

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 352**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2007** **E 12192660 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2559767**

54 Título: **microARN de plantas y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

12.10.2006 US 851187 P

29.03.2007 US 908826 P

31.08.2007 US 969195 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.09.2017

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, Missouri 63167, US

72 Inventor/es:

ALLEN, EDWARDS;
GOLDMAN, BARRY S.;
GUO, LIANG;
HEISEL, SARA E.;
HUANG, SHIHSHIEH;
IVASHUTA, SERGEY I.;
KRIEGER, ELYSIA K.;
ROBERTS, JAMES K. y
ZHANG, YUANJI I.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 633 352 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

microARN de plantas y procedimientos de uso de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención desvela un procedimiento de disminuir la actividad de microARN en una en una célula vegetal mediante la expresión en la célula vegetal, una construcción de ADN recombinante que comprende al menos una secuencia señuelo de miARN, reconocida y encontrada, pero no escindida, por un miARN expresado en dicha célula vegetal, células vegetales transgénicas no naturales, plantas, y semillas que contienen en su genoma dicha construcción de ADN recombinante.

Antecedentes de la invención

- 10 Se han descrito varias rutas celulares implicadas en la supresión génica mediada por ARN, cada una distinguida por una ruta característica y componentes específicos. Véanse, por ejemplo, las revisiones de Brodersen y Voinnet (2006), Trends Genetics, 22:268-280, y Tomari y Zamore (2005) Genes & Dev., 19:517-529. La ruta del ARNip implica la escisión fuera de fase de un ARN bicatenario ("ARN duplete") en ARN interferentes pequeños ("ARNip"). La ruta del microARN implica microARN (miARN), ARN que no codifican proteínas de entre aproximadamente 19 a
- 15 aproximadamente 25 nucleótidos (comúnmente, aproximadamente 20 - 24 nucleótidos en plantas) que orientan la escisión en *trans* de transcritos diana, regulando de manera negativa la expresión de genes implicados en varias rutas de regulación y desarrollo. Los miARN de plantas se han definido mediante un conjunto de características que incluyen un precursor de tallo-bucle que se procesa mediante DCL1 en un único miARN específico de ~21-nucleótidos, la expresión de una única pareja de especies de miARN y miARN* procedentes del duplete de ARN con
- 20 salientes de dos nucleótidos en 3', y silenciamiento de dianas específicas en *trans*. Véase Bartel (2004) Cell, 116:281-297; Kim (2005) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 6:376-385; Jones-Rhoades y col. (2006) Annu. Rev. Plant Biol., 57:19-53; Ambros y col. (2003) RNA, 9:277-279. En la ruta del ARNip que actúa en *trans* ("ARNip-ta"), los miARN sirven para orientar el procesamiento en fase de transcritos primarios de ARNip en un proceso que requiere de una ARN polimerasa dependiente de ARN para la producción de un precursor de un duplete de ARN; los ARNip que
- 25 actúan en *trans* se definen por la ausencia de estructura secundaria, un sitio diana de miARN que inicia la producción de ARN bicatenario, necesidad de DCL4 y una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6), y la producción de múltiples ARN pequeños de ~21 nucleótidos perfectamente en fase con dupletes perfectamente emparejados con salientes de 2 nucleótidos en 3' (véase Allen y col. (2005) Cell, 121:207-221).
- 30 Los microARN (miARN) son ARN que no codifican proteínas, generalmente de entre aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos (comúnmente aproximadamente 20 - 24 nucleótidos en plantas), que orientan la escisión en *trans* de transcritos diana, regulando de manera negativa la expresión de genes implicados en varias rutas de regulación y desarrollo (Bartel (2004) Cell, 116:281-297). En algunos casos, los miARN sirven para orientar el procesamiento en fase de transcritos primarios de ARNip (véase Allen y col. (2005) Cell, 121:207-221).
- 35 Se han identificado algunos genes del microARN (genes *MIR*) y están públicamente disponibles en una base de datos ("miRBase", disponible en línea en microrna.sanger.ac.uk/sequences). Los solicitantes han desvelado novedosos genes *MIR*, miARN maduros, y sitios de reconocimiento del miARN en la publicación de patente de Estados Unidos 2006/0200878. Se describen también genes *MIR* adicionales y miARN maduros en las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos 2005/0120415 y 2005/144669. Se ha notificado que se producen genes *MIR* en regiones intergénicas, aislados y en clústeres en el genoma, pero también se pueden localizar
- 40 completa o parcialmente en intrones de otros genes (que codifican proteínas y que no codifican proteínas). Para una revisión reciente de la biogénesis del miARN, véase Kim (2005) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 6:376-385. La transcripción de genes *MIR* puede realizarse, al menos en algunos casos, bajo el control promocional del propio promotor de un gen *MIR*. La transcripción del gen *MIR* está mediada generalmente de forma probable por la ARN polimerasa II (véase, por ejemplo, Aukerman. y Sakai (2003) Plant Cell, 15:2730-2741; Parizotto y col. (2004) Genes
- 45 Dev., 18:2237-2242), y, por tanto, podría ser susceptible a soluciones de silenciamiento génico que se han utilizado en otros genes transcritos por la polimerasa II. El transcrito primario (que puede ser policistrónico) se denomina un "pri-miARN", una molécula precursora de miARN que puede ser muy grande (algunas kilobases) y contiene una o más regiones locales bicatenarias o "en horquilla" así como la "protección" usual en 5' y la cola poliadenilada de un ARNm. Véanse, por ejemplo, la Figura 1 de Kim (2005) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 6:376-385.
- 50 En células vegetales, se cree que las moléculas precursoras de microARN se procesan ampliamente en el núcleo. El pri-miARN se procesa para dar una molécula precursora de miARN más corta que incluye también una estructura de tallo-bucle o replegado y se denomina el "pre-miARN". En plantas, los miARN y los ARNip se forman mediante distintas enzimas análogas a DICER (DCL), y en *Arabidopsis*, se cree que se requiere una enzima DCL nuclear (DCL1) para la formación de miARN maduro; véanse, por ejemplo, Ambros y col. (2003) RNA, 9:277-279, y Xie y col. (2004) PLoS Biol., 2:642-652. Se encuentran revisiones adicionales sobre la biogénesis y la función del microARN,
- 55 por ejemplo, en Bartel (2004) Cell, 116:281-297; Murchison y Hannon (2004) Curr. Opin. Cell Biol., 16:223-229; y Dugas y Bartel (2004) Curr. Opin. Plant Biol., 7:512-520. Los micro ARN pueden de esta manera describirse en términos de ARN (por ejemplo, secuencia de ARN de un miARN maduro o una molécula de miARN precursora de ARN), o en términos de ADN (por ejemplo, una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de ARN de un

miARN maduro o una secuencia de ADN que codifica un gen *MIR* o un fragmento de un gen *MIR* o un precursor de un miARN).

Se estima que las familias del gen *MIR* representan aproximadamente el 1% de al menos algunos genomas y son capaces de alterar o regular la expresión de aproximadamente un tercio de todos los genes (véase, por ejemplo, Tomari y col. (2005) *Curr. Biol.*, 15:R61-64; G. Tang (2005) *Trends Biochem. Sci.*, 30:106-14; Kim (2005) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:376-385). Como los miARN son importantes elementos reguladores en eucariotas, incluyendo animales y plantas, la supresión transgénica de los miARN conduciría, por ejemplo, a la comprensión de importantes procesos biológicos o a permitir la manipulación de determinadas rutas (por ejemplo, la regulación de la diferenciación celular, proliferación, y apoptosis) útiles, por ejemplo, en aplicaciones biotecnológicas. Véanse, por ejemplo, O'Donnell y col. (2005) *Nature*, 435:839-843; Cai y col. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:5570-5575; Morris y McManus (2005) *Sci. STKE*, pe41 (stke.sciencemag.org/cgi/reprint/sigtrans;2005/297/pe41.pdf). Los genes microARN (*MIR*) tienen características de identificación, incluyendo la conservación entre especies vegetales, una estructura replegada estable, y el procesamiento de un dúplete de miARN/miARN* específico mediante las enzimas de tipo Dicer (Ambros y col. (2003) *RNA*, 9:277-279). Se han utilizado estas características para identificar los miARN y sus correspondientes genes en plantas (Xie y col. (2005) *Plant Physiol.*, 138:2145-2154; Jones-Rhoades y Bartel (2004) *Mol. Cell*, 14:787-799; Reinhart y col. (2002) *Genes Dev.*, 16:1616-1626; Sunkar y Zhu (2004) *Plant Cell*, 16:2001-2019). Los genes de microARN públicamente disponibles están catalogados en la miRBase (Griffiths-Jones y col. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31:439-441).

Los miARN se expresan en tipos celulares muy específicos de *Arabidopsis* (véase, por ejemplo, Kidner y Martienssen (2004) *Nature*, 428:81-84, Millar y Gubler (2005) *Plant Cell*, 17:705-721). La supresión puede estar limitada a un lado, borde, u otra división entre tipos de células, y se cree que se requerirá para la modelación y especificación del tipo de célula adecuado (véase, por ejemplo, Palatnik y col. (2003) *Nature*, 425:257-263). Se ha descubierto que la supresión de un gen indicador GFP que contiene un sitio de reconocimiento de miR171 endógeno limita la expresión a células específicas en *Arabidopsis* transgénico (Parizotto y col. (2004) *Genes Dev.*, 18:2237-2242). Se han validado los sitios de reconocimiento de los miARN en todas las regiones de un ARNm, incluyendo la región 5' no traducida, la región de codificación, y la región 3' no traducida, indicando que la posición del sitio diana de miARN con respecto a la secuencia de codificación puede no necesariamente afectar a la supresión (véase, por ejemplo, Jones-Rhoades y Bartel (2004) *Mol. Cell*, 14:787-799, Rhoades y col. (2002) *Cell*, 110:513-520, Allen y col. (2004) *Nat. Genet.*, 36:1282-1290, Sunkar y Zhu (2004) *Plant Cell*, 16:2001-2019).

Los miARN maduros desvelados en el presente documento se procesan a partir de genes *MIR* que generalmente pertenecen a las familias convencionales conservadas a través de especies de plantas relacionadas de forma distante. Estos genes *MIR* y sus miARN maduros codificados son también útiles, por ejemplo, para modificar las rutas de desarrollo, por ejemplo, alterando la diferenciación celular o a la morfogénesis (véase, por ejemplo, Palatnik y col. (2003) *Nature*, 425:257-263; Mallory y col. (2004) *Curr. Biol.*, 14:1035-1046), para servir como fuentes de secuencias para los miARN genomanipulados (que no son de origen natural) que se diseñan para silenciar secuencias diferentes de las de los transcritos diana por la secuencia de miARN de origen natural (véase, por ejemplo, Parizotto y col. (2004) *Genes Dev.*, 18:2237-2242; véanse también las publicaciones de solicitudes de patente de los Estados Unidos 2004/3411A1 y 2005/0120415, y para estabilizar el ARNs. Un mismo gen *MIR* (o sus regiones 5' o 3' no traducidas naturales), o su prom natural u otros elementos implicados en su transcripción) es útil como gen diana para la supresión del gen (por ejemplo, mediante los procedimientos de la presente invención), cuando se desea la supresión del miARN codificado por el gen *MIR*. Los promotores de los genes *MIR* pueden tener patrones de expresión muy específicos (por ejemplo, específicos de células, específicos de tejidos, o temporalmente específicos), y de esta manera son útiles en las construcciones recombinantes para inducir dicha transcripción específica de una secuencia de ADN a la cual se unen de manera operativa.

La presente invención proporciona un procedimiento para disminuir la actividad del miARN en una célula vegetal (incluyendo plantas de cultivo tales como maíz, arroz, y soja), mediante la expresión en la célula vegetal, una construcción de ADN recombinante que incluye al menos una secuencia señuelo del miARN reconocida y unida, pero no escindida por la expresión de un miARN maduro de dicha célula vegetal. Se desvelan y reivindican células vegetales transgénicas no naturales. plantas, y semillas que contienen en su genoma dicha construcción de ADN recombinante.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de disminuir la actividad del miARN en una célula vegetal que comprende expresar en una célula vegetal una construcción de ADN recombinante que comprende un promotor heterólogo unido operativamente a un ADN que codifica al menos una secuencia señuelo de un miARN sintético que consiste en 19 a 36 nucleótidos de ARN contiguos, en el que la secuencia señuelo de dicho miARN sintético se reconoce y une, pero no se escinde, por un miARN expresado en dicha célula vegetal, dando como resultado un emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miARN sintético y dicho miARN maduro, formando por tanto un dúplete de ARN resistente a la escisión que comprende al menos un emparejamiento incorrecto entre dicha secuencia señuelo de miARN sintético y dicho miARN maduro en las posiciones 9, 10, u 11 de dicho miARN vegetal maduro, o al menos una inserción en una posición de dicha secuencia señuelo de miARN sintético correspondiente a las posiciones 10-11 de dicho miARN maduro, por lo cual

disminuye la actividad de dicho miARN maduro en la mencionada célula vegetal, con respecto a la correspondiente cuando dicha construcción de ADN recombinante no se expresa en dicha célula vegetal.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una célula de planta transgénica no natural en la que la actividad de dicho miARN maduro se ha disminuido mediante el procedimiento que se muestra anteriormente en el presente documento, es decir, la mencionada célula vegetal que incluye cualquiera de las construcciones de ADN recombinante anteriormente mencionado. Se proporciona además una planta transgénica no natural que contiene la célula de planta transgénica no natural que se muestra anteriormente en el presente documento, incluyendo plantas en cualesquiera etapas de desarrollo, e incluye una planta regenerada preparada a partir de las células de plantas transgénicas no naturales desveladas en el presente documento, o una progenie de plantas (que pueden ser plantas endogámicas o híbridas) de la planta regenerada, o semillas de dicha planta transgénica no natural, dicha planta transgénica tiene en su genoma y expresión cualquiera de las construcciones de ADN recombinante anteriormente mencionadas, en el que dicha planta transgénica no natural tiene al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta que carece de dicha construcción de ADN recombinante, en relación a una planta que carece de la construcción de ADN recombinante, seleccionada entre los rasgos; tolerancia al estrés abiótico mejorada; tolerancia al estrés biótico mejorada; resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta; composición de metabolitos primarios modificada; composición de metabolitos secundarios modificada; elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas; rendimiento mejorado; capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas; características de crecimiento o reproductivas modificadas; y una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una planta de cultivo transgénico no natural que tiene al menos un rasgo alterado, en el que dicha planta de cultivo transgénico no natural comprende y expresa una construcción de ADN recombinante como se muestra anteriormente en el presente documento, dando como resultado por tanto la mencionada planta de cultivo transgénico no natural que presenta al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta de cultivo que no expresa dicha construcción de ADN recombinante, seleccionada entre los rasgos; tolerancia al estrés abiótico mejorada; tolerancia al estrés biótico mejorada; resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta; composición de metabolitos primarios modificada; composición de metabolitos secundarios modificada; elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas; rendimiento mejorado; capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas; características de crecimiento o reproductivas modificadas; y una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

Otras realizaciones específicas de la invención se desvelan en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa gráficamente un ejemplo no limitante de una estructura replegada de una secuencia de miARN precursor de una planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, más específicamente, la estructura replegada de la secuencia del miARN precursor que tiene la **SEQ ID NO. 1136**, que incluye dos tallos-bucles cortos, un bucle, y dos protuberancias. El precursor de miARN se procesa *in planta* para dar un miARN maduro (en este ejemplo concreto, el miARN maduro que tiene la **SEQ ID NO. 32**).

Las **Figuras 2 y 3** representan gráficamente ejemplos no limitantes de elementos del ADN para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, un miARN endógeno, como se describe en el **Ejemplo 3**.

La **Figura 4** representa gráficamente los resultados del análisis de transferencia Northern para los miARN maduros de diferentes tejidos de maíz, como se describe en el **Ejemplo 4**.

La **Figura 5** representa gráficamente los perfiles de transcripción de secuencias probet que incluyen las secuencias precursoras del miARN que tienen patrones de expresión específicos para el tejido reproductor masculino de maíz (polen), como se describe en el **Ejemplo 4**.

La **Figura 6** representa gráficamente las etapas de sequía para plantas de soja con un sistema de puntuación de 1,0 (sin efecto o sin control) a 4,0, como se describe en el **Ejemplo 5**.

Como se describe en el **Ejemplo 6**, la **Figura 7A** representa gráficamente la estructura replegada de un precursor miRMON18 de maíz (**SEQ ID NO. 3936**), la **Figura 7B** representa gráficamente la estructura replegada de un precursor miRMON 18 de ratones (**SEQ ID NO. 1763**), y la **Figura 7C** representa gráficamente la estructura replegada de un precursor miR827 de *Arabidopsis thaliana* (**SEQ ID NO. 8743**). La **Figura 7D** representa gráficamente una comparación de miR827 (**SEQ ID NO. 8744**) y miRMON18 (**SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742**), con flechas numeradas que indican las posiciones 1, 10, y 21 del miARN maduro; el nucleótido en la posición 10 está también subrayado.

La **Figura 8** representa gráficamente los patrones de expresión de miRMON18 como se determina según las transferencias Northern de miRMON18 maduro de 21-mer (**Figura 8A**) y el perfil de transcripción del precursor miRMON (**Figura 8B**), como se describe en el **Ejemplo 6**. La **Figura 9** representa gráficamente el análisis de expresión del precursor miRMON18 del maíz (**SEQ ID NO. 3936**) en tejidos de maíz de plantas que crecen en condiciones deficientes en agua (sequía) (**Figura 9A**), condiciones frías (**Figura 9B**), y condiciones deficientes en nitrógeno (**Figura 9C**), como se describe en el **Ejemplo 6**.

La **Figura 10** representa gráficamente los resultados de los análisis de transferencias Northern de ARN pequeños en maíz (*Zea mays* var. LH244), que muestran una expresión de miRMON18 potenciada en endospermo y semilla

de maíz, y una fuerte supresión de miRMON18 en hojas inducida por deficiencia de nitrógeno (**Figura 10A**), y una fuerte expresión de miRMON18 en tejido de hojas en condiciones suficientes de fosfato y una supresión de miRMON18 en condiciones deficientes de fosfato (**Figura 10B**), como se describe en el **Ejemplo 6**.

La **Figura 11** representa gráficamente una alineación de secuencias múltiples de novedosos genes diana de miRMON18 de maíz que contienen el dominio SPX de maíz (indicado por una secuencia subrayada, cuando está presente) y el dominio MFS de maíz (indicado por una secuencia en texto en negrita), como se describe en el **Ejemplo 7**.

