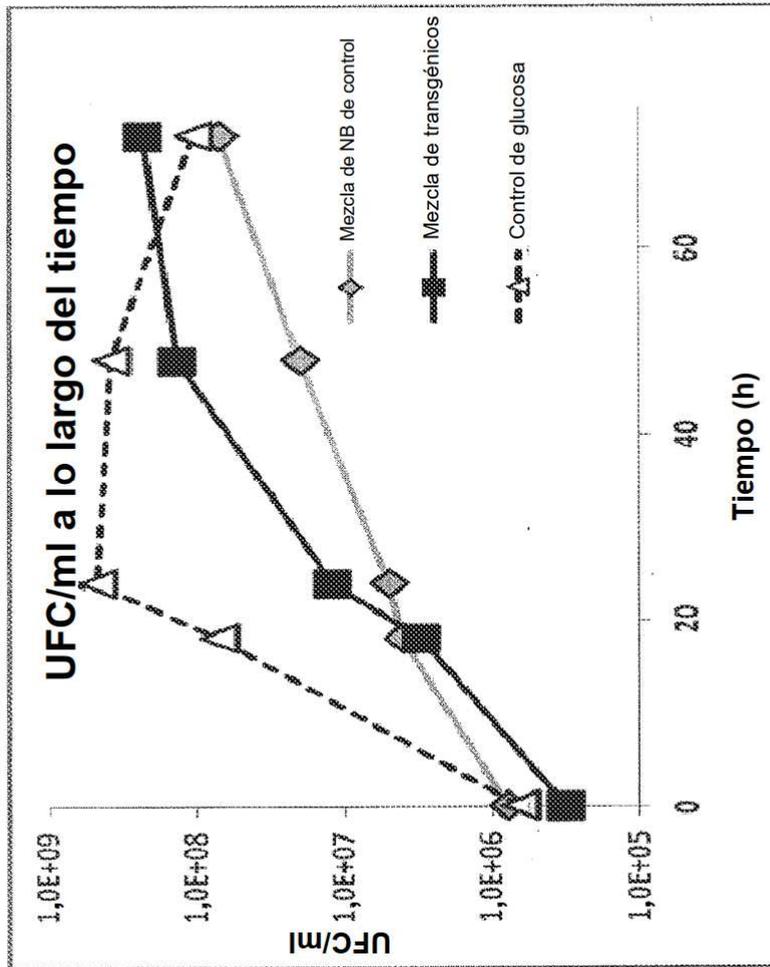


FIG.25

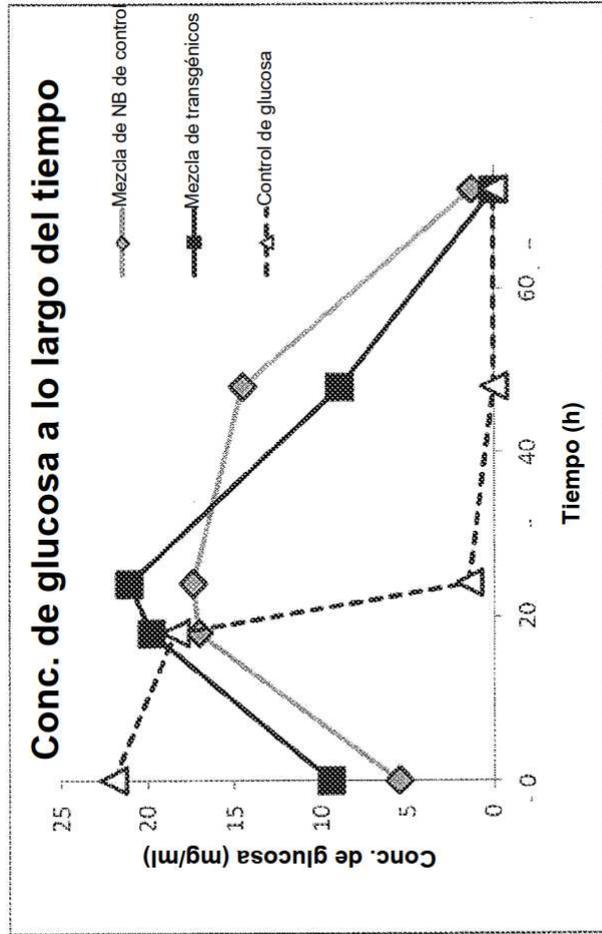