La **Figura 12** representa gráficamente un árbol filogenético construido para los genes SPX identificados, tal como se describe en el **Ejemplo 7**; los genes que contienen un sitio de reconocimiento de miRMON18 previsto (en genes de especies diferentes de *Arabidopsis thaliana*) o un sitio de reconocimiento de miR827 previsto (en genes de *Arabidopsis thaliana*) que se ha validado experimentalmente se indican en texto en negrita.

La **Figura 13** representa gráficamente una secuencia genómica de miRMON18 (**SEQ ID NO. 8800**), como se describe en el **Ejemplo 8**. Este muestra el transcrito miRMON18 en texto en mayúscula en los nucleótidos 2173 - 2788, un elemento promotor de miRMON18 en texto en minúscula en los nucleótidos 211 - 2172, un elemento líder en texto en minúscula en los nucleótidos 2173 - 2308, una secuencia TATA convencional (que termina 25 nucleótidos en la dirección 5') del sitio de inicio de la transcripción en el texto en negrita subrayado en los nucleótidos 2144 - 2147, el miRMON18 maduro como texto en mayúscula subrayado en los nucleótidos 2419 - 2439, y el miRMON18* como texto en mayúscula subrayado en los nucleótidos 2322 - 2341.

La **Figura 14** representa gráficamente la escisión prevista por miRMON18 de las secuencias del arroz Os02g45520 (**SEQ ID NO. 8784**) y Os04g48390 (**SEQ ID NO. 8786**) y la secuencia del maíz MRT4577_36529C (**SEQ ID NO. 8788**), como se describe en el **Ejemplo 9**.

La **Figura 15** representa gráficamente la correlación inversa entre el precursor miRMON18 (**Figura 15A**) y un miRMON18 diana (**Figura 15B**), como se describe en el **Ejemplo 9**. La **Figura 15B** muestra que la secuencia del maíz MRT4577_36529C (**SEQ ID NO. 8788**), presentó mayores niveles de expresión en condiciones deficientes de nitrógeno que en condiciones suficientes de nitrógeno, es decir, un patrón de expresión opuesto al del precursor miRMON18 que se muestra en la **Figura 15A**. La **Figura 16** representa gráficamente el vector pMON107261, que incluye un promotor CaMV 35S que impulsa la expresión del transcrito miRMON18 de maíz (por ejemplo, los nucleótidos 2173 - 2788 de la **SEQ ID NO. 8800**), como se describe en el **Ejemplo 10**.

La **Figura 17A** representa gráficamente las estructuras replegadas de los precursores miR399 de maíz; La **Figura 17B** representa gráficamente los resultados de los experimentos de perfil de la transcripción, que demuestran que el Zm-miR399 pri-miARN está suprimido en condiciones deficientes de nitrógeno (barras negras) y se expresa en condiciones suficientes de nitrógeno (barras blancas), como se describe en el **Ejemplo 11**.

La **Figura 18** representa gráficamente las secuencias de ADNc del maíz de las secuencias señuelo de miR399, con la secuencia consenso dada como la **SEQ ID NO. 8834**, y desvela al menos dos grupos de genes que contienen las secuencias señuelo de miR399, como se describe en el **Ejemplo 11**.

La **Figura 19** representa gráficamente los experimentos que comparan la expresión de las secuencias señuelo miR399 de maíz y los precursores miR399 como se describe en el **Ejemplo 11**. La **Figura 19A** muestra un perfil de transcripción del gen señuelo de miR399 del grupo 1 MRT4577_47862C.7 (**SEQ ID NO. 8827**) y la **Figura 19B** muestra un perfil de transcripción del gen señuelo de miR399 del grupo 2 MRT4577_36567C.8 (**SEQ ID NO. 8829**), indicando que estas secuencias señuelo de miR399 están infrarreguladas por la deficiencia de nitrógeno. Estos resultados se verificaron mediante transferencias Northern que medían la expresión de miR399 maduro (**Figura 19C**) y de la secuencia señuelo de miR399 MRT4577_47862C.7 (**SEQ ID NO. 8827**) (**Figura 19D**).

La **Figura 20** representa gráficamente los experimentos del perfil de transcripción que comparan la expresión de las secuencias de ADNc señuelo del miR399 endógeno de maíz y los correspondientes precursores miR399 de maíz en condiciones de temperatura diferentes, como se describe en el **Ejemplo 11**. El gen señuelo de miR399 del grupo 2 MRT4577_36567C.8 (**SEQ ID NO. 8829**) presentó al menos una expresión de diez veces o más mayor en condiciones de nitrógeno suficiente en hoja de maíz, especialmente durante las horas diarias de luz (**Figura 20A**). Este mismo gen presentó al menos una infrarregulación de dos veces en la raíz (**Figura 20B**) y en los brotes (**Figura 20C**) tras una exposición prolongada al frío.

La **Figura 21** representa gráficamente la expresión de las secuencias de ADNc señuelo de miR399 en diferentes tejidos en maíz y soja, como se describe en el **Ejemplo 11**. La **Figura 21A** representa gráficamente los niveles de expresión en la secuencia señuelo de miR399 de maíz del grupo 1 **SEQ ID NO. 8827** (MRT4577_47862C, representada por las sondas A1ZM005814_at y A1ZM005813_s_at), y la secuencia señuelo de miR399 de maíz del grupo 2 **SEQ ID NO. 8829** (MRT4577_36567C, representada por la sonda A1ZM048024_at), así como la secuencia de pri-miR399 de maíz **SEQ ID NO. 8818** (MRT4577_22487C.6 representada por la sonda A1ZM033468_at). La **Figura 21B** representa gráficamente los niveles de expresión de las secuencias señuelo de miR399 de soja **SEQ ID NO. 8842** (MRT3847_217257C.2, representada por la sonda A1GM031412_at), **SEQ ID NO. 8844** (MRT3847_236871C.2, representada por la sonda A1GM053788_at), **SEQ ID NO. 8836** (MRT3847_238967C.1, representada por la sonda A1GM035741_at), y la **SEQ ID NO. 8838** (MRT3847_241832C.1, representada por la sonda A1GM069937_at).

La **Figura 22A** representa gráficamente los datos del perfil de transcripción en diversos tejidos de soja del miR319 señuelo endógeno de soja **SEQ ID NO. 8847** (MRT3847_41831C.6, representada por la sonda A1GM001017_at); La **Figura 22B** representa gráficamente los datos del perfil de transcripción en diversos tejidos de maíz del miR319 señuelo endógeno de maíz **SEQ ID NO. 8849** (MRT4577_577703C.1, representada por la sonda A1ZM012886_s_at), como se describe en el **Ejemplo 11**.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. En general, la nomenclatura utilizada y los procedimientos de fabricación o laboratorio descritos a continuación son bien conocidos y se emplean comúnmente en la técnica. Se utilizan procedimientos convencionales para estos procedimientos, tales como los proporcionados en la técnica y diversas referencias generales. Salvo que se indique de otra forma, las secuencias de ácidos nucleicos en el texto de la presente memoria descriptiva se proporcionan, cuando se leen de izquierda a derecha, en la dirección de 5' a 3'. Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o como ARN, tal como se especifica; la desvelación de una define necesariamente la otra, tal como sabe un experto habitual en la materia. En los casos donde se proporciona un término en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de ese término. La nomenclatura utilizada y los procedimientos de laboratorio descritos a continuación son bien conocidos y se emplean comúnmente en la técnica. Otros términos técnicos utilizados tienen su significado ordinario en la técnica en la que se utilizan, como se ilustra por una variedad de diccionarios técnicos. Los inventores no pretenden limitarse a un mecanismo o modo de acción. Se proporcionan referencias a lo anterior solo con fines ilustrativos.

CONSTRUCCIONES DE ADN RECOMBINANTE

Se describe una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que al menos un elemento de ADN transcribible se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, en el que el miARN precursor incluye un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos del maíz, arroz, o la secuencia del miARN precursor de soja; (b) un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, en el que el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética incluye un miARN maduro modificado; (c) un elemento de ADN que se localiza o es adyacente a una unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN incluyendo un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro seleccionado entre un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1 - 1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o por un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**; y (d) un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN endógeno derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. Se describen genes diana, cuya expresión se puede modular mediante el uso de una construcción de ARN recombinante de la presente invención, en el subtítulo "Genes diana". A continuación se describen las realizaciones y utilidades de al menos un elemento de ADN transcribible.

(A) Expresión de un miARN natural en condiciones no naturales.

El al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor con la estructura replegada de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, en el que el miARN precursor incluye un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos del maíz, arroz, o la secuencia del miARN precursor de soja. Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta, y la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. Por "miARN precursor" se entiende un ARN transcrito que es más grande que un miARN maduro procesado a partir del miARN precursor, y que normalmente se puede prever que forme una estructura replegada que contiene regiones de ARN bicatenario no perfectamente complementarias. Véase Bartel (2004) Cell, 116:281-297; Kim (2005) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 6:376-385; Jones-Rhoades y col. (2006) Annu. Rev. Plant Biol., 57:19-53; Ambros y col. (2003) RNA, 9:277-279. Los ejemplos de microARN precursores incluyen el transcrito de miARN primario (pri-miARN) así como el pre-miARN que se deriva naturalmente de un pri-miARN; Los miARN precursores incluyen también secuencias de ARN no naturales que se prevé que formen una estructura replegada que contiene regiones de ARN bicatenario no perfectamente complementarias y se procesan *in vivo*, generalmente mediante una o más etapas de escisión, a un miARN maduro. Por "secuencia de miARN precursor" se entiende una secuencia de ARN que incluye al menos los nucleótidos del miARN precursor, pero que puede incluir nucleótidos adicionales (de tal manera que el miARN precursor incluye un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos del maíz, arroz, o la secuencia del miARN precursor de soja). Cada miARN precursor forma por sí mismo una estructura replegada que es idéntica o casi idéntica a la estructura replegada que está formada por al

menos parte de la secuencia del miARN precursor correspondiente.

El miARN precursor no tiene que incluir todos los nucleótidos contenidos en una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, pero incluye preferentemente un segmento contiguo de al menos 80%, o al menos del 85%, o al menos del 90%, o al menos del 95%, o al menos del 97%, o al menos del 98%, o al menos del 99% de los nucleótidos de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**.

Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta, y, de esta manera, la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. La transcripción de la construcción de ADN recombinante en una célula de una planta transgénica modula la expresión de cualquier gen (genes endógenos o transgenes) que contienen una secuencia ("sitio de reconocimiento del miARN") que es sustancialmente complementaria y reconocida por el miARN maduro codificado por el miARN precursor. En general, la transcripción de la construcción de ADN recombinante da como resultado la supresión de un gen endógeno que contiene un sitio de reconocimiento del miARN que es reconocido por el miARN maduro codificado por el miARN precursor. Se prefiere que la construcción de ADN recombinante incluya además un promotor diferente de la secuencia del miARN. Esto permite la expresión del miARN maduro en condiciones espaciales, o temporales, o inducibles bajo las cuales podría no expresarse de forma natural. Por ejemplo, la construcción de ADN recombinante puede diseñarse para incluir un promotor constitutivo y, de esta manera, expresa constitutivamente un miARN maduro que se expresa naturalmente (es decir, cuando se expresa en la forma del miARN precursor endógeno bajo el control del promotor natural) solo en condiciones de oscuridad. Los promotores que son útiles con esta construcción de ADN recombinante se describen en el apartado "Promotores".

En un ejemplo no limitante, la construcción de ADN recombinante incluye un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que al menos un elemento de ADN transcribible incluye un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor que es un segmento contiguo que consiste en aproximadamente un 90% de los nucleótidos de la secuencia del miARN precursor de maíz que tiene la **SEQ ID NO. 1136**, y que está previsto que tenga una estructura replegada que es sustancialmente la misma (es decir, que tiene áreas de tallos de ARN bicatenarios y bucles o protuberancias monocatenarios en la misma o aproximadamente la misma localización) que la estructura replegada de la secuencia del miARN precursor que tiene la **secuencia SEQ ID NO. 1136**. La estructura replegada de la secuencia del miARN precursor que tiene la **SEQ ID NO. 1136** incluye aproximadamente 118 nucleótidos, con dos tallos-bucles cortos que se proyectan desde un bucle en el extremo cerrado de la estructura replegada, y dos pequeñas protuberancias en el "tallo" bicatenario principal de la estructura replegada (**Figura 1**). El miARN maduro procesado *in planta* forma un miARN precursor que es un segmento contiguo que consiste en aproximadamente un 90% de los nucleótidos de la secuencia del miARN precursor de maíz que tiene la **SEQ ID NO. 1136** preferentemente idéntica a la codificada por la estructura replegada de la secuencia de miARN precursor que tiene la **SEQ ID NO. 1136**, es decir, al miARN maduro que tiene la **SEQ ID NO. 32**. La transcripción de esta construcción de ADN recombinante da como resultado preferentemente la supresión de un gen endógeno que contiene un sitio de reconocimiento del miARN que es reconocido por el miARN que tiene la **SEQ ID NO. 32**. Mientras que la secuencia de miARN precursor que tiene la **SEQ ID NO. 1136** se expresa naturalmente en tejido de semilla pero no en hoja (véase la **Tabla 2**), la construcción de ADN recombinante puede incluir además un promotor diferente al promotor natural de la secuencia del miARN precursor que tiene la **SEQ ID NO. 1136**, por ejemplo, un promotor constitutivo, para permitir la transcripción de un miARN maduro que tiene la **SEQ ID NO. 32** en otros tejidos además del tejido de semilla.

(B) Expresión de un miARN maduro diseñado mediante ingeniería genética.

El al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, en el que el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética incluye un miARN maduro modificado. Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta o un gen endógeno de una plaga o patógeno de la planta, y la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. Por "diseñado mediante ingeniería genética" se entiende que los nucleótidos se cambian (se sustituyen, eliminan, o añaden) en una secuencia de un miARN precursor natural tal como una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, dando como resultado por tanto un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética que tiene sustancialmente la misma estructura replegada que la secuencia del miARN precursor natural, pero en la que el miARN maduro que se procesa a partir del miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética tiene una secuencia modificada (es decir, diferente de la de un miARN maduro) que se diseña para suprimir un gen diana diferente de los genes diana suprimidos naturalmente por la secuencia del miARN precursor natural.

Un procedimiento general, no limitante, para determinar los cambios de nucleótidos en la secuencia del miARN precursor natural para producir el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética, útil en la preparación de una construcción de ADN recombinante, incluye las etapas:

- 5 (a) Seleccionar una única secuencia diana de al menos 18 nucleótidos específica del gen diana, utilizando, por ejemplo, herramientas de alineación de secuencias tales como BLAST (véanse, por ejemplo, Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol., 215:403-410; Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res., 25:3389-3402), por ejemplo, o las bases de datos de ADNc de maíz y las bases de datos de ADN genómico, para identificar ortólogos de transcritos diana y cualesquiera emparejamientos potenciales con genes no relacionados, evitando por tanto el silenciamiento no deseado de secuencias no diana.
 - 10 (b) Analizar el gen diana para las secuencias indeseables (por ejemplo, emparejamientos con secuencias de especies no dianas, especialmente animales), y puntuación de cada segmento potencial de 19-mer para el contenido de GC, Puntuación de Reynolds (véase Reynolds y col. (2004) Nature Biotechnol., 22:326-330), y asimetría funcional caracterizada por una diferencia negativa en la energía libre (" $\Delta\Delta G$ ") (véase Khvorova y col. (2003) Cell, 115:209-216). Preferentemente, se seleccionan las 19-mer que tienen todas o la mayoría de las siguientes características: (1) una puntuación de Reynolds >4 , (2) un contenido de GC entre aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, (3) una $\Delta\Delta G$ negativa, (4) una adenosina terminal, (5) ausencia de un ciclo consecutivo de 4 o más de los mismos nucleótidos; (6) una localización próxima al extremo 3' del gen diana; (7) diferencias mínimas procedentes del transcrito de miARN precursor. Se seleccionan preferentemente (3 o más) 19 mer para la prueba.
 - 20 (c) determinar el complemento inverso de las 19-mer seleccionadas para usar en la preparación de un miARN maduro modificado; el nucleótido adicional en la posición 20 se empareja preferentemente con la secuencia diana modificada, y el nucleótido en la posición 21 se selecciona preferentemente para no estar emparejado para evitar la diseminación del silenciamiento en el transcrito diana.
 - 25 (d) ensayar el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética, por ejemplo, en una prueba de *Nicotiana benthamiana* transitoria mediada por *Agrobacterium* para la expresión del miARN maduro modificado y la represión diana.
- y (e) clonar el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética más eficaz en una construcción para la transformación estable del maíz (véanse las secciones bajo los encabezados "Preparación y utilización de construcciones de ADN recombinante" y "Preparación y utilización de células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales").

(C) Expresión de un transgén y un sitio de reconocimiento del miARN.

- La construcción de ADN recombinante incluye además una unidad de transcripción del transgén, en el que el al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN que se localiza en o adyacente a la unidad de transcripción del transgén y esta se transcribe a ARN que
- 35 incluye un sitio reconocimiento del miARN mediante un miARN maduro derivado de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, y el al menos un gen diana incluye el transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén, y en el que la expresión de la construcción de ADN recombinante en una planta da como resultado la expresión del transgén en células de la planta en las que el miARN maduro no se expresa naturalmente. Se prefiere que los sitios de reconocimiento del miARN sean aquellos previstos para ser reconocidos por al menos un miARN maduro seleccionado a partir de un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1 - 1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o por al menos un miARN maduro derivado de una
 - 45 secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. La predicción de un sitio de reconocimiento se logra usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como reglas de complementariedad de secuencia, tal como se describen por Zhang (2005) Nucleic Acids Res., 33:W701-704 y por Rhoades y col. (2002) Cell, 110:513-520.
 - 50 La predicción de un sitio de reconocimiento del miARN permite la identificación y validación de genes endógenos regulados por los miARN a partir de un miARN precursor expresado naturalmente; esto es útil, por ejemplo, para eliminar o modificar un sitio de reconocimiento del miARN en un gen endógeno para desacoplar la expresión de este gen de la desregulación por el miARN endógeno que regula naturalmente la expresión del gen. Por ejemplo, el número de emparejamientos incorrectos que implican bases en las posiciones 2 a 13 (en un sitio de reconocimiento del miARN que tiene 21 nucleótidos contiguos) puede aumentarse para evitar el reconocimiento y la escisión por el miARN.
 - 55

- Estas construcciones de ADN recombinante son particularmente útiles para la expresión *in planta* del transgén en un modelo espacial, temporal, o inducible específico sin la necesidad de un promotor que tiene este patrón de expresión específico. Estas construcciones de ADN recombinante permiten, por ejemplo, la expresión restringida de un gen transcrito mediante un promotor constitutivo o un promotor con la expresión más allá del tipo de célula o tejido(s) deseado(s). La expresión restringida puede restringirse espacial o temporalmente, por ejemplo, restringirse a tipos

de tejidos o células o archivos, o a un desarrollo específico, reproductivo, crecimiento, o etapas estacionales. Cuando un miARN se expresa en condiciones concretas (por ejemplo, bajo estrés biótico tal como apiñamiento, interacciones alelopáticas o plagas o infestación de patógenos, o un estrés abiótico tal como un estrés por calor o por frío, estrés por sequía, estrés por nutrientes, estrés de metales pesados o de sales), el sitio de reconocimiento del miARN correspondiente puede utilizarse para la supresión condicionalmente específica, es decir, para suprimir un transgén en una condición concreta. En un ejemplo no limitante, una construcción de ADN recombinante que codifica (a) un transgén bajo el control de un promotor constitutivo y (b) un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro que se expresa específicamente solo en condiciones de estrés hídrico, se puede usar para la expresión del transgén en una planta en condiciones sin estrés hídrico. En otro ejemplo no limitante, una construcción de ADN recombinante que codifica (a) un transgén que expresa una proteína insecticida bajo el control de un promotor específicamente inducible mediante cicatrización, y (b) un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro que se expresa en tejidos diferentes de la raíz, se puede usar para la expresión limitada de la proteína insecticida en raíces de plantas en condiciones cuando la planta está siendo atacada por una plaga de insectos.