FIG.26

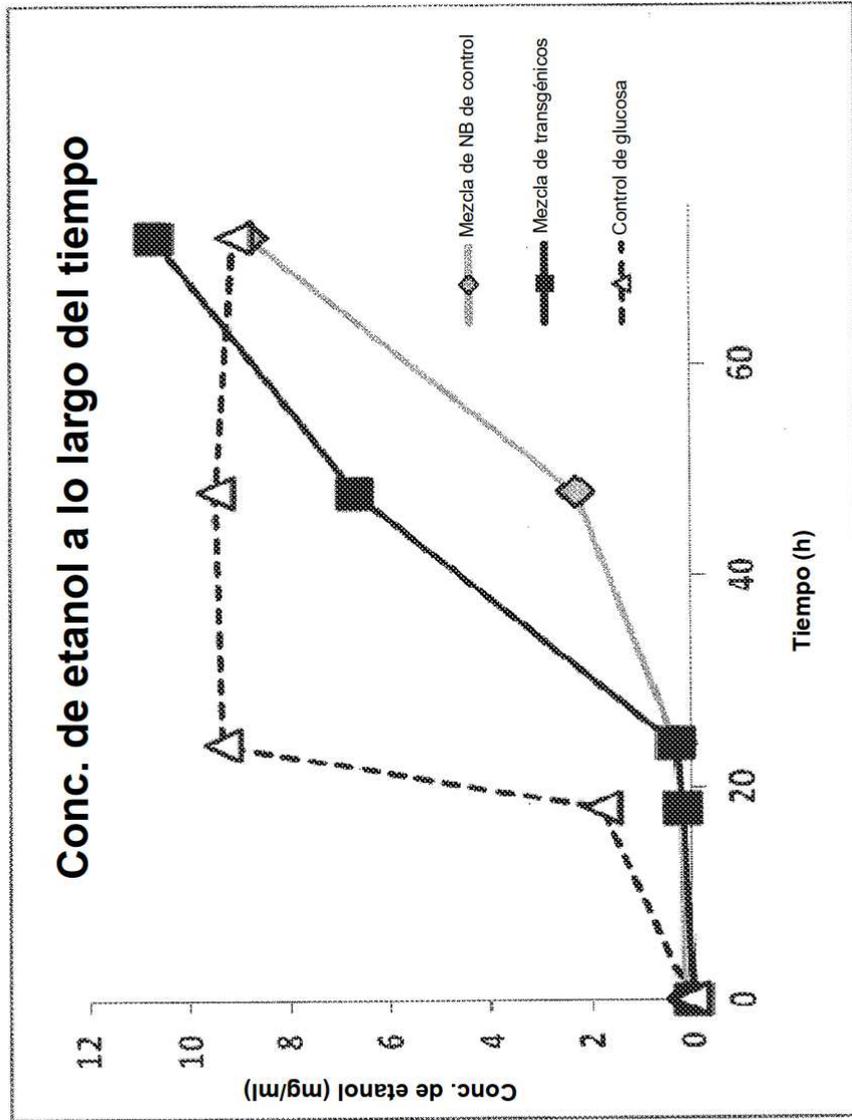


FIG.27

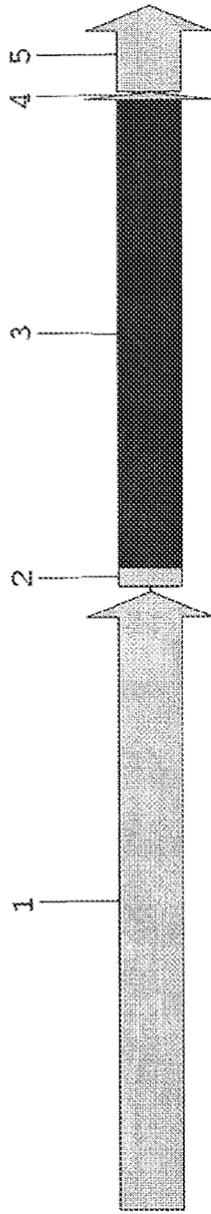


FIG.28

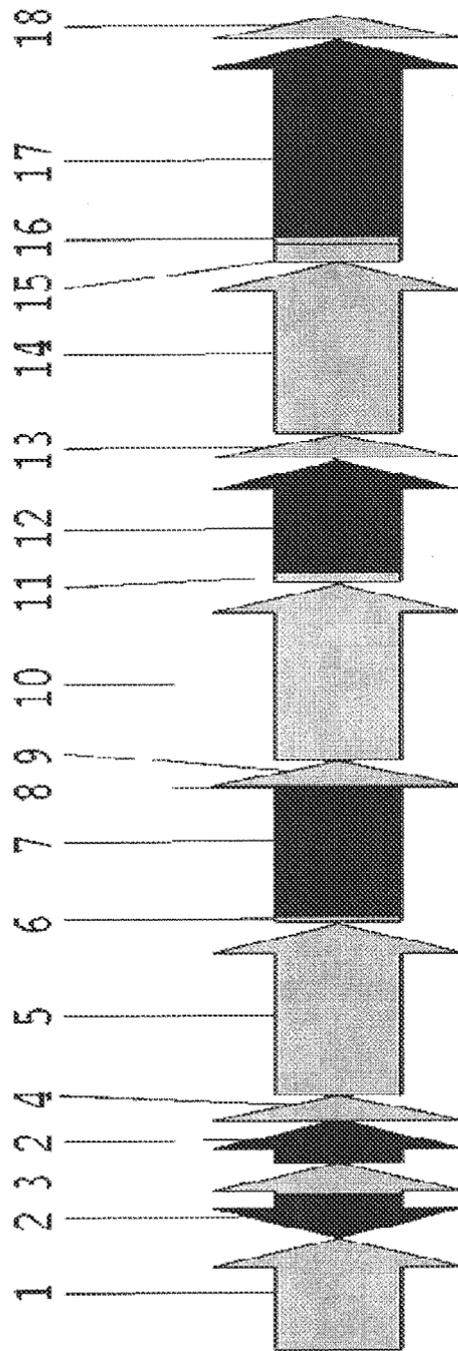


FIG.29