La unidad de transcripción del transgén incluye al menos un transgén, y opcionalmente una secuencia adicional tal como un promotor, un potenciador del promotor, un terminador, un ARN mensajero que estabiliza o desestabiliza la secuencia (véanse, por ejemplo, Newman y col. (1993) *Plant Cell*, 5:701-714; Green (1993) *Plant Physiol.*, 102:1065-1070; y Ohme-Takagi y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11811-11815), secuencia para la localización o el transporte del transcrito del transgén a una localización específica (por ejemplo, mitocondria, plástido, nucléolo, peroxisoma, retículo endoplasmático), u otra secuencia relacionada con el procesamiento deseado del transgén. El transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén puede incluir uno cualquiera o más genes de interés, incluyendo una secuencia codificante, secuencia no codificante, o ambos. Los genes de interés pueden incluir cualquiera de los genes relacionados en "Genes diana", cuyos ejemplos preferidos incluyen la secuencia (codificante) traducible de los genes que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de moléculas de interés (tales como, aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros hidratos de carbono, polímeros biológicos, y metabolitos secundarios incluyendo alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos, y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto).

(D) Supresión de un miARN endógeno o natural.

El al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN endógeno derivado de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta, y la expresión del gen endógeno esté suprimida en células de la planta cuando se produce la expresión natural del miARN endógeno, y de esta manera, la expresión de la construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión del gen endógeno en las células.

El elemento de ADN para suprimir la expresión incluye al menos uno de:

(a) ADN que incluye al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana;

(b) ADN que incluye múltiples copias de al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana;

(c) ADN que incluye al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del gen diana;

(d) ADN que incluye múltiples copias de al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del gen diana;

(e) ADN que se transcribe a ARN para suprimir el gen diana formando ARN bicatenario e incluye al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana y al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del gen diana;

(f) ADN que se transcribe a ARN para suprimir el gen diana formando un único ARN bicatenario e incluye múltiples segmentos de ADN de sentido contrario en serie que son de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana y múltiples segmentos de ADN de sentido directo en serie que tienen al menos un segmento del gen diana

(g) ADN que se transcribe a ARN para suprimir el gen diana formando múltiples ARN bicatenarios e incluye múltiples segmentos de ADN de sentido contrario que son de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana y múltiples segmentos de ADN de sentido directo que tienen al menos un segmento del gen diana, y en los que los múltiples segmentos de ADN de sentido contrario y los múltiples segmentos de ADN con sentido están dispuestos en una serie de repeticiones invertidas;

(h) ADN que incluye nucleótidos procedentes de un miARN de planta;

(i) ADN que incluye nucleótidos de ARNpi;

(j) ADN que se transcribe en un aptámero de ARN capaz de unirse a un ligando; y

(k) ADN que se transcribe a un aptámero de ARN capaz de unirse a un ligando, y ADN que se transcribe a ARN regulador capaz de regular la expresión del gen diana, en el que la regulación es dependiente de la conformación

del ARN regulador, y la conformación del ARN regulador está afectada alostéricamente por el estado de unión del aptámero de ARN.

Los elementos del ADN para suprimir la expresión se describen más detalladamente en el **Ejemplo 3** y se representan gráficamente en las **Figuras 2 y 3**.

- 5 La construcción de ADN recombinante incluye el ADN diseñado para transcribirse a ARN monocatenario o al menos ARN parcialmente bicatenario (tal como en una disposición "tallo-bucle en contacto"), o a un ARN que asume una estructura secundaria o una configuración tridimensional (por ejemplo, un bucle grande de secuencia de sentido contrario del gen diana o un aptámero) que confiere al transcrito una característica deseada adicional, tal como una estabilidad aumentada, una semivida aumentada in vivo, o una especificidad celular o tisular. En un ejemplo, el
- 10 separador se transcribe a un bucle estabilizante que une la primera y segunda serie de segmentos de ARN contiguos (véase, por ejemplo, Di Giusto y King (2004) J. Biol. Chem., 279:46483-46489). En otro ejemplo, la construcción de ADN recombinante incluye el ADN que se transcribe a ARN que incluye un aptámero de ARN (por ejemplo, un aptámero que se une a un ligando específico de célula que permite el direccionamiento específico de célula o tejido del dúplete de ADN recombinante).
- 15 La construcción de ADN recombinante se prepara mediante técnicas comúnmente utilizadas, tales como aquellas descritas en el encabezado "Elaboración y uso de construcciones de ADN recombinante" e ilustradas en los ejemplos de trabajo. La construcción de ADN recombinante es particularmente útil para preparar células de plantas transgénicas no naturales, plantas transgénicas no naturales, y semillas transgénicas como se describe a continuación en "Células de plantas transgénicas y plantas transgénicas".
- 20 Se pueden controlar los efectos de un miARN sobre su gen diana mediante procedimientos alternativos descritos en detalle a continuación en "Secuencias señuelo de microARN".

Genes diana

- La construcción de ADN recombinante se puede diseñar para suprimir cualesquiera genes diana o genes. El gen diana puede tener una secuencia traducible (codificante), o puede ser una secuencia no codificante (tal como
- 25 secuencia reguladora no codificante), o ambos, y puede incluir al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en un gen diana eucariota, un gen diana no eucariota, una secuencia de ADN precursora de miARN, y un promotor de microARN. El gen diana puede ser natural (endógeno) para la célula (por ejemplo, una célula vegetal o animal) en la que se transcribe la construcción de ADN recombinante, o puede ser nativo para una plaga o patógeno de la planta o animal en el que se transcribe la construcción de ADN recombinante. El gen diana puede ser un gen
 - 30 exógeno, tal como un transgén de una planta. Un gen diana puede ser un gen natural usado como diana para la supresión, con o sin la expresión concurrente de un transgén exógeno, por ejemplo, mediante la inclusión de un elemento de expresión génica en la construcción de ADN recombinante, o en una construcción de ADN recombinante separada. Por ejemplo, puede ser deseable reemplazar un gen natural por un homólogo transgénico exógeno.
 - 35 El gen diana puede incluir un solo gen o parte de un solo gen que se use como diana para la supresión, o puede incluir, por ejemplo, múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana, o múltiples genes diana de una o más especies. Un gen diana puede incluir cualquier secuencia de cualquier especie (incluyendo no eucariotas tales como bacterias, y virus; hongos; plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como plantas de cultivo, plantas ornamentales, y
 - 40 plantas no domesticadas o salvajes; invertebrados tales como artrópodos, anélidos, nematodos, y moluscos; y vertebrados tales como anfibios, pescado, aves, mamíferos domésticos o salvajes, e incluso seres humanos.
- El gen diana es exógeno para la planta en la que se va a transcribir la construcción de ADN recombinante, pero endógeno para una plaga o patógeno (por ejemplo, virus, bacterias, hongos, oomicetos, e invertebrados tales como insectos, nematodos, y moluscos) de la planta. El gen diana puede incluir múltiples genes diana, o múltiples
- 45 segmentos de uno o más genes. Se prefiere que, el gen o genes diana es un gen o genes de una plaga o patógeno invertebrado de la planta, dichos genes diana son particularmente útiles para proporcionar plantas transgénicas no naturales que tienen resistencia a una o más plagas o patógenos de plantas, por ejemplo, resistencia a un nematodo tal como el nematodo del quiste de la soja o nematodo del nudo de la raíz o a una plaga de insectos.
- El gen diana puede tener una secuencia traducible (codificante), o puede ser una secuencia no codificante (tal como
- 50 secuencia reguladora no codificante), o ambos. Los ejemplos de un gen diana incluyen secuencia no traducible (no codificante), tales como, pero no de forma limitativa, regiones 5' no traducidas, promotores, potenciadores, u otras regiones transcripcionales no codificantes, regiones 3' no traducidas, terminadores, e intrones. Los genes diana incluyen genes que codifican microARN, ARN interferentes pequeños, componentes de ARN de ribosomas o ribozimas, ARN nucleolares pequeños, y otros ARN no codificantes (véase, por ejemplo, secuencias de ARN no
 - 55 codificantes proporcionadas de forma pública en rfam.wustl.edu; Erdmann y col. (2001) Nucleic Acids Res., 29:189-193; Gottesman (2005) Trends Genet., 21:399-404; Griffiths-Jones y col. (2005) Nucleic Acids Res., 33:121-124). Un ejemplo específico de un gen diana incluye un sitio de reconocimiento de microARN (esto es, el sitio de una hebra de ARN al que se une un miARN maduro e induce la escisión). Otro ejemplo específico de un gen diana incluye una

secuencia precursora de microARN natural para una plaga o patógeno de la planta transgénica no natural, es decir, el transcrito primario que codifica un microARN, o los intermedios de ARN procesados a partir de este transcrito primario (por ejemplo, un pri-miARN o un pre-miARN limitado nuclear que se puede exportar desde el núcleo al citoplasma). Véanse, por ejemplo, Lee y col. (2002) EMBO Journal, 21:4663-4670; Reinhart y col. (2002) Genes y Dev., 16:1616-1626; Lund y col. (2004) Science, 303:95-98; y Millar y Waterhouse (2005) Funct. Integr. Genomics, 5:129-135. Los genes diana también pueden incluir secuencias traducibles (de codificación) que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de moléculas de interés (tales como aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros hidratos de carbono, polímeros biológicos, y metabolitos secundarios incluyendo alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos, y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto).

Se prefiere que el gen diana sea un gen esencial de una plaga o patógenos de la planta. Los genes esenciales incluyen genes que son necesarios para el desarrollo de la plaga o patógeno hasta un estado adulto reproductivo fértil. Los genes esenciales incluyen genes que, cuando se silencian o suprimen, dan como resultado la muerte del organismo (en forma de un adulto o en cualquier estado del desarrollo, incluyendo gametos) o la incapacidad del organismo para reproducirse de manera satisfactoria (por ejemplo, esterilidad en un progenitor macho o hembra o letalidad para el cigoto, embrión, o larva). Se encuentra una descripción de los genes esenciales de nematodos, por ejemplo, en Kemphues, K. "Essential Genes" (24 de diciembre de 2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.57.1, disponible en línea en www.wormbook.org. Los ejemplos no limitantes de genes esenciales de los nematodos incluyen la proteína espermática principal, ARN polimerasa II, y quitina sintasa (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US20040098761); los genes esenciales adicionales para el nematodo quístico de la semilla de soja se proporcionan en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0271630. Se dispone públicamente de una descripción de genes de insecto en la base de datos de genoma de *Drosophila* (disponible en línea en flybase.bio.indiana.edu/). La mayoría de los genes de *Drosophila* previstos se han analizado para determinar su función mediante un cribado de cultivos celulares basado en interferencia de ARN, dando como resultado la identificación de 438 genes esenciales; véase Boutros y col. (2004) Science, 303:832-835, y material complementario disponible en línea en www.sciencemag.org/cgi/content/full/303/5659/832/DC1. Se proporciona una descripción de genes bacterianos y fúngicos esenciales en la base de datos de genes esenciales ("DEG", disponible en línea en tubic.tju.edu.cn/deg/); véase Zhang y col., (2004) Nucleic Acids Res., 32:D271-D272.

Las plagas de invertebrados de las plantas incluyen las plagas de nematodos, plagas de moluscos (babosas y caracoles), y plagas de insectos. Los fitopatógenos de interés incluyen hongos, oomicetos, bacterias (por ejemplo, las bacterias que causan el manchado de las hojas, fuego bacteriano, agalla de la corona, y la marchitez bacteriana), micoplasmas, y virus (por ejemplo, los virus que causan mosaicos, bandeo de venas, moteado, manchado, o crecimiento anormal). Véase también G. N. Agrios, "Plant Pathology" (Cuarta edición), Academic Press, San Diego, 1997, 635 pp., para las descripciones de hongos, bacterias, micoplasmas (incluyendo micoplasmas y espiroplasmas), virus, nematodos, plantas superiores parasíticas, y protozoos flagelados, todos los cuales son plagas o patógenos de plantas de interés. Véase también la compilación continuamente actualizada de plagas y patógenos de plantas y las enfermedades causadas por estos en "Common Names of Plant Diseases" de la American Phytopathological Society, compilado mediante el Committee on Standardization of Common Names for Plant Diseases of The American Phytopathological Society, 1978-2005, disponible en línea en www.apsnet.org/online/common/top.asp.

Los ejemplos no limitativos de patógenos de planta fúngicos de interés particular incluyen, por ejemplo, los hongos que provocan el moho pulverulento, herrumbre, mancha y tizón foliar, podredumbre húmeda, podredumbre de raíces, podredumbre de la corona, podredumbre de la cápsula del algodón, cancro del tallo, cancro de la varilla, marchitez vascular, tizón, o moho, incluyendo, pero no de forma limitativa, *Fusarium* spp., *Phakospora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Aspergillus* spp., *Gibberella* spp., *Pyricularia* spp., y *Alternaria* spp. Los ejemplos específicos de patógenos fúngicos de plantas incluyen *Phakospora pachirhizi* (rota asiática de la soja), *Puccinia sorghi* (roya común del maíz), *Puccinia polysora* (roya meridional del maíz), *Fusarium oxysporum* y otras *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Exserohilum turcicum* (añublo foliar del maíz boreal), *Bipolaris maydis* (añublo foliar del maíz meridional), *Ustilago maydis* (tizón el maíz), *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*), *F. proliferatum* (*G. fujikuroi* var. *intermedia*), *F. subglutinans* (*G. subglutinans*), *Diplodia maydis*, *Sporisorium holci-sorghi*, *Colletotrichum graminicola*, *Setosphaeria turcica*, *Aureobasidium zeae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, y las numerosas especies fúngicas proporcionadas en las tablas 4 y 5 de la patente de Estados Unidos 6.194.636. Los ejemplos no limitativos de patógenos de plantas incluyen patógenos clasificados anteriormente como hongos, pero clasificados más recientemente como oomicetos. Los ejemplos específicos de patógenos de plantas oomicetos de interés particular incluyen miembros del género *Pythium* (por ejemplo, *Pythium aphanidermatum*) y *Phytophthora* (por ejemplo, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*) y organismos que provocan el mildiu (por ejemplo, *Peronospora farinosa*).

Los ejemplos no limitativos de patógenos bacterianos incluyen los micoplasmas que causan enfermedades de amarilleamiento y espiroplasmas tales como *Spiroplasma kunkelii*, que produce el achaparramiento del maíz, eubacteria tales como *Pseudomonas avenae*, *Pseudomonas andropogonis*, *Erwinia stewartii*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xylella fastidiosa*, y las numerosas especies bacterianas proporcionadas en la Tabla 3 de la patente de Estados Unidos 6.194.636.

Los ejemplos no limitativos de patógenos víricos de las plantas de especial interés incluyen el virus del mosaico enano del maíz (MDMV), virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV, anteriormente MDMV cepa B), virus del mosaico del trigo común (WSMV), virus del maíz enano clorótico (MCDV), virus de la cebada enana amarilla (BYDV), virus del ápice en racimo del plátano (BBTV), y los numerosos virus relacionados en la Tabla 2 de la patente de Estados Unidos 6.194.636.

Los ejemplos no limitativos de plagas de invertebrados incluyen nematodos de quistes *Heterodera* spp. especialmente el nematodo del quiste de la soja *Heterodera glycines*, nematodos del nudo de la raíz *Meloidogyne* spp., nematodos lanza *Hoplolaimus* spp., nematodos achaparrados *Tylenchorhynchus* spp., nematodos en espiral *Helicotylenchus* spp., nematodos que inducen lesiones *Pratylenchus* spp., nematodos de anillo *Criconea* spp., nematodos foliares *Aphelenchus* spp. o *Aphelenchoides* spp., gusano de la raíz del maíz, *Lygus* spp., pulgones e insectos chupadores de savia similares, tales como la filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), perforadores del maíz, gusanos cortadores, gusanos soldado, langostas, escarabajos japoneses, saltamontes, y otras plagas de coleópteros, dípteros, y lepidópteros. Los ejemplos específicos de plagas de invertebrados incluyen plagas capaces de infestar el sistema radicular de las plantas de cultivo, por ejemplo, gusano de la raíz del maíz boreal (*Diabrotica barbers*), gusano de la raíz del maíz meridional (*Diabrotica barbers*), gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica barbers*), áfido de la raíz del maíz (*Anuraphis maidiradicis*), oruga negra (*Agrotis ipsilon*), oruga vítrea (*Crymodes devastator*), oruga gruesa (*Feltia ducens*), oruga gris (*Agrotis gladiaria*), gusanos elatéridos (*Melanotus* spp., *Aeolus mellillus*), elatérido del trigo (*Aeolus mancus*), elatérido de la arena (*Horistonotus uhlerii*), picudo del maíz (*Sphenophorus maidis*), picudo Timothy (*Sphenophorus zea*), picudo de la poa (*Sphenophorus parvulus*), picudo del maíz meridional (*Sphenophorus callosus*), escarabajo blanco (*Phyllophaga* spp.), gusano de la semilla del maíz (*Delia platura*), colaspis de la uva (*Colaspis brunnea*), escarabajo de la semilla de maíz (*Stenolophus lecontei*), escarabajo delgado de la semilla del maíz (*Clvinia impressifrons*), así como los nematodos parasíticos listados en la Tabla 6 de la patente de Estados Unidos 6.194.636.

Las plagas de invertebrados de especial interés, especialmente, pero sin limitarse a las regiones del hemisferio sur (incluyendo América del Sur y Central) incluyen áfidos, gusano de la raíz del maíz, spodoptera, noctuidae, escarabajo de la patata, *Lygus* spp., cualquier hemíptero, homóptero, o heteróptero, cualquier lepidóptero, cualquier coleóptero, nematodos, gusanos cortadores, oruga nocturna, gusanos soldado, perforadores, enrolladores de hojas, y otros. Las plagas de artrópodos especialmente abarcadas por la presente invención abarcan varias especies de gusanos cortadores incluyendo la oruga cortadora (*Agrotis repleta*), oruga negra (*Agrotis ipsilon*), gusano cortador (*Anicla ignicans*), gusano cortador granuloso (*Feltia subterranea*), "gusano aspero" (*Agrotis malefida*); polilla de la harina mediterránea (*Anagasta kuehniella*), coleóptero del grano de cabeza cuadrada (*Cathartus quadricollis*), escarabajo pulga (*Chaetocnema* spp), polilla del arroz (*Corcyra cephalonica*), gusano de la raíz del maíz o "vaquita de San Antonio" (*Diabrotica speciosa*), perforador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), barrenador menor del maíz (*Elasmopalpus lignosellus*), chinche marrón (*Euschistus* spp.), oruga del maíz (*Helicoverpa zea*), gorgojo plano del grano (*Laemophloeus minutus*), polilla saltamontes (*Mocis latipes*), coleóptero del grano con dientes de sierra (*Oryzaephilus surinamensis*), polilla del grano molido (*Pyralis farinalis*), polilla del grano molido de la India (*Plodia interpunctella*), pulgón de la hoja de maíz (*Rhopalosiphum maidis*), cucaracha cavadora o "chinche subterranea" (*Scaptocoris castanea*), pulgón verde (*Schizaphis graminum*), gorgojo del grano (*Sitophilus zeamais*), polilla del grano de Angulema (*Sitotroga cerealella*), palomilla del maíz (*Spodoptera frugiperda*), escarabajo mauritano (*Tenebroides mauritanicus*), araña roja (*Tetranychus urticae*), escarabajo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), oruga del algodón (*Alabama argillacea*), gorgojo (*Anthonomus grandis*), pulgón del algodón (*Aphis gossypii*), mosca blanca de la batata (*Bemisia tabaci*), varias especies de arañuelas (*Frankliniella* spp.), oruga del algodón (*Helicoverpa zea*), "oruga bolillera" (por ejemplo, *Helicoverpa geletopoeon*), gusano del brote de tabaco (*Heliothis virescens*), chinche verde (*Nezara viridula*), polilla del gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), palomilla de la remolacha (*Spodoptera exigua*), ácaro rojo (*Tetranychus* spp.), arañuela de la cebolla (*trips tabaci*), mosca blanca del invernadero (*Trialeurodes vaporarum*), oruja de la judía aterciopelada (*Anticarsia gemmatalis*), escarabajo moteado del maíz o "astilo moteado" (*Astilus atomaculatus*), "oruga de la alfalfa" (*Colias lesbia*), "chinche marrón" o "chinche de los cuernos" (*Dichelops furcatus*), "alquiche chico" (*Edessa miditabunda*), meloidos (*Epicauta* spp.), "barrenador del brote" (*Epinotia aporema*), "oruga verde del yuyo colorado" (*Loxostege bifidalis*), nematodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp.), "oruga cuarteadora" (*Mocis repanda*), chinche verde meridional (*Nezara viridula*), "chinche de la alfalfa" (*Piezodorus guildinii*), gusano verde del trébol (*Plathypena scabra*), saltamontes de la soja (*Pseudoplusia includens*), polilla saltamontes "isoca medidora del girasol" (*Rachiplusia nu*), oruga lanuda (*Spilosoma virginica*), palomilla listada (*Spodoptera ornithogalli*), varios gorgojos de la raíz (familia Curculionidae), varios elatéridos (familia Elateridae), y varios escarabajos blancos (familia Scarabaeidae). Las plagas de nematodos específicamente abarcadas por la invención incluyen las plagas de nematodos del maíz (*Belonolaimus* spp., *Trichodorus* spp., *Longidorus* spp., *Dolichodorus* spp., *Anguina* spp., *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp.), soja (*Heterodera glycines*, *Meloidogyne* spp., *Belonolaimus* spp.), plátano (*Radopholus similis*, *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* spp.), caña de azúcar (*Heterodera sacchari*, *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp.), naranjas (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp.), café (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp.), palmera de coco (*Bursaphelenchus* spp.), tomates (*Meloidogyne* spp., *Belonolaimus* spp., *Nacobbus* spp.), uvas (*Meloidogyne* spp., *Xiphinema* spp., *Tylenchulus* spp., *Criconea* spp.), limón y lima (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp.), cacao (*Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*), piña (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Rotylenchulus reniformis*), papaya (*Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*), pomelo (*Tylenchulus* spp.,

Radopholus spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp., y muchas judías (*Meloidogyne* spp.).

Los genes diana de las plagas pueden incluir genes de invertebrados de la proteína principal del esperma, alfa tubulina, beta tubulina, ATPasa vacuolar, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, ARN polimerasa II, quitina sintasa, citocromos, miARN, moléculas precursoras de miARN, promotores de miARN, así como otros genes tales como los desvelados en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0021087, documento WO 05/110068, y en la Tabla II de la publicación de patente de Estados Unidos 2004/0098761. Los genes diana de patógenos pueden incluir los genes de los factores de inicio de la traducción vírica, replicasas víricas, miARN, moléculas precursoras de miARN, tubulina fúngica, ATPasa vacuolar fúngica, quitina sintasa fúngica, quinasas MAP fúngicas, Pac1 Tyr/Thr fosfatasa fúngica, enzimas implicadas en el transporte de nutrientes (por ejemplo, transportadores de aminoácidos o transportadores de azúcares), enzimas implicadas en la biosíntesis de la pared celular fúngica, cutinasas, enzimas biosintéticas de melanina, poligalacturonasas, pectinasas, pectina liasas, celulasas, proteasas, genes que interactúan los genes de la avirulencia en plantas, y otros genes implicados en la invasión y la replicación del patógeno en la planta infectada. De este modo, un gen diana no tiene que ser exógeno para la planta en la que se transcribe la construcción de ADN recombinante. Una construcción de ADN recombinante se puede transcribir en una planta y usarse para suprimir un gen de un patógeno o plaga que puede infestar a la planta.

Los ejemplos no limitantes específicos de genes diana adecuados también incluyen los genes catabólicos de aminoácidos (como el gen *LKR/SDH* del maíz que codifica la lisina-cetoglutarato reductasa (LKR) y la sacaropina deshidrogenasa (SDH), y sus homólogos), genes de zeína del maíz, genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (por ejemplo, ácido graso desaturasas microsomiales vegetales y acil-ACP tioesterasas vegetales, tales como los desvelados en las patentes de Estados Unidos con números 6.426.448, 6.372.965, y 6.872.872), genes implicados en rutas de biosíntesis de múltiples etapas, donde puede ser interesante regular el nivel de uno o más intermedios, tales como genes que codifican enzimas para la biosíntesis de polihidroxicalcianoato (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.750.848); y genes que codifican proteínas de control del ciclo celular, tales como proteínas con actividad de tipo inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) (véanse, por ejemplo, los genes desvelados en el documento WO 050/07829). Los genes diana pueden incluir genes que codifican proteínas no deseadas (por ejemplo, alérgenos o toxinas) o enzimas para la biosíntesis de compuestos no deseados (por ejemplo, componentes de sabor u olor no deseados). De este modo, una realización de la invención es una planta transgénica no natural o tejido de dicha planta que mejora mediante la supresión de proteínas alergénicas o toxinas, por ejemplo, un cacahuete, soja, o almendra de trigo con una alergenicidad reducida. Los genes diana pueden incluir genes implicados en la maduración de la fruta, tales como poligalactouronasa. Los genes diana pueden incluir genes cuya expresión está preferentemente limitada a una célula o tejido o estadio del desarrollo concretos, o donde la expresión es preferentemente transitoria, es decir, donde una supresión constitutiva o general, o una supresión que se propaga a través de diferentes tejidos, no se desea necesariamente. De este modo, otros ejemplos de genes diana adecuados incluyen genes que codifican proteínas que, cuando se expresan en plantas transgénicas, convierten las plantas transgénicas en resistentes a plagas o patógenos (véase, por ejemplo, los genes de la colesterol oxidasa que se desvelan en la patente de Estados Unidos n.º 5.763.245); genes cuya expresión está inducida por plagas o patógenos; y genes que puede reducir o restaurar la fertilidad (véase, por ejemplo, los genes *barstar/barnasa* descritos en la patente de Estados Unidos n.º 6.759.575).

La construcción de ADN recombinante puede diseñarse para suprimir de manera más específica el gen diana, por ejemplo, diseñando la construcción de ADN recombinante para codificar un miARN maduro para incluir regiones sustancialmente no idénticas (o no complementarias) de una secuencia de un gen no diana. Los genes no diana pueden incluir cualquier gen no previsto para su silenciamiento o supresión, bien en una planta que contiene la construcción de ADN recombinante o en organismos que puedan entrar en contacto con la construcción de ADN recombinante. Una secuencia de gen no diana puede incluir cualquier secuencia de cualquier especie (incluyendo no eucariotas tales como bacterias, y virus; hongos; plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como plantas de cultivo, plantas ornamentales, y plantas no domesticadas o salvajes; invertebrados tales como artrópodos, anélidos, nematodos, y moluscos; y vertebrados tales como anfibios, pescado, aves, mamíferos domésticos o salvajes, e incluso seres humanos).

El gen diana es un gen endógeno para una especie dada, tal como una planta dada (tal como una planta importante desde el punto de vista agrícola o comercial, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas), y el gen no diana puede ser, por ejemplo, un gen de una especie no diana, tal como otra especie vegetal o un gen de un virus, hongo, bacteria, invertebrado, o vertebrado, incluso un ser humano. Un ejemplo no limitante es cuando la construcción de ADN recombinante se diseña para que suprima un gen diana que es un gen endógeno para una sola especie (por ejemplo, gusano de la raíz del maíz meridional, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) pero no suprimir un gen no diana, tales como genes de especies relacionadas, incluso estrechamente relacionadas (por ejemplo, gusano de la raíz del maíz, *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, o el gusano de la raíz del maíz meridional, *Diabrotica undecimpunctata*).

En los casos en los que es deseable suprimir un gen diana entre múltiples especies, puede ser deseable diseñar la construcción de ADN recombinante para suprimir una secuencia del gen diana común para varias especies en las que se debe silenciar el gen diana. De este modo, se puede seleccionar un duplete de ARN para que sea específico de un taxón (por ejemplo, específico de un género, familia, o incluso un taxón más grande como un mismo filum, por

ejemplo, arthropoda) pero no para otros taxones (por ejemplo, plantas o vertebrados o mamíferos). En un ejemplo no limitante, se puede seleccionar una construcción de ADN recombinante para silenciamiento génico de forma que se dirija a hongos patógenos (por ejemplo, a *Fusarium* spp.) pero no se dirija a ninguna secuencia génica de hongos beneficiosos.

En otro ejemplo no limitante, puede seleccionarse una construcción de ADN recombinante para silenciar un gen diana del gusano de la raíz del maíz para que sea específico para todos los miembros del género *Diabrotica*. En un ejemplo adicional de esta realización, dicha construcción de ADN recombinante dirigida a *Diabrotica* puede seleccionarse de tal forma que no se dirija a ninguna secuencia génica de especies de insectos beneficiosas (por ejemplo, escarabajos predadores de coccinélidos, conocidos habitualmente como mariquitas) u otras especie de insecto beneficiosas.

El grado de especificidad necesario de una construcción de ADN recombinante para silenciar un gen diana depende de diferentes factores. Los factores pueden incluir el tamaño y la secuencia de ácidos nucleicos de un microARN maduro codificado mediante la construcción de ADN recombinante, y la importancia relativa de disminuir dicho miARN maduro potencial para suprimir los genes no diana. En un ejemplo no limitante, cuando se espera que dicho miARN maduro tenga un tamaño de 21 pares de bases, se prefiere que esto incluya el ADN que codifica un miARN maduro para silenciar un gen diana en el que el miARN maduro incluye secuencias que son prácticamente no idénticas a las de una secuencia de un gen no diana, tal como menos de 18, o menos de 17, o menos de 16, o menos de 15 emparejamientos de los 21 nucleótidos contiguos de una secuencia de gen no diana.

Puede ser deseable diseñar la miARN maduro para silenciar un gen diana para que incluya regiones que se prevé que no generen polipéptidos indeseables, por ejemplo, mediante el cribado de la construcción de ADN recombinante para detectar secuencias que pueden codificar polipéptidos indeseables conocidos u homólogos cercanos de los mismos. Los polipéptidos indeseables incluyen polipéptidos homólogos de polipéptidos alérgenos conocidos y polipéptidos de toxinas polipeptídicas conocidas. Las secuencias públicamente disponibles que codifican dichos péptidos potencialmente alergénicos están disponibles, por ejemplo, de la bases de datos de alérgenos de la Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) (disponible en allergenonline.com) o las bases de datos Biotechnology Information for Food Safety Databases (disponible en www.iit.edu/~sgendel/fa.htm) (véase también, por ejemplo, Gendel (1998) Adv. Food Nutr. Res., 42:63-92). Las secuencias indeseables también pueden incluir, por ejemplo, aquellas secuencias polipeptídicas consideradas como toxinas conocidas o como alérgenos potenciales o conocidos e incluidos en las bases de datos públicamente disponibles como GenBank, EMBL, SwissProt, y otras, donde se pueden realizar búsquedas mediante el sistema Entrez (www.ncbi.nih.gov/Entrez). Los ejemplos no limitantes de secuencias peptídicas indeseables potencialmente alergénicas incluyen la glicina de soja, oleosina y aglutinina del cacahuete, gluteninas del trigo, caseína, lactoalbúmina, y lactoglobulina la leche de vaca, y tropomiosina de varias especies de marisco (allergenonline.com). Los ejemplos no limitantes de péptidos indeseables potencialmente tóxicos incluyen la toxina tetánica tetA de *Clostridium tetani*, toxinas diarreicas de *Staphylococcus aureus*, y venenos tales como conotoxinas de *Conus* spp. y neurotoxinas de artrópodos y reptiles (www.ncbi.nih.gov/Entrez).

En un ejemplo no limitante, la construcción de ADN recombinante se criba para eliminar dichas secuencias que se pueden transcribir que codifican polipéptidos con una homología perfecta con un alérgeno o toxina conocida para 8 aminoácidos contiguos, o con una identidad de al menos un 35% para más de al menos 80 aminoácidos; dichos cribados se pueden llevar a cabo sobre cualquiera, y posiblemente todos, los marcos de lectura en ambas direcciones, en marcos de lectura abiertos potenciales que comienzan con AUG (ATG en el ADN correspondiente), o en todos los posibles marcos de lectura, independientemente de si comienzan con un AUG (o ATG) o no. Cuando se consigue una "diana" o emparejamiento, es decir, cuando se identifica una secuencia que codifica un polipéptido potencial con una homología perfecta con un alérgeno o toxina conocidos para más de 8 aminoácidos contiguos (o al menos una identidad de aproximadamente un 35% para más de al menos 80 aminoácidos), las secuencias de los ácidos nucleicos correspondientes a dicha diana se pueden evitar, eliminar, o modificar cuando se seleccionan las secuencias a utilizar en el ARN para silenciar un gen diana. La construcción de ADN recombinante se puede diseñar de forma que no haya un marco de lectura abierto potencial que comience con AUG (ATG en el ADN correspondiente).

La evitación, eliminación de, o modificación de, una secuencia indeseada, se puede conseguir mediante cualquiera de una serie de procedimientos conocidos del experto en la materia. En algunos casos, el resultado pueden ser secuencias novedosas que no se creía que existieran de manera natural. Por ejemplo, la evitación de determinadas secuencias se puede llevar a cabo uniendo secuencias "limpias" en secuencias novedosas quiméricas a utilizar en el dúplete de ARN.

Los solicitantes reconocen que, en algunos silenciamientos de genes mediados por microARN, es posible que secuencias de miARN con emparejamiento imperfecto sean eficaces para el silenciamiento génico. Por ejemplo, se ha demostrado que los emparejamientos incorrectos próximos al centro de un sitio complementario de miARN tienen efectos más fuerte sobre el silenciamiento génico creado por el miARN de lo conseguido por emparejamientos incorrectos más alejados. Véase, por ejemplo, la Figura 4 de Mallory y col. (2004) EMBO J., 23:3356-3364. En otro ejemplo, se ha notificado que, tanto la posición de un par de bases incorrectamente emparejado y la identidad de los nucleótidos que forman el emparejamiento incorrecto alteran la capacidad de un miARN dado para silenciar un gen

diana, y que los emparejamientos incorrectos adenina-citosina, además del par de bases oscilante G:U, fueron bien tolerados (véase Du y col. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:1671-1677). De este modo, una hebra dada de la construcción de ADN recombinante no tiene que tener siempre una identidad de secuencia del 100% con el gen diana previsto, sino que generalmente tendría preferentemente una identidad de secuencia sustancial con el gen diana previsto, tal como aproximadamente un 95%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 85%, o aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con un gen diana previsto. Si se describe en términos de complementariedad, una hebra de la construcción de ADN recombinante se diseña preferentemente para que tenga una complementariedad sustancial con la diana prevista (por ejemplo, un ARN mensajero diana o un ARN diana no codificante), tal como aproximadamente un 95%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 85%, o aproximadamente un 80% de complementariedad con la diana prevista. En un ejemplo no limitante, en el caso de una construcción de ADN recombinante que codifica un miARN maduro de 21 nucleótidos, el miARN maduro se ha diseñado para que sea sustancialmente, pero no perfectamente, complementario de los 21 nucleótidos contiguos de un ARN diana; preferentemente, el nucleótido en la posición 21 está no emparejado con la posición correspondiente del ARN diana para evitar la transitividad.

Un experto en la materia será capaz de juzgar la importancia dada al cribado de regiones previstas para que sean más fuertemente específicas del gen diana o previstas para que no generen polipéptidos indeseables, con respecto a la importancia dada a otros criterios, tal como el porcentaje de identidad de secuencia con el gen diana previsto o la eficacia de silenciamiento génico prevista para una secuencia dada. Por ejemplo, se puede diseñar una construcción de ADN recombinante que codifica un miARN maduro para que esté activo en varias especies y, por tanto, un experto en la materia puede determinar si es más importante incluir en la construcción de ADN recombinante un ADN que codifica un miARN maduro que sea específico de varias especies de interés, pero menos importante para seleccionar regiones previstas para tener una mayor eficacia de silenciamiento génico o regiones previstas para generar polipéptidos indeseables.

Promotores

En general, la construcción de ADN recombinante de la presente invención incluye un promotor, funcional en una célula vegetal, y unido operativamente al elemento de ADN transcribible. En varias realizaciones, el promotor se selecciona entre el grupo que consiste en un promotor constitutivo, un promotor espacialmente específico, un promotor temporalmente específico, un promotor específico del desarrollo, y un promotor inducible.

Los promotores no constitutivos adecuados para su uso con las construcciones de ADN recombinante de la invención incluyen promotores espacialmente específicos, promotores temporalmente específicos, y promotores inducibles. Los promotores espacialmente específicos pueden incluir promotores específicos de orgánulo, célula, tejido u órgano (por ejemplo, un promotor específico de plástido, un promotor específico de raíz, un promotor específico de polen, o un promotor específico de semilla, para suprimir la expresión del primer ARN diana en plástidos, raíces, polen, o semillas, respectivamente). En muchos casos, es especialmente útil un promotor específico de semilla, específico de embrión, específico de aleurona o específico de endospermo. Los promotores temporalmente específicos pueden incluir promotores que tiendan a promover la expresión durante determinadas etapas del desarrollo en el ciclo de crecimiento de una planta, o durante diferentes tiempos del día o la noche, o en diferentes estaciones del año. Los promotores inducibles incluyen promotores inducidos por agentes químicos o por condiciones ambientales tales como, aunque no de forma limitativa, estrés biótico o abiótico (por ejemplo, déficit de agua o sequía, calor, frío, altos o bajos niveles de nutrientes o sales, altos o bajos niveles de luz, o infección por una plaga o patógeno). Un promotor específico de expresión también puede incluir promotores que se expresan generalmente de manera constitutiva pero con diferentes grados o "fuerzas" de expresión, incluyendo promotores considerados comúnmente como "promotores fuertes" o como "promotores débiles".

Los promotores de particular interés incluyen los siguientes ejemplos no limitantes: un promotor de opalina sintasa aislado de ADN-T de *Agrobacterium*; un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; elementos promotores potenciados o elementos promotores quiméricos, tales como un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) potenciado unido a un elemento potenciador (un intrón de la proteína 70 de choque térmico de *Zea mays*); promotores específicos de raíz, tales como aquellos desvelados en las patentes de Estados Unidos 5.837.848; 6.437.217 y 6.426.446; un promotor de oleosina L3 de maíz, desvelado en la patente de Estados Unidos 6.433.252; un promotor para un gen nuclear de una planta que codifica una aldolasa localizada en plástido desvelado en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0216189; promotores inducibles por frío desvelados en la patente de Estados Unidos 6.084.089; promotores inducibles por sal desvelados en la patente de Estados Unidos número 6.140.078; promotores inducibles por luz desvelados en la patente de Estados Unidos 6.294.714; promotores inducibles por patógenos desvelados en la patente de Estados Unidos 6.252.138; y promotores inducibles por déficit de agua desvelados en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0123347.

El elemento promotor puede incluir secuencias de ácido nucleico que no son promotores, elementos promotores u homólogos de los mismos de origen natural pero que pueden regular la expresión de un gen. Los ejemplos de dichas secuencias reguladoras "independientes de un gen" incluyen secuencias de ARN de origen natural o diseñadas artificialmente que incluyen una región o aptámero de unión a ligando y una región reguladora (que puede ser de acción en cis). Véase, por ejemplo, Isaacs y col. (2004) *Nat. Biotechnol.*, 22:841-847, Bayer y Smolke (2005) *Nature Biotechnol.*, 23:337-343, Mandal y Breaker (2004) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:451-463, Davidson y Ellington (2005)

Trends Biotechnol., 23:109-112, Winkler y col. (2002) Nature, 419:952-956, Sudarsan y col. (2003) RNA, 9:644-647, y Mandal y Breaker (2004) Nature Struct. Mol. Biol., 11:29-35. Dichos "riborreguladores" pueden seleccionarse o diseñarse respecto de su especificidad espacial o temporal, por ejemplo, para regular la traducción del gen exógeno solo en presencia (o ausencia) de una concentración dada del ligando adecuado.

5 Producción y uso de construcciones de ADN recombinante

Las construcciones de ADN recombinante de la presente invención se producen mediante cualquier procedimiento adecuado para la aplicación prevista, teniendo en cuenta, por ejemplo, el tipo de expresión deseado y la conveniencia de uso en la planta en la que se va a transcribir la construcción. Los procedimientos generales para producir y usar construcciones y vectores de ADN se conocen bien en la técnica y se describen en detalle en, por ejemplo, guías y manuales de laboratorio incluyendo Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. Un ejemplo de tecnología útil para construir construcciones y vectores de ADN para transformación se desvela en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0115642 A1, incorporado en el presente documento por referencia. Las construcciones de ADN también pueden construirse usando la tecnología de clonación GATEWAY™ (disponible a través de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), que usa la reacción de clonación de recombinasa LR de sitio específico del sistema integrasa/aff de la construcción de vector de bacteriófago lambda, en lugar de endonucleasas y ligasas de restricción. La reacción de clonación LR se desvela en las Patentes de Estados Unidos 5.888.732 y 6.277.608, y en las publicaciones de patente de Estados Unidos 2001/283529, 2001/282319 y 2002/0007051, que se han incorporado por referencia en el presente documento en su totalidad. El Manual de instrucciones sobre tecnología de clonación GATEWAY™, que se suministra también por Invitrogen, proporciona directrices concisas para la clonación rutinaria de cualquier ADN deseado en un vector que comprende elementos de expresión vegetales operables. Otro procedimiento de fabricación de un vector alternativo emplea clonación independiente de ligadura tal como se desvela por Aslandis y col. (1990) Nucleic Acids Res., 18:6069-6074 y Rashtchian y col. (1992) Biochem., 206:91-97, donde se liga un fragmento de ADN con extremos 5' y 3' monocatenarios a un vector deseado que puede amplificarse *in vivo*.

En determinadas realizaciones, la secuencia de ADN de la construcción de ADN recombinante incluye secuencia que se ha optimizado por codones para la planta en la que se va a expresar la construcción de ADN recombinante. Por ejemplo, una construcción de ADN recombinante que se va a expresar en una planta puede tener la totalidad o parte de su secuencia (por ejemplo, el primer elemento de supresión génica o el elemento de expresión génica) optimizada por codones para la expresión en una planta mediante procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.500.365, incorporada por referencia, para una descripción de la optimización por codones para plantas; véase también De Amicis y Marchetti (2000) Nucleic Acid Res., 28:3339-3346.

CÉLULAS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS Y PLANTAS TRANSGÉNICAS

Se proporciona además una célula de planta transgénica no natural que incluye cualquiera de las construcciones de ADN recombinante, como se describe anteriormente bajo el encabezado "Construcciones de ADN recombinante". Se proporciona además una planta transgénica no natural que contiene la célula de planta transgénica no natural que se ha descrito anteriormente. La planta transgénica no natural incluye plantas de cualquier etapa de desarrollo, e incluye una planta regenerada preparada a partir de las células de plantas transgénicas desveladas en el presente documento, o una progenie de plantas (que pueden ser plantas endogámicas o híbridas) de la planta regenerada, o semillas de dicha planta transgénica no natural. También se proporciona una semilla transgénica que tiene en su genoma cualquiera de las construcciones de ADN recombinante que se ha descrito anteriormente. Las células de plantas transgénicas no naturales, plantas transgénicas no naturales, y semillas transgénicas se producen por procedimientos bien conocidos en la técnica, como se describe a continuación bajo el encabezado "Preparación y utilización de células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales".

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

La célula de planta transgénica no natural o la planta transgénica no natural puede ser cualquier célula vegetal adecuada o planta de interés. Las células vegetales transformadas transitoriamente o transformadas de forma estable están abarcadas en la anterior. Son particularmente preferidas las plantas transgénicas transformadas de forma estable. Se prefiere que la planta transgénica no natural sea una planta transgénica fértil a partir de la cual se pueda cosechar la semilla. y la invención reivindica adicionalmente la semilla transgénica de dichas plantas transgénicas, en las que la semilla contiene también la construcción recombinante que se ha descrito anteriormente.

Preparación y utilización de células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales

5 Cuando se usa una construcción de ADN recombinante para producir una célula de planta transgénica no natural, la planta transgénica no natural, o la transformación de la semilla transgénica puede incluir cualquiera de los procedimientos y composiciones bien conocidos y demostrados. Los procedimientos adecuados para la transformación de plantas incluyen virtualmente cualquier procedimiento mediante el cual pueda introducirse ADN en una célula. tal como mediante administración directa de ADN (por ejemplo, mediante transformación de protoplastos mediada por PEG, mediante electroporación, mediante agitación con fibras de carburo de silicio, y mediante aceleración de partículas recubiertas de ADN) mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, mediante vectores víricos u otros vectores, etc. Un procedimiento preferido de transformación de planta es el bombardeo de microproyectiles, por ejemplo, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos 5.015.580 (soja), 5.550.318 (maíz), 5.538.880 (maíz), 6.153.812 (trigo), 6.160.208 (maíz), 6.288.312 (arroz) y 6.399.861 (maíz), y 6.403.865 (maíz).

10 Otro procedimiento de transformación de planta es la transformación mediada por *Agrobacterium*. En una realización preferida, la célula de planta transgénica no natural de la presente invención se obtiene mediante transformación por medio de *Agrobacterium* que contiene un sistema de plásmido Ti binario, en el que el *Agrobacterium* porta un primer plásmido Ti y un segundo plásmido quimérico que contiene al menos un borde de ADN-T de un plásmido Ti de tipo silvestre, un promotor funcional en la célula de planta transformada y unido operativamente a una construcción de supresión génica descrita. Véase, por ejemplo, el sistema binario descrito en la patente de Estados Unidos 5.159.135, incorporada por referencia. Véase también De Framond (1983) *Biotechnology*, 1:262-269; y Hoekema y col., (1983) *Nature*, 303:179. En dicho sistema binario, el plásmido menor, que contiene el borde o bordes de ADN-T, puede construirse y manipularse de manera conveniente en un hospedador alternativo adecuado, tales como *E. coli*, y después transferirse a *Agrobacterium*.

15 Los procedimientos detallados para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*, especialmente de plantas de cultivo, incluyen, por ejemplo, los procedimientos desvelados en las patentes de Estados Unidos 5.004.863, 5.159.135, y 5.518.908 (algodón); 5.416.011, 5.569.834, 5.824.877 y 6.384.301 (soja); 5.591.616 y 5.981.840 (maíz); 5.463.174 (brassicáceas), y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0244075 (maíz). Se han comunicado procedimientos similares para muchas especies vegetales, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, incluyendo, entre otros, cacahuete (Cheng y col. (1996) *Plant Cell Rep.*, 15: 653); espárrago (Bytebier y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5345); cebada (Wan y Lemaux (1994) *Plant Physiol.*, 104:37); arroz (Toriyama y col. (1988) *Bio/Technology*, 6:10; Zhang y col. (1988) *Plant Cell Rep.*, 7:379; trigo (Vasil y col. (1992) *Bio/Technology*, 10:667; Becker y col. (1994) *Plant J.*, 5:299), alfalfa (Masoud y col. (1996) *Transgen. Res.*, 5:313); y tomate (Sun y col. (2006) *Plant Cell Physiol.*, 47:426-431). Véase también una descripción de vectores, procedimientos de transformación, y de producción de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas donde se expresan factores de transcripción de manera constitutiva por un promotor CaMV35S, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0167537. Las células de plantas transgénicas y las plantas transgénicas pueden obtenerse también mediante transformación con otros vectores, tales como, aunque no de forma limitativa, vectores víricos (por ejemplo, los potivirus del grabado del tabaco (TEV), los virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV), y los virus a los que se hace referencia en Edwardson y Christie, "The Potyvirus Group: Monografía n.º 16, 1991, Agric. Exp. Station, Univ. de Florida), plásmidos, cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levaduras), BAC (cromosomas artificiales bacteriano) o cualquier otro vector de clonación adecuado, cuando se usa con un protocolo de transformación adecuado, por ejemplo, infecciones bacterianas (por ejemplo, con *Agrobacterium* como se ha descrito anteriormente), construcciones de cromosomas artificiales bacterianos binarios, administración directa de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio, y bombardeo de microproyectiles). Será evidente para una persona normalmente experta en la técnica que se pueden usar diversas metodologías de transformación y modificarse para la producción de plantas transgénicas estables de cualquier número de especies vegetales de interés.

20 Los procedimientos de transformación para proporcionar células vegetales transgénicas y plantas transgénicas que contengan ADN recombinante integrado de manera estable se ponen en práctica preferentemente en cultivo tisular en medio y en un ambiente controlado. "Medio" se refiere a las numerosas mezclas de nutrientes que se usan para cultivar células *in vitro*, es decir, fuera del organismo vivo intacto. Las dianas de células receptoras incluyen células meristemáticas, callo, embriones inmaduros o partes de embriones, y gametocitos, tales como microesporas, polen, esperma, y ovocitos. Cualquier célula a partir de la cual pueda regenerarse una planta fértil se contempla como una célula receptora útil para la práctica de la invención. Pueden iniciarse callos a partir de diversas fuentes de tejido, incluyendo, aunque no de forma limitativa, embriones inmaduros o partes de embriones, plantones de meristemas y microesporas. Aquellas células que son capaces de proliferar en forma de callo pueden servir como células receptoras para la transformación genética. Los procedimientos y materiales de transformación prácticos para producir plantas transgénicas no naturales de la presente invención (por ejemplo, diversos medios y células diana receptoras, transformación de embriones inmaduros, y la posterior regeneración de plantas transgénicas fértiles) se desvelan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6.194.636 y 6.232.526 y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0216189. Las plantas transgénicas incluyen tejidos o partes de plantas transgénicas, tales como portainjertos transgénicos o injertos transgénicos o material de vástagos, que se pueden usar en combinación con tejidos o partes de plantas no transgénicas.

En la práctica general de la transformación, se introduce ADN solo en solo un pequeño porcentaje de células diana en un experimento cualquiera de transformación. Generalmente se usan genes marcadores para proporcionar un sistema eficaz para la identificación de aquellas células que se transforman de manera estable mediante la recepción e integración de una construcción de ADN transgénica en sus genomas. Los genes marcadores preferidos proporcionan marcadores de selección que confieren resistencia a un agente de selección, tal como un antibiótico o herbicida. Cualquiera de los antibióticos o herbicidas a los que puede ser resistente una planta pueden ser agentes de selección útiles. Las células potencialmente transformadas se exponen al agente de selección. En la población de células supervivientes se encontrarán aquellas células en donde, en general, se integra el gen que confiere resistencia y se expresa a niveles suficientes para permitir la supervivencia celular. Las células pueden ensayarse adicionalmente para confirmar la integración estable del ADN recombinante. Los genes marcadores de selección usados comúnmente incluyen aquellos que confieren resistencia a los antibióticos, tales como kanamicina o paromomicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) o resistencia a herbicidas, tales como glufosinato (*bar* o *pat*) y glifosato (EPSPS). Los ejemplos de genes marcadores de selección y de agentes de selección útiles se ilustran en las patentes de Estados Unidos 5.550.318, 5.633.435, 5.780.708, y 6.118.047. Los marcadores de exploración o indicadores, tales como marcadores que proporcionan una capacidad para identificar visualmente transformantes, también pueden emplearse. Los ejemplos no limitativos de marcadores de exploración útiles incluyen, por ejemplo, un gen que expresa una proteína que produce un color detectable actuando sobre un sustrato cromogénico (por ejemplo, beta glucuronidasa (GUS) (*uidA*) o luciferasa (*luc*)) o que es detectable por sí mismo, tal como la proteína fluorescente verde (GFP) (*gfp*) o una molécula inmunogénica. Los expertos en la materia reconocerán que hay disponibles para su uso otros marcadores o indicadores útiles.

Se puede conseguir detectar o medir el cambio resultante en la expresión del gen diana (o la expresión simultánea de un gen de interés) obtenido mediante transcripción de la construcción recombinante en la planta transgénica no natural de la invención mediante cualesquiera procedimientos adecuados, incluyendo procedimientos de detección de proteínas (por ejemplo, transferencias Western, ELISA, y otros procedimientos inmunoquímicos), mediciones de la actividad enzimática, o procedimientos de detección de ácidos nucleicos (por ejemplo, transferencias Southern, transferencias Northern, PCR, RT-PCR, hibridación fluorescente *in situ*). Dichos procedimientos son bien conocidos por las personas expertas en la técnica como se evidencia por los numerosos manuales disponibles; véanse, por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001; Frederick M. Ausubel y col. (editores) "Short Protocols in Molecular Biology" (quinta edición), John Wiley and Sons, 2002; John M. Walker (editor) "Protein Protocols Handbook" (segunda edición), Humana Press, 2002; y Leandro Pena (editor) "Transgenic Plants: Methods and Protocols", Humana Press, 2004.

Otros procedimientos adecuados para detectar o medir el cambio resultante en la expresión del gen diana (o la expresión simultánea de un gen de interés) obtenido mediante la transcripción del ADN recombinante en la planta transgénica no natural de la invención incluye la medición de cualquier otro rasgo que sea una indicación directa o próxima de la expresión del gen diana (o la expresión simultánea de un gen de interés) en la planta transgénica en la que se transcribe el ADN recombinante, con respecto a uno en el que no se transcribe el ADN recombinante, por ejemplo, rasgos morfológicos evidentes o microscópicos, velocidades de crecimiento, rendimiento; velocidades reproductivas o de reclutamiento, resistencia a plagas o patógenos, o resistencia al estrés biótico o abiótico (por ejemplo, estrés por déficit de agua, estrés salino, estrés por nutrientes, estrés por calor o frío). Dichos procedimientos pueden usar mediciones directas de un rasgo fenotípico o ensayos aproximados (por ejemplo, en plantas, estos ensayos incluyen ensayos con partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces para determinar la tolerancia al estrés abiótico).

Las construcciones de ADN recombinante de la invención pueden agruparse con otros ADN recombinantes para conferir rasgos adicionales (por ejemplo, en el caso de plantas transformadas, rasgos que incluyan resistencia a herbicidas, resistencia a plagas, tolerancia a la germinación en frío, tolerancia al déficit hídrico) por ejemplo, expresando o suprimiendo otros genes. Las construcciones para la disminución y aumento coordinado de la expresión génica se desvelan en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0126845.

Las semillas fértiles de plantas transgénicas se pueden cosechar y utilizarse para hacer crecer generaciones de progenie, incluyendo generaciones híbridas, de plantas transgénicas no naturales de la presente invención que incluyen la construcción de ADN recombinante en su genoma. De este modo, además de la transformación directa de una planta con una construcción de ADN recombinante, las plantas transgénicas no naturales pueden prepararse cruzando una primera planta que tenga el ADN recombinante con una segunda planta que carezca de la construcción. Por ejemplo, el ADN recombinante puede introducirse en una línea de plantas que sea susceptible de transformación para producir una planta transgénica no natural. que puede cruzarse con una segunda línea de plantas para introducir por introgresión el ADN recombinante en la descendencia resultante. Una planta transgénica no natural con un ADN recombinante (que efectúa un cambio en la expresión de un gen diana) puede cruzarse con una línea de plantas que tiene otro ADN recombinante que confiere uno o más rasgo(s) adicionales (tales como la resistencia a herbicidas, resistencia a plagas o enfermedades, resistencia al estrés ambiental, contenido de nutrientes modificado, y mejora del rendimiento) para producir plantas descendientes que tienen ADN recombinante que confiere tanto el comportamiento de expresión de la secuencia diana deseada como los rasgos adicionales.

Típicamente, en dicho cruzamiento para combinar rasgos, la planta transgénica que dona el rasgo adicional puede

ser una línea masculina y la planta transgénica que porta los rasgos básicos es la línea femenina. La descendencia de este cruce se segrega de tal forma que algunas de las plantas portarán el ADN para ambos rasgos progenitores y algunas portarán el ADN para un rasgo progenitor; dichas plantas pueden identificarse mediante marcadores asociados con ADN recombinante progenitor. Las plantas descendientes que portan ADN para ambos rasgos progenitores pueden retrocruzarse en la línea progenitora hembra múltiples veces, por ejemplo, usualmente 6 a 8 generaciones, para producir una planta descendiente con sustancialmente el mismo genotipo que una línea progenitora transgénica original, pero para el ADN recombinante de la otra línea progenitora transgénica.

Se desvela además una planta transgénica no natural que crece a partir de la semilla transgénica anteriormente mencionada. Se contemplan plantas transgénicas no naturales que crecen directamente a partir de semillas transgénicas que contienen el ADN recombinante así como generaciones descendientes de plantas, incluyendo líneas de plantas puras o híbridas, producidas mediante el cruzamiento de una planta transgénica cultivada directamente a partir de semillas transgénicas en una segunda planta no cultivada a partir de la misma semilla transgénica.

El cruzamiento puede incluir, por ejemplo, las siguientes etapas:

- (a) semillas de plantas de la primera planta progenitora (por ejemplo, no transgénica o una transgénica) y una segunda planta progenitora que es transgénica, de acuerdo con la invención;
- (b) cultivar las semillas de la primera y la segunda planta progenitora en plantas que portan flores;
- (c) polinizar una flor del primer progenitor con polen del segundo progenitor; y
- (d) cosechar semillas producidas en la planta progenitora que porta la flor fertilizada.

A menudo es deseable introducir mediante introgresión ADN recombinante en variedades de élite, *por ejemplo*, mediante retrocruzamiento, para transferir un rasgo específico deseable de una fuente a una planta pura u otra que carezca de ese rasgo. Esto puede lograrse, por ejemplo, cruzando en primer lugar un endógamo superior ("A") (progenitor recurrente) con un individuo de puro donante ("B") (progenitor no recurrente), que porta el gen o los genes adecuados para el rasgo en cuestión, por ejemplo, una construcción preparada de acuerdo con la presente invención. La descendencia de este cruce se selecciona en primer lugar en la descendencia resultante respecto del rasgo deseado que se va a transferir a partir del progenitor "B" no recurrente, y después se vuelve a emparejar la descendencia seleccionada con el progenitor recurrente "A". Después de cinco o más generaciones de retrocruzamientos con selección respecto del rasgo deseado, la descendencia puede ser esencialmente hemiciótica para los loci que controlan la característica que se está transfiriendo, pero son como el progenitor superior para la mayoría o prácticamente todos los demás genes. La última generación de retrocruzamiento podría autoemparejarse para proporcionar descendencia que son de raza pura para el gen o los genes que se estén transfiriendo, es decir, uno o más eventos de transformación.

Mediante una serie de manipulaciones de cruzamientos, puede moverse una construcción de ADN seleccionada desde una línea a una línea completamente diferente sin la necesidad de manipulación recombinante adicional. Por lo tanto se pueden producir plantas puras que son raza pura para una o más construcciones de ADN. Mediante el cruzamiento de diferentes plantas endogámicas, se puede producir un gran número de híbridos diferentes con diferentes combinaciones de construcciones de ADN. De este modo, pueden producirse plantas que tengan las propiedades agrícolas deseables asociadas frecuentemente con los híbridos ("vigor del híbrido"), así como las características deseables conferidas por una o más construcciones de ADN.

Se pueden usar marcadores genéticos para ayudar en la introgresión de una o más construcciones de ADN de la invención desde un fondo genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas con respecto a reproducción convencional, ya que se puede usar para evitar errores causados por las variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos relativos al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruce en particular. Por ejemplo, cuando una planta con un rasgo deseado que tiene por otra parte un fondo genético no agronómicamente deseable se cruza con un precursor de élite, se pueden usar los marcadores genéticos para seleccionar la descendencia que no solo posea el rasgo de interés, sino también una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De este modo, el número de generaciones requeridas para introducir uno o más rasgos en un fondo genético concreto se minimiza. La utilidad de la selección asistida por marcador en la reproducción de plantas transgénicas no naturales de la presente invención, así como los tipos de marcadores moleculares útiles, tales como aunque sin limitarse a SSR y SNP, se describen en el documento WO 02/062129 y en las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos números 2002/0133852, 2003/0049612, y 2003/0005491.

En determinadas células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales, puede ser deseable expresar (o suprimir) de forma simultánea un gen de interés aunque regulando también la expresión de un gen diana. De este modo, en esos casos, la planta transgénica no natural contiene ADN recombinante que incluye además un elemento de expresión génica (o de supresión) para expresar al menos un gen de interés, y la regulación de la expresión de un gen diana se efectúa preferentemente con la expresión simultánea (o supresión) de al menos un gen de interés en la planta transgénica.

De este modo, tal como se describe en el presente documento, las células de plantas transgénicas no naturales o las plantas transgénicas no naturales pueden obtenerse mediante el uso de cualquier procedimiento de transformación integrador o no integrador, transitorio o estable adecuado conocido en la técnica o actualmente desvelado. Las construcciones de ADN recombinante pueden transcribirse en cualquier célula o tejido vegetal o en una planta completa en cualquier estado de desarrollo. Las plantas transgénicas pueden proceder de cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea, tales como plantas de interés comercial o agrícola, tales como plantas de cultivo (especialmente plantas de cultivo usadas para alimentación humana o animal), árboles productores de madera o de pulpa, plantas vegetales, plantas de fruto, y plantas ornamentales. Los ejemplos no limitantes de plantas de interés incluyen plantas de cultivo de grano (tales como trigo, avena, cebada, maíz, centeno, triticale, arroz, mijo, sorgo, quinoa, amaranto, y alforfón); plantas de cultivo forrajero (tales como las hierbas forrajeras y las dicotiledóneas de forrajeras, incluyendo alfalfa, arveja y trébol); plantas de cultivo de semillas oleaginosas (tales como algodón, cártamo, girasol, soja, canola, colza, lino, cacahuetes, y palma de aceite); nueces de árbol (tales como nuez, anacardo, avellana, pecana y almendra); caña de azúcar, coco, palmera datilera, aceite de oliva, remolacha azucarera, té, y café; árboles productores de madera o de pulpa; plantas de cultivos vegetales, tales como legumbres (por ejemplo, alubias, guisantes, lentejas, alfalfa, cacahuete), lechuga, espárrago, alcachofa, apio, zanahoria, rábano, las brasicáceas (por ejemplo, repollo, col rizada, mostazas, y otras brasicáceas foliares, brécol, coliflor, coles de Bruselas, nabo, colinabo), cucurbitáceas comestibles (por ejemplo, pepino, melón, calabaza de verano, calabaza de invierno), alliums comestibles (por ejemplo, cebollas, ajo, puerros, chalotas, cebollinos), miembros comestibles de las solanáceas (por ejemplo, tomates, berenjenas, patatas, pimientos, alquequenjes), y miembros comestibles de las quenopodiáceas (por ejemplo, remolacha, acelga, espinaca, quinoa, amaranto); plantas de cultivos frutales, tales como manzana, pera, frutos cítricos (por ejemplo, naranja, lima, limón, pomelo, y otros), frutas con hueso (por ejemplo, albaricoque, melocotón, ciruela, nectarina), plátano, piña, uva, kiwi, papaya, aguacate, y bayas; y plantas ornamentales, tales como plantas de flor ornamentales, árboles y arbustos ornamentales, tréboles ornamentales, y hierbas ornamentales. Las plantas dicotiledóneas preferidas incluyen canola, brécol, repollo, zanahoria, coliflor, col china, pepino, legumbres secas, berenjena, hinojo, judías verdes, calabazas, lechugas, melón, quimbombó, guisantes, pimientos, calabacitas, rábanos, espinaca, calabaza, sandía, algodón, patata, quinoa, amaranto, alforfón, cártamo, soja, remolacha azucarera, y girasol. Las monocotiledóneas preferidas incluyen trigo, avena, cebada, maíz (incluido el maíz dulce y otras variedades), centeno, triticale, arroz, césped ornamental y hierbas forrajeras, sorgo, mijo, cebollas, puerros, y caña de azúcar, más preferentemente maíz, trigo, y arroz.

La meta última en la transformación de plantas es producir plantas que sean útiles para el hombre. A este respecto, se pueden usar plantas transgénicas no naturales para prácticamente cualquier fin de valor para el productor o al consumidor. Por ejemplo, se puede desear cosechar la propia planta transgénica, o cosechar la semilla transgénica de la planta transgénica para fines de plantación, o se pueden preparar productos a partir de la planta transgénica o su semilla tal como aceite, almidón, etanol u otros productos de fermentación, alimentación animal o alimentos para seres humanos, agentes farmacéuticos, y diversos productos industriales. Por ejemplo, el maíz se usa extensamente en alimentos y en las industrias alimentarias, así como en aplicaciones industriales. Se puede encontrar una descripción adicional de los usos del maíz, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos números 6.194.636, 6.207.879, 6.232.526, 6.426.446, 6.429.357, 6.433.252, 6.437.217, y 6.583.338, y los documentos WO 95/06128 y WO 02/057471. De este modo, se desvelan también productos de uso habitual producidos a partir de una célula de una planta transgénica planta, o semillas de la presente invención, incluyendo las hojas recogidas, raíces, brotes, tubérculos, tallos, frutos, semillas, u otras partes de una planta cosechadas, alimentos, aceites, extractos, productos de fermentación o digestión, granos o semillas trituradas o completas de una planta, o cualquier producto alimentario o producto no alimentario incluyendo productos de uso habitual producidos a partir de una célula de una planta transgénica, planta, o semillas como se define en el presente documento anteriormente. La detección de una o más secuencias de ácidos nucleicos de las construcciones de ADN recombinante en uno o más usos habituales o productos de uso habitual contemplados en el presente documento es evidencia de hecho de que los usos habituales o los productos de uso habitual contienen o se derivan de dicha célula de planta transgénica, planta, o semilla.

La planta transgénica no natural preparada a partir de la célula de planta transgénica no natural es una planta transgénica que tiene en su genoma una construcción de ADN recombinante anteriormente mencionada y tiene al menos un rasgo alterado adicional, en relación a una planta que carece de la construcción de ADN recombinante, seleccionado entre el grupo de rasgos que consiste en:

- (a) tolerancia al estrés abiótico mejorada;
- (b) tolerancia al estrés biótico mejorada;
- (c) composición de metabolitos primarios modificada;
- (d) composición de metabolitos secundarios modificada;
- (e) elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas;
- (f) rendimiento mejorado;
- (g) capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes;
- (h) características agronómicas modificadas;
- (i) características de crecimiento o reproductivas modificadas; y
- (j) cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

Se prefiere que la planta transgénica no natural esté caracterizada por: tolerancia mejorada al estrés abiótico (por ejemplo, tolerancia al déficit de agua o sequía, calor, frío, niveles de nutrientes o de sal no óptimos, niveles de luz no óptimos) o de estrés biótico (por ejemplo, superpoblación, alelopatía, o heridas); por un metabolito primario modificado (por ejemplo, ácido graso, aceite, aminoácido, proteína, azúcar, o carbohidratos); un metabolito secundario modificado (por ejemplo, alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos, y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto); una composición modificada de elementos traza (por ejemplo, hierro, cinc), carotenoides (por ejemplo, *beta-caroteno*, licopeno, luteína, zeaxantina, u otros carotenoides y xantofilas), o vitaminas (por ejemplo, tocoferoles) rendimiento mejorado (por ejemplo, rendimiento mejorado en condiciones de estresantes o rendimiento mejorado en condiciones de estrés biótico o abiótico); capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas (por ejemplo, maduración retardada; senescencia retardada; madurez temprana o tardía; tolerancia a la sombra mejorada; resistencia mejorada al acame de la raíz o tallo; resistencia mejorada al "quebrado en verde" de los tallos; respuesta modificada al fotoperíodo); características de crecimiento o reproductivas modificadas (por ejemplo, enanismo intencionado; esterilidad masculina intencional, utilidad, por ejemplo, en procedimientos de hibridación mejorados; velocidad de crecimiento vegetativo mejorada; germinación mejorada; fertilidad masculina o fertilidad femenina mejoradas); cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados (por ejemplo, resistencia mejorada a plagas durante el almacenamiento, resistencia mejorada a la rotura, mejor aspecto para los consumidores); o cualquier combinación de estos rasgos.

Se prefiere que, la semilla transgénica, o semilla producida por la planta transgénica no natural, tenga una composición modificada de un metabolito primario (por ejemplo, ácido graso, aceite, aminoácido, proteína, azúcar, o carbohidratos), un metabolito secundario modificado (por ejemplo, alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos, y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto), una composición modificada de elementos traza (por ejemplo, hierro, cinc), carotenoides (por ejemplo, *beta-caroteno*, licopeno, luteína, zeaxantina, u otros carotenoides y xantofilas), o vitaminas (por ejemplo, tocoferoles), una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados, o una combinación de estos. Por ejemplo, puede ser deseable modificar el aminoácido (por ejemplo, lisina, metionina, triptófano, o la proteína total) aceite (por ejemplo, composición de ácido graso o aceite total), carbohidratos (por ejemplo, azúcares o almidones simples), elementos traza, carotenoides, o el contenido de vitaminas de las semillas de plantas de cultivos (por ejemplo canola, algodón, cártamo, soja, remolacha azucarera, girasol, trigo, maíz, o arroz), preferentemente en combinación con una cosecha de semillas, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados, y proporcionar de esta manera una semilla mejorada para su uso en alimentación animal y alimentos para seres humanos. En otros casos, puede ser deseable cambiar los niveles de componentes naturales de la planta o semilla transgénica de una planta transgénica, por ejemplo, para disminuir los niveles de proteínas con bajos niveles de lisina, metionina, o triptófano, o para aumentar los niveles de un aminoácido o ácido graso deseado, o para disminuir los niveles de una proteína o glucoproteína alérgica (por ejemplo, alérgenos del cacahuete que incluyen ara h 1, alérgenos del trigo que incluyen gliadinas y gluteninas, alérgenos de la soja que incluyen el alérgeno P34, globulinas, glicininas, y conglucinininas) o de un metabolito tóxico (por ejemplo, glucosidasas cianógenas en mandioca, alcaloides de solanum en miembros de la Solanáceas

PROCEDIMIENTOS DE SUPRESIÓN GÉNICA

Se desvela además un procedimiento para realizar la supresión génica, que incluye las etapas de: (a) proporcionar una planta transgénica no natural incluyendo una planta regenerada preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural, o una planta descendiente de la planta regenerada (como se ha descrito anteriormente bajo el encabezado "Células de plantas transgénicas y plantas transgénica"); y (b) transcribir la construcción de ADN recombinante en la planta transgénica no natural; en la que la transcripción produce un ARN que es capaz de suprimir el al menos un gen diana de la planta transgénica no natural, y mediante lo cual, el al menos un gen diana se suprime con respecto a su expresión en ausencia de transcripción de la construcción de ADN recombinante.

El al menos un gen diana es al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en un gen nativo de la planta transgénica, un transgén de la planta transgénica, y un gen nativo de una plaga o patógeno vírico, bacteriano, fúngico o de invertebrado de la planta transgénica. Los genes diana adecuados se han descrito anteriormente bajo el encabezado "Genes diana". En algunas realizaciones, el al menos un gen diana es un único gen diana. En otras realizaciones, el al menos un gen diana son varios genes diana. La supresión de un gen diana incluye la supresión no específica, por ejemplo, la expresión constitutiva, así como expresión específica, por ejemplo, espacialmente específica, temporalmente específica, específica del desarrollo, o la supresión génica inducible. La especificidad de la supresión del al menos un gen diana se consigue mediante técnicas conocidas del experto en la materia, tales como la selección de un promotor que tiene el patrón de expresión específico deseado, o mediante la selección de un sitio de reconocimiento de microARN que se reconoce por un miARN maduro que tiene el patrón de expresión específico deseado.

La transcripción de la construcción de ADN recombinante se lleva a cabo por medios conocidos en la materia. La transcripción puede ser constitutiva o no específica, por ejemplo, bajo el control de un promotor constitutivo. En otros casos, la transcripción se produce en condiciones específicas espaciales, temporales, o inducibles. Por ejemplo, la construcción de ADN recombinante puede incluir un promotor específico espacial, temporal, o inducible. En otro ejemplo, la construcción de ADN recombinante puede incluir un interruptor ribosómico (ADN que se transcribe a un aptámero de ARN capaz de unirse a un ligando, y ADN que se transcribe a ARN regulador capaz de regular la

expresión del gen diana, en el que la regulación es dependiente de la conformación del ARN regulador, y la conformación del ARN regulador está afectada alostéricamente por el estado de unión del aptámero de ARN) permitiendo de esta forma que la transcripción de la construcción de ADN recombinante se controle mediante el estado de unión del aptámero de ARN y, por tanto, mediante la presencia (o ausencia) del ligando.

Se desvela además un procedimiento para realizar en paralelo la supresión génica de al menos un gen diana y de la expresión génica de al menos un gen de interés, que incluye las etapas de: (a) proporcionar una planta transgénica no natural incluyendo una planta regenerada preparada a partir de la célula de planta transgénica no natural, o una planta descendiente de la planta regenerada (como se ha descrito anteriormente bajo el encabezado "Células de plantas transgénicas y plantas transgénica"), en la que la construcción de ADN recombinante incluye además un elemento de expresión génica para expresar el al menos un gen de interés; y (b) transcribir la construcción de ADN recombinante en la planta transgénica no natural, en el que, cuando la construcción de ADN recombinante se transcribe en la planta transgénica no natural, se produce un ARN transcrito que es capaz de suprimir el al menos un gen diana y un ARN transcrito que codifica el al menos un gen de interés, mediante lo cual, el al menos un gen diana se suprime con respecto a su expresión en ausencia de transcripción de la construcción de ADN recombinante y se expresa en paralelo el al menos un gen de interés.

Un gen de interés puede incluir cualquier secuencia codificante o no codificante de cualquier especie (incluyendo no eucariotas tales como bacterias, y virus; hongos; plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como plantas de cultivo, plantas ornamentales, y plantas no domesticadas o salvajes; invertebrados tales como artrópodos, anélidos, nematodos, y moluscos; y vertebrados tales como anfibios, pescado, aves, y mamíferos. Los ejemplos no limitantes de una secuencia no codificante a expresar mediante un elemento de expresión génica incluyen regiones 5' no traducidas, promotores, potenciadores, u otras regiones transcripcionales no codificantes, regiones 3' no traducidas, terminadores, intrón, microARN, secuencias de ADN precursor de miARN, ARN interferentes pequeños, componentes de ARN de ribosomas o ribozimas, ARN nucleolares pequeños, aptámeros de ARN capaces de unirse a un ligando, y otros ARN no codificantes. Los ejemplos no limitantes de un gen de interés incluyen además secuencias traducibles (codificantes), tales como genes que codifican los factores de transcripción y los genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o el catabolismo de moléculas de interés (tales como aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros hidratos de carbono, polímeros biológicos, y metabolitos secundarios incluyendo alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos, y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto). Un gen de interés puede ser un gen natural para la célula (por ejemplo, una célula vegetal) en la que la construcción de ADN recombinante de la invención se va a transcribir, o puede ser un gen no natural. Un gen de interés puede ser un gen marcador, por ejemplo, un gen marcador seleccionable que codifica un antibiótico, antifúngico, o resistencia a herbicidas, o un gen marcador que codifica un rasgo fácilmente detectable (por ejemplo, en una célula vegetal, fitoenosintasa u otros genes que transmiten un pigmento concreto a la planta), o un gen que codifica una molécula detectable, tal como una proteína fluorescente, luciferasa, o un polipéptido único o ácido nucleico "marca" detectable por procedimientos de detección de proteínas o ácidos nucleicos, respectivamente). Los marcadores seleccionables son genes de interés de especial utilidad para identificar un procesamiento correcto de las construcciones. Los genes de interés incluyen aquellos genes también descritos anteriormente como genes diana, en el encabezado "Genes diana".

El gen de interés a expresar mediante el elemento de expresión génica puede incluir al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en un gen diana eucariota, un gen diana no eucariota, y una secuencia de ADN precursora de miARN. El gen de interés puede incluir un único gen o varios genes (tales como múltiples copias de un solo gen, múltiples alelos de un solo gen, o múltiples genes, incluidos genes de múltiples especies). El elemento de expresión génica puede incluir secuencias de péptidos autohidrolizables, por ejemplo, situadas entre múltiples secuencias que codifican uno o más polipéptidos (véase, por ejemplo, las secuencias autoescindibles 2A y "2Alike" procedentes de diversas especies, incluyendo virus, tripanosomas, y bacterias, desvelados en Donnelly y col. (2001), J. Gen. Virol., 82:1027-1041). Además, el elemento de expresión génica puede incluir secuencias que "saltan" ribosomas, por ejemplo, situadas entre múltiples secuencias que codifican uno o más polipéptidos (véase, por ejemplo, las secuencias que saltan ribosomas del aftovirus virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV) 2A desveladas por Donnelly y col. (2001), J. Gen. Virol., 82:1013-1025).

MIARNA SENSIBLES AL ESTRÉS ABIÓTICO

Se describen además miARN que presentan un patrón de expresión que es sensible al estrés abiótico, por ejemplo, un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por nutrientes, un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por agua, o un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por temperatura.

Los **Ejemplo 6 - 11** describen un novedoso miARN que fue identificado en plantas de cultivo y que recibió el nombre trivial de miRMON18, que presenta un patrón de expresión caracterizado por la supresión del miARN bajo estrés por nutrientes (es decir, deficiencia de nitrógeno, deficiencia de fosfato, o deficiencia tanto de nitrógeno como de fosfato). El miRMON18 maduro es un miARN de 21 nucleótidos que tiene la secuencia UUAGAUGACCAUCAGCAAACA y se clonó a partir de librerías de ARN pequeño de arroz (**SEQ ID NO. 393**), maíz (**SEQ ID NO. 3227**), y soja (**SEQ ID NO. 8742**). Se identificaron secuencias precursoras en el arroz (**SEQ ID NO.**

1763) y en el maíz (SEQ ID NO. 3936).

Las construcciones de ADN recombinantes se describen con mayor detalle bajo el encabezado "Construcciones de ADN recombinante" anterior y son de utilidad con cualquiera de los miARN desvelados en el presente documento, por ejemplo, un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1 - 1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. La descripción de las construcciones de ADN recombinante también se aplica a los miARN que tienen un patrón de expresión particular, tal como un miARN sensible al estrés por nutrientes en plantas (por ejemplo, miRMON18 y otros miARN descritos en los Ejemplos) como se describe en esta sección. La siguiente descripción se dirige a miRMON18 pero también es aplicable a otros miARN regulados mediante estrés abiótico, especialmente un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la supresión del miARN en condiciones de estrés por nutrientes, un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la supresión del miARN bajo el estrés por agua, o un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la supresión del miARN bajo el estrés por temperatura; los ejemplos no limitantes de miARN regulados por estrés abiótico incluyen miR399 y miR319.

De este modo, se describe una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que al menos un elemento de ADN transcribible se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia de miRMON18 precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1763 y SEQ ID NO. 3936** y se procesa para dar un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de UUAGAUGACCAUCAGCAAACA (**SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742**); (b) un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia de un miRMON18 precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NO. 1763 y SEQ ID NO. 3936**, en el que el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética incluye un miARN miRMON18 maduro modificado; (c) un elemento de ADN que se localiza o es adyacente a una unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN incluyendo un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763 y SEQ ID NO. 3936**; y (d) un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN endógeno derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1763 y SEQ ID NO. 3936**. Estas realizaciones dirigidas a miRMON18 se describen más detalladamente a continuación.

(A) Expresión de un miRMON18 natural en condiciones no naturales

Se describe una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que el al menos un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia de miRMON18 precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1763 y SEQ ID NO. 3936** y se procesa para dar un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de **SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742**, y el al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y en el que la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. Se prefiere que el miARN precursor incluye un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos de la secuencia precursora de miRMON18. Dichas construcciones son especialmente útiles para la expresión de miRMON18 en un patrón de expresión diferente al patrón de expresión del miRMON18 natural (por ejemplo, en diferentes tejidos, en diferentes momentos, o en diferentes niveles de expresión).

El miRMON18 precursor no tiene que incluir todos los nucleótidos contenidos en una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1763 y SEQ ID NO. 3936**, pero incluye preferentemente un segmento contiguo de al menos 80%, o al menos del 85%, o al menos del 90%, o al menos del 95%, o al menos del 97%, o al menos del 98%, o al menos del 99% de los nucleótidos de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre las **SEQ ID NO. 1763 y SEQ ID NO. 3936**. Se prefiere que el miARN precursor incluye un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre las **SEQ ID NO. 1763 y SEQ ID NO. 3936**. Independientemente de la secuencia de nucleótidos específica utilizada, el precursor de miRMON18 forma una estructura replegada que es idéntica o casi idéntica a la estructura replegada formada por la secuencia precursora de amiRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763 y SEQ ID NO. 3936** y que se procesa *in vivo* en una o más etapas para dar un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742**.

Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta que incluya al menos un sitio de reconocimiento de miRMON18 (sitio diana), y la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. Además, se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta y, de esta manera, la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. Además, se prefiere que la construcción de ADN recombinante incluya además un promotor diferente al promotor de miRMON18 natural. Esto permite la expresión del miARN miRMON18 maduro en condiciones espaciales, o temporales, o inducibles bajo las cuales podría no

expresarse de forma natural. Por ejemplo, la construcción de ADN recombinante se puede diseñar para que incluya un promotor constitutivo y, de esta manera, expresar constitutivamente un miRMON18 maduro que tiene un patrón de expresión caracterizado por la supresión del miARN en condiciones de estrés por nutrientes (es decir, deficiencia de nitrógeno, deficiencia de fosfato, o deficiencia tanto de nitrógeno como de fosfato); esto daría como resultado la supresión constitutiva del gen diana miRMON18. En otro ejemplo, la construcción de ADN recombinante se puede diseñar para que incluya un promotor inducible específico de la raíz y expresar de esta manera un miRMON18 maduro en la raíz tras la inducción; esto daría como resultado la supresión del gen diana miRMON18 en el tejido radicular tras la inducción. Los promotores que son útiles con esta construcción de ADN recombinante se describen en el apartado "Promotores".

10 (B) Expresión de un miARN maduro diseñado mediante ingeniería genética derivado de miRMON18.

Se describe una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en la que el al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre las **SEQ ID NO. 1763** y **SEQ ID NO. 3936**, en la que el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética incluye un miARN miRMON18 maduro modificado, en la que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta o un gen endógeno de una plaga o patógeno de la planta, y en el que la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana.

Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta o un gen endógeno de una plaga o patógeno de la planta, y la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana. Los genes diana adecuados se han descrito anteriormente bajo el encabezado "Genes diana". Por "diseñado mediante ingeniería genética" se entiende que los nucleótidos se cambian (se sustituyen, eliminan, o añaden) a una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763** y **SEQ ID NO. 3936**, dando como resultado por tanto un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética que tiene sustancialmente la misma estructura replegada que la secuencia del miRMON18 precursor natural, pero en la que el miARN maduro que se procesa a partir del miRMON18 precursor diseñado mediante ingeniería genética tiene una secuencia modificada (es decir, diferente de la de un miRMON18 maduro) que se diseña para suprimir un gen diana diferente de los genes diana suprimidos naturalmente por la secuencia del miRMON18 precursor natural. Un procedimiento general no limitante para determinar cambios en los nucleótidos de la secuencia precursora de miRMON18 natural para producir el miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética se ha descrito anteriormente bajo el encabezado "Expresión de un miARN maduro diseñado mediante ingeniería genética".

(C) Expresión de un transgén y un sitio de reconocimiento de miRMON18.

Se describe una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, e incluye además una unidad de transcripción del transgén, en el que el al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN que se localiza en o adyacente a la unidad de transcripción del transgén y esta se transcribe a un ARN que incluye un sitio reconocimiento del miARN mediante un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742** o mediante un miARN miRMON18 derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763** y **SEQ ID NO. 3936**, y el al menos un gen diana incluye el transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén, y en el que la expresión de la construcción de ADN recombinante en una planta da como resultado la expresión del transgén en células de la planta en las que el miARN miRMON18 maduro no se expresa naturalmente. La predicción de un sitio de reconocimiento miRMON18 se logra usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como reglas de complementariedad de secuencia, tal como se describen por Zhang (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:W701-704 y por Rhoades y col. (2002) *Cell*, 110:513-520; los ejemplos no limitantes de sitios de reconocimiento de miRMON18 se proporcionan en los Ejemplos de trabajo siguientes.

La predicción de un sitio de reconocimiento del miRMON18 permite la identificación y validación de genes endógenos regulados por un miRMON18 maduro a partir de un miRMON18 precursor expresado naturalmente; esto es útil, por ejemplo, para eliminar o modificar un sitio de reconocimiento del miRMON18 en un gen endógeno para desacoplar la expresión de este gen de la desregulación por el miRMON18 endógeno que regula naturalmente la expresión del gen. En una realización, el número de emparejamientos incorrectos (especialmente los correspondientes a las posiciones 2 a 13 del miRMON18 maduro) entre un sitio de reconocimiento de miRMON18 y un miRMON18 maduro puede aumentarse para prevenir el reconocimiento y la escisión mediante un miRMON18 endógeno.

Las construcciones de ADN recombinante son particularmente útiles para la expresión *in planta* del transgén a restringir de acuerdo con la expresión endógena de miRMON18, es decir, el transgén se expresa cuando el miRMON18 se suprime, tal como en condiciones de estrés por nutrientes (es decir, deficiencia de nitrógeno, deficiencia de fosfato, o deficiencia tanto de nitrógeno como de fosfato). La expresión del transgén se puede controlar adicionalmente mediante el uso de un promotor apropiado. En un ejemplo no limitante, una construcción de

ADN recombinante que codifica (a) un transgén bajo el control de un promotor específico de la raíz y (b) un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miRMON18 maduro que se expresa específicamente solamente en condiciones de deficiencia de nitrógeno (o fosfato), se utiliza para la expresión del transgén en raíces de una planta en condiciones de deficiencia de nitrógeno (o fosfato).

- 5 La unidad de transcripción del transgén incluye al menos un transgén, y, opcionalmente una secuencia adicional tal como un promotor, un potenciador del promotor, un terminador, un ARN mensajero que estabiliza o desestabiliza la secuencia (véanse, por ejemplo, Newman y col. (1993) *Plant Cell*, 5:701-714; Green (1993) *Plant Physiol.*, 102:1065-1070; y Ohme-Takagi y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11811-11815), secuencia para la localización o el transporte del transcrito del transgén a una localización específica (por ejemplo, mitocondria, plástido, nucléolo, peroxisoma, retículo endoplasmático), u otra secuencia relacionada con el procesamiento deseado del transgén. El transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén puede incluir uno cualquiera o más genes de interés, incluyendo una secuencia codificante, secuencia no codificante, o ambos. Los genes de interés pueden incluir cualquiera de los genes relacionados en "Genes diana", cuyos ejemplos preferidos incluyen la secuencia (codificante) traducible de los genes que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de moléculas de interés (tales como aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros hidratos de carbono, polímeros biológicos, y metabolitos secundarios incluyendo alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos, y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto).

(D) Supresión de un miRMON18 endógeno o natural.

- 20 Se describe una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que el al menos un elemento de ADN transcribible incluye un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN miRMON18 maduro endógeno derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763** y **SEQ ID NO. 3936**, en la que el al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y en la que la expresión del gen endógeno esté suprimida en células de la planta cuando se produce la expresión natural del miARN miRMON18 maduro endógeno y, en la que la expresión de la construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión del gen endógeno en las células. Dichas construcciones son especialmente útiles para la supresión de un nativo de un miRMON18 natural o endógeno y, por tanto, para permitir la expresión de genes que tienen uno o más sitios de reconocimiento de miRMON18. Se prefiere que el al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta e incluya uno o más sitios de reconocimiento de miRMON18, y la expresión del gen endógeno esté suprimida en células de la planta cuando se produce la expresión natural del miRMON18 maduro endógeno, y de esta manera, la expresión de la construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión del gen endógeno diana en las células.

El elemento de ADN para suprimir la expresión incluye al menos uno de:

- 35 (a) ADN que incluye al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana;
 (b) ADN que incluye múltiples copias de al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana;
 (c) ADN que incluye al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del gen diana;
 40 (d) ADN que incluye múltiples copias de al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del gen diana;
 (e) ADN que se transcribe a ARN para suprimir el gen diana formando ARN bicatenario e incluye al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana y al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del gen diana;
 45 (f) ADN que se transcribe a ARN para suprimir el gen diana formando un único ARN bicatenario e incluye múltiples segmentos de ADN de sentido contrario en serie que son de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana y múltiples segmentos de ADN de sentido directo en serie que tienen al menos un segmento del gen diana
 (g) ADN que se transcribe a ARN para suprimir el gen diana formando múltiples ARN bicatenarios e incluye múltiples segmentos de ADN de sentido contrario que son de sentido contrario para al menos un segmento del gen diana y múltiples segmentos de ADN de sentido directo que tienen al menos un segmento del gen diana, y en los que los múltiples segmentos de ADN de sentido contrario y los múltiples segmentos de ADN con sentido están dispuestos en una serie de repeticiones invertidas;
 50 (h) ADN que incluye nucleótidos procedentes de un miARN de planta;
 55 (i) ADN que incluye nucleótidos de ARNpi;
 (j) ADN que se transcribe en un aptámero de ARN capaz de unirse a un ligando; y
 (k) ADN que se transcribe a un aptámero de ARN capaz de unirse a un ligando, y ADN que se transcribe a ARN regulador capaz de regular la expresión del gen diana, en el que la regulación es dependiente de la conformación del ARN regulador, y la conformación del ARN regulador está afectada alostéricamente por el estado de unión del aptámero de ARN.

Los elementos del ADN para suprimir la expresión se describen más detalladamente en el **Ejemplo 3** y se

representan gráficamente en las **Figuras 2 y 3**. También se pueden controlar los efectos de un miARN sobre su gen diana mediante procedimientos alternativos descritos en detalle a continuación en "Secuencias señuelo de microARN".

La construcción de ADN recombinante puede incluir el ADN diseñado para transcribirse a ARN monocatenario o al menos ARN parcialmente bicatenario (tal como en una disposición "tallo-bucle en contacto"), o a un ARN que asume una estructura secundaria o una configuración tridimensional (por ejemplo, un bucle grande de secuencia de sentido contrario del gen diana o un aptámero) que confiere al transcrito una característica deseada adicional, tal como una estabilidad aumentada, una semivida aumentada in vivo, o una especificidad celular o tisular. En un ejemplo, el separador se transcribe a un bucle estabilizante que une la primera y segunda serie de segmentos de ARN contiguos (véase, por ejemplo, Di Giusto y King (2004) *J. Biol. Chem.*, 279:46483-46489). En otro ejemplo, la construcción de ADN recombinante incluye el ADN que se transcribe a ARN que incluye un aptámero de ARN (por ejemplo, un aptámero que se une a un ligando específico de célula que permite el direccionamiento específico de célula o tejido del duplete de ARN recombinante).

(E) Transgenes que no responden a miARN, incluyendo transgenes que no responden a miRMON18.

También se describe una construcción de ADN recombinante que incluye una secuencia de un transgén sintético que no responde a miARN que es insensible a un miARN maduro dado, en el que la secuencia de transgén sintético que no responde a miARN: (a) se deriva de una secuencia sensible a miARN natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN natural reconocidos por el miARN maduro dado dentro de la secuencia sensible a miARN natural, y (b) no se reconoce por el miARN maduro dado. Esto incluye una construcción de ADN recombinante que incluye una secuencia de un transgén sintético que no responde a miARN que es insensible a un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1 - 1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o insensible a un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**, en el que la secuencia de transgén sintético que no responde a miARN: (a) se deriva de una secuencia sensible a miARN natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN natural reconocidos por el miARN maduro dado dentro de la secuencia sensible a miARN natural, y (b) no se reconoce por el miARN maduro dado. La predicción de un sitio de reconocimiento se logra usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como reglas de complementariedad de secuencia, tal como se describen por Zhang (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:W701-704 y por Rhoades *et al.* (2002) *Cell*, 110:513-520.

Se prefiere una construcción de ADN recombinante que incluya una secuencia de un transgén sintético que no responde a miRMON18, en la que la secuencia de un transgén sintético que no responde a miRMON18: (a) se deriva de una secuencia sensible a miRMON18 natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN miRMON18 natural (es decir, delección o modificación de cualquier sitio de reconocimiento que se reconozca por un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742** o mediante un miARN miRMON18 derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763 y SEQ ID NO. 3936**) dentro de la secuencia sensible a miRMON18 natural, y (b) no se reconoce por un miARN miRMON18 maduro.

(F) Promotores del miARN sensibles al estrés abiótico, incluyendo los promotores de miRMON18.

También se describe una construcción de ADN recombinante que incluye un promotor de un miARN que tiene un patrón de expresión caracterizado por la regulación del estrés abiótico, por ejemplo, un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por nutrientes, un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por agua, o un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por temperatura. Se prefiere que incluya una construcción de ADN recombinante que incluya un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por nutrientes, en el que el estrés por nutrientes comprende al menos una deficiencia de nutrientes seleccionada entre el grupo que consiste en deficiencia de nitrógeno y deficiencia de fosfato. El promotor puede ser el de un miARN que se suprime debido a la deficiencia por nitrógeno. En otro caso, el promotor puede ser el de un miARN que se suprime debido a la deficiencia por fosfato. En otro caso más, el promotor puede ser el de un miARN que se suprime debido a la ocurrencia simultánea de deficiencias en nitrógeno y en fosfato. En casos adicionales, el promotor puede ser el de un miARN que se regula en exceso por una deficiencia en nitrógeno o una deficiencia en fosfato.

Se prefiere especialmente una construcción de ADN recombinante que incluya un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la supresión del miARN en condiciones de estrés por nutrientes, en el que el estrés por nutrientes comprende al menos una deficiencia de nutrientes seleccionada entre el grupo que consiste en deficiencia de nitrógeno y deficiencia de fosfato, y en el que el promotor incluye al menos uno de: (a) el promotor del miARN del maíz que presenta en el tejido foliar una expresión intensa en condiciones de suficiente nitrógeno y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno; (b) el promotor del miARN del maíz que presenta

en el tejido foliar una expresión intensa en condiciones de suficiente fosfato y supresión en condiciones de deficiencia de fosfato; (c) un promotor de miRMON18 que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8804**; (d) un fragmento de al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos que tienen al menos una identidad del 85% con un segmento de la **SEQ ID NO. 8804**. También se prefiere que el promotor está unido operativamente a al menos uno de: (a) un elemento de supresión génica, y (b) un elemento de expresión génica; preferentemente, esto es de utilidad para expresar la construcción de ADN recombinante en una planta.

Los ejemplos no limitantes incluyen el promotor que tiene la secuencia de nucleótidos 211 - 2172 de **SEQ ID NO. 8800**; un fragmento de al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, o al menos 500 nucleótidos contiguos que tienen al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 98% de identidad con los nucleótidos 211 - 2172 de **SEQ ID NO. 8800**, en la que el fragmento tiene actividad del promotor en al menos un tejido vegetal que se caracteriza por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o la fuerte expresión en condiciones de fosfato suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de fosfato; y un fragmento de al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, o al menos 500 nucleótidos contiguos que tienen al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos 98% de identidad con la **SEQ ID NO. 8804**, en la que el fragmento tiene actividad del promotor en al menos un tejido vegetal que se caracteriza por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o la fuerte expresión en condiciones de fosfato suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de fosfato.

(G) Células de plantas transgénicas y plantas transgénicas sensibles al estrés abiótico.

Se describe además una célula de planta transgénica no natural que incluye cualquiera de las construcciones de ADN recombinante desveladas bajo este encabezado ("miARN sensibles al estrés abiótico"). Se prefiere una planta transgénica no natural preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que incluye una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que el al menos un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia de miRMON18 precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NO. 1763**, **SEQ ID NO. 3936**, y la **SEQ ID NO. 8800**, en el que el miARN precursor incluye un segmento contiguo de al menos el 90% de los nucleótidos de la secuencia precursora de miRMON18 y que se procesa para obtener un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de UUAGAUGACCAUCAGCAAACA (**SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**) y el al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta e incluye un dominio SPX y, de esta manera, la expresión de la construcción de ADN recombinante en la planta da como resultado la supresión del al menos un gen diana; por lo general, la construcción de ADN recombinante incluye además un promotor diferente al promotor de miRMON18 natural para impulsar la expresión del miRMON18 maduro.

Se prefiere además una planta transgénica no natural preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que incluye una construcción de ADN recombinante que incluye al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que el al menos un elemento de ADN transcribible incluye un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN miRMON18 maduro endógeno derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763**, **SEQ ID NO. 3936**, y la **SEQ ID NO. 8800**, el al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta e incluye un dominio SPX, y la expresión del gen endógeno esté suprimida en células de la planta cuando se produce la expresión natural del miARN miRMON18 maduro endógeno y, en la que la expresión de la construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión del gen endógeno en las células. Los elementos de ADN adecuados para suprimir la expresión de un miARN miRMON18 maduro endógeno se describen en el encabezado "Supresión de un miRMON18 endógeno o natural".

SECUENCIAS SEÑUELO DE MICROARN

Los microARN vegetales regulan sus genes diana mediante el reconocimiento y la unión a una secuencia casi perfectamente complementaria sitio de reconocimiento de miARN) en el transcrito diana, seguido por la escisión del transcrito mediante enzimas RNasa III tales como Ago1. En plantas, no se toleran determinados emparejamientos incorrectos entre un sitio de reconocimiento de miARN dado y el correspondiente miARN maduro, especialmente, nucleótidos incorrectamente emparejados en las posiciones 10 y 11 del miARN maduro. Las posiciones en el miARN maduro se proporcionan en la dirección de 5' a 3'; por claridad, la **Figura 7D** representa gráficamente ejemplos de miARN, miR827 (**SEQ ID NO. 8744**) y miRMON18 (**SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**), con flechas numeradas que indican las posiciones 1, 10, y 21 del miARN maduro; el nucleótido en la posición 10 está también subrayado. La complementariedad perfecta entre un sitio de reconocimiento de miARN dado y el correspondiente miARN maduro se necesita, normalmente, en las posiciones 10 y 11 del miARN maduro. Véase, por ejemplo, Franco-Zorrilla y col. (2007) Nature Genetics, 39:1033-1037; y Axtell y col. (2006) Cell, 127:565-577.

Esta característica de los miARN vegetales se aprovechó para conseguir las reglas que predicen una "secuencia señuelo de microARN", es decir, una secuencia que puede reconocerse y unirse a un miARN maduro endógeno que

da como resultado un emparejamiento de bases entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno, formando de este modo un dúplete de ARN resistente a la escisión que no se escinde debido a la presencia de emparejamientos incorrectos entre las secuencias señuelo de miARN y el miARN maduro. Los emparejamientos incorrectos incluyen los emparejamientos incorrectos habituales (por ejemplo, G-A, C-U, C-A) así como el par oscilante G:U y los indeles (inserciones o deleciones de nucleótidos). En general, estas reglas definen (1) los emparejamientos incorrectos necesarios, y (2) los emparejamientos incorrectos que se permiten pero que no son necesarios.

Los emparejamientos incorrectos necesarios incluyen: (a) al menos 1 emparejamiento incorrecto entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 del miARN maduro endógeno, o como alternativa, (b) 1, 2, 3, 4, o 5 inserciones (es decir, nucleótidos adicionales) en una posición de la secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 9, 10, u 11 del miARN maduro endógeno. En realizaciones preferidas, existe bien (a) al menos 1 emparejamiento incorrecto entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones 10 y/u 11 del miARN maduro endógeno, o (b) al menos 1 inserción en una posición de la secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 10 y/u 11 del miARN maduro endógeno.

Los emparejamientos incorrectos que se permiten, pero que no son necesarios, incluyen: (a) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 del miARN maduro endógeno, y (b) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del miARN maduro endógeno (es decir, en la posición 21 de un miARN maduro de 21 nucleótidos), en el que cada uno de los emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del microARN maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario (es decir, de forma que no hay más de dos emparejamientos incorrectos contiguos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del microARN maduro endógeno). En realizaciones preferidas, no existen emparejamientos incorrectos (es decir, todos los pares de bases son complementarios) en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 del miARN maduro endógeno.

La secuencia señuelo de miARN consiste en 36 nucleótidos. Las realizaciones específicamente reivindicadas incluyen las secuencias señuelo de miARN de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, y 31 nucleótidos. En ejemplos no limitantes, una secuencia señuelo de miARN (para un miARN maduro de 21 nucleótidos) que tiene un emparejamiento incorrecto necesario que consiste en una inserción de 4 nucleótidos en la posición 10 del miARN maduro y un emparejamiento incorrecto permitido que consiste en la inserción de 1 nucleótido en la posición 20 del miARN maduro tiene un total de 26 nucleótidos; una secuencia señuelo de miARN (para un miARN maduro de 25 nucleótidos) que tiene un emparejamiento incorrecto necesario que consiste en una inserción de 5 nucleótidos en la posición 11 del miARN maduro y emparejamientos incorrectos permitidos que consisten en un emparejamiento incorrecto convencional en la posición 20 del miARN maduro y la inserción de 1 nucleótido en la posición 23 del miARN maduro tendrá un total de 31 nucleótidos.

De este modo, se describe una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo miARN que reconoce y se une a un miARN maduro endógeno pero que no se escinde (por ejemplo, que no se escinde mediante una proteína Argonauta o una proteína análoga a AGO), en la que el miARN endógeno es al menos un miARN seleccionado entre (a) miARN maduro seleccionado entre un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o (b) un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**; y la secuencia señuelo de miARN incluye una secuencia ARN de entre 19 y 36 nucleótidos contiguos de ARN, en la que la secuencia señuelo de miARN reconoce y se une al miARN maduro endógeno, dando como resultado el emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno, formando de esta manera un dúplete de ARN resistente a la escisión que incluye: (a) al menos un emparejamiento incorrecto entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 de dicho miARN maduro endógeno, o al menos una inserción en una posición de dicha secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 10-11 de dicho miARN maduro endógeno, (b) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 de dicho miARN maduro endógeno, y (c) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho miARN maduro endógeno, en el que cada uno de dichos emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho microARN maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario.

Las construcciones de ADN recombinante incluyen al menos una secuencia señuelo de miARN, y pueden incluir múltiples secuencias señuelo de miARN (bien múltiples copias de una sola secuencia señuelo de miARN, o copias de diferentes secuencias señuelo de miARN, o una combinación de ambos). En un ejemplo, múltiples copias de una secuencia señuelo de miARN se disponen en tándem en una construcción de ADN recombinante diseñada para disminuir la actividad del miARN maduro correspondiente. En otro ejemplo, la actividad de diferentes miARN maduros se disminuye mediante la expresión de una única construcción de ADN quimérico recombinante que se

transcribe a varias secuencias señuelo de miARN diferentes. La expresión de secuencias señuelo de miARN se puede impulsar mediante varios promotores, incluyendo, aunque no de forma limitativa, promotores específicos de tejidos, específicos de células, temporalmente específicos, inducibles, o constitutivos, por ejemplo, cualquiera de los promotores descritos en el encabezado "Promotores". Las secuencias señuelo de miARN se pueden situar en diferentes posiciones de un transcrito. En una construcción de ADN recombinante prevista para transcribirse también a una secuencia codificante, secuencia no codificante (por ejemplo, un miARN), o ambos, la secuencia señuelo de miARN se sitúa preferentemente en un intrón o después de la señal de poliadenilación, para permitir la transcripción normal de la secuencia codificante, secuencia no codificante, o ambos.

Como alternativa, se pueden usar secuencias señuelo análogas para regular la actividad de otros ARN pequeños implicados en la supresión génica mediada por el ARN bicatenario, incluyendo los ARN de interferencia pequeños de actuación en trans (ta-ARNip), transcritos de ARNip de sentido contrario naturales (nat-ARNip), y ARN pequeños en fase (como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2008/0066206). Estas secuencias señuelo análogas de ta-ARNip, secuencias señuelo nat-ARNip, y secuencias señuelo de ARN pequeño en fase se pueden predecir usando esencialmente las mismas reglas que las utilizadas para predecir las secuencias señuelo de miARN, y tienen utilidades similares a las de las secuencias señuelo de miARN.

La secuencia señuelo de miARN puede ser una secuencia de origen natural o una secuencia artificial. En una realización, la al menos una secuencia señuelo de miARN incluye una secuencia señuelo de miARN de origen natural, por ejemplo, una secuencia señuelo de miARN endógena identificada mediante bioinformática. En otra realización, la al menos una secuencia señuelo de miARN incluye una secuencia señuelo de miARN sintética, por ejemplo, una que se ha diseñado *ab initio* para unirse a un miARN maduro dado para formar un dúplete de ARN resistente a la escisión.

De este modo, una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo miRMON18 que reconoce y se une a un miRMON18 maduro endógeno pero que no se escinde (por ejemplo, que no se escinde mediante una proteína Argonauta o una proteína análoga a AGO), en la que el miRMON18 endógeno es al menos uno seleccionado entre (a) un miRMON18 maduro, o (b) un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miRMON18 vegetal; y la secuencia señuelo de miRMON18 incluye una secuencia ARN de entre aproximadamente 19 y aproximadamente 36 nucleótidos contiguos de ARN, en la que la secuencia señuelo de miRMON18 reconoce y se une al miRMON18 maduro endógeno, dando como resultado el emparejamiento de bases entre la secuencia señuelo de miRMON18 y el miRMON18 maduro endógeno, formando de esta manera un dúplete de ARN resistente a la escisión que incluye: (a) al menos 1 emparejamiento incorrecto entre la secuencia señuelo de miRMON18 y el miRMON18 maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 del miRMON18 maduro endógeno, o al menos una inserción en una posición de la secuencia señuelo de miRMON18 correspondiente a las posiciones 10-11 del miRMON18 maduro endógeno, (b) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miRMON18 y el miRMON18 maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 del miRMON18 maduro endógeno, y (c) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miRMON18 y el miRMON18 maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del miRMON18 maduro endógeno (es decir, en el que cada uno de los emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del miRMON18 maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario; y en la que la al menos una secuencia señuelo de miRMON18 reconoce y se une, pero no se escinde, mediante un miARN miRMON18 maduro. Se prefiere que el miRMON18 maduro tenga la secuencia de la **SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 874**, o sea un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763** y **SEQ ID NO. 3936**. Se describe además un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénico que tiene un rendimiento aumentado en al menos una deficiencia de nutrientes seleccionada entre la deficiencia de nitrógeno y la deficiencia de fosfato, que incluye la expresión en la planta de cultivo transgénico no natural de una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo de miRMON18.

Se describe además una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo miR399 que reconoce y se une a un miR399 maduro endógeno pero que no se escinde (por ejemplo, que no se escinde mediante una proteína Argonauta o una proteína análoga a AGO), en la que el miR399 endógeno es al menos uno seleccionado entre (a) un miR399 maduro, o (b) un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miR399 seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 8816 - 8819**; y la secuencia señuelo de miR399 incluye una secuencia ARN de entre 19 y 36 nucleótidos contiguos de ARN, en la que la secuencia señuelo de miR399 reconoce y se une al miR399 maduro endógeno, dando como resultado el emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miR399 y el miR399 maduro endógeno, formando de esta manera un dúplete de ARN resistente a la escisión que incluye: (a) al menos 1 emparejamiento incorrecto entre la secuencia señuelo de miR399 y el miR399 maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 del miR399 maduro endógeno, o al menos una inserción en una posición de la secuencia señuelo de miR399 correspondiente a las posiciones 10-11 del miR399 maduro endógeno, (b) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miR399 y el miR399 maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 del miR399 maduro endógeno, y (c) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miR399 y el miR399 maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del miR399 maduro endógeno (es decir, en el que cada uno de los emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del miR399 maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario; y en la que la al menos una secuencia

señuelo de miR399 reconoce y se une, pero no se escinde, mediante un miR399 maduro. Se prefiere que el miR399 maduro tenga la secuencia de la **SEQ ID NO. 8812 - 8815** o que sea un miR399 maduro derivado de una secuencia precursora de miR399 seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. Se describe además un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénico que tiene un rendimiento aumentado en al menos una deficiencia de nutrientes seleccionada entre la deficiencia de nitrógeno y la deficiencia de fosfato, que incluye la expresión en la planta de cultivo transgénico no natural de una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo de miR399.

Otra realización más de la presente invención es la supresión de una secuencia señuelo de miARN endógena, por ejemplo, mediante un elemento de supresión génica (como el descrito bajo el encabezado "Elemento de ADN para suprimir la expresión"), especialmente impulsada por un promotor específico de una célula o tejido o un promotor inducible.

Cualquier de estas construcciones de ADN recombinante descritas en el presente documento se puede preparar por técnicas normalmente utilizadas, tales como aquellas descritas en el encabezado "Elaboración y uso de construcciones de ADN recombinante" e ilustradas en los ejemplos de trabajo. Las construcciones de ADN recombinante son particularmente útiles para preparar células de plantas transgénicas no naturales, plantas transgénicas no naturales, y semillas transgénicas como se describe a continuación en "Células de planta transgénicas y plantas transgénicas".

Las construcción de ADN recombinante que incluyen una secuencia señuelo de miARN son útiles para proporcionar patrones de expresión únicos de un miARN sintético que se diseña mediante ingeniería genética para suprimir un gen endógeno; esto es especialmente deseable para prevenir fenotipos adversos causados mediante la expresión indeseable del miARN sintético en algunos tejidos. Por ejemplo, el miARN sintético se puede usar para suprimir el gen endógeno solamente en tejidos específicos de una planta, por ejemplo, mediante la expresión en la planta de una construcción de ADN recombinante que incluye (a) un promotor constitutivo que impulsa la expresión del miARN sintético, y (b) un promotor específico de tejido que impulsa la expresión de una secuencia señuelo