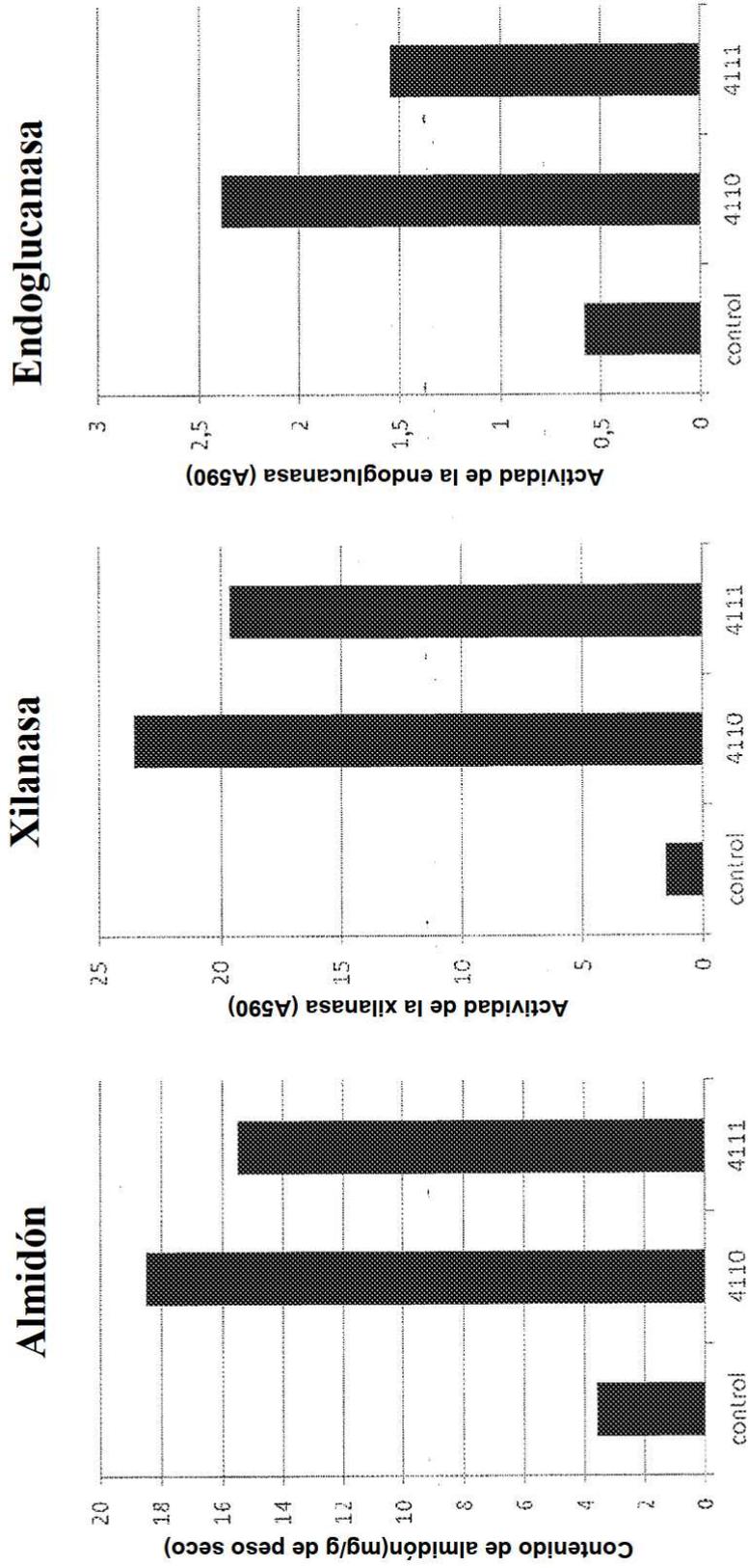


FIG.30

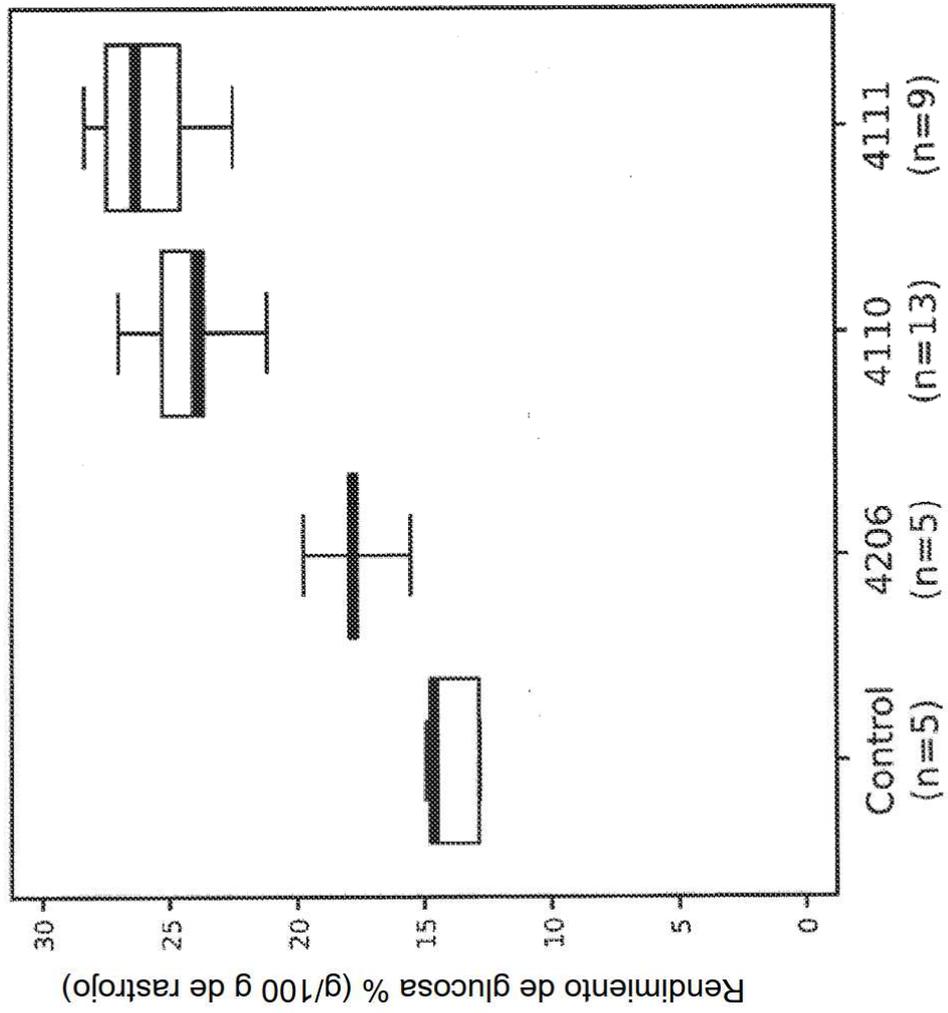


FIG. 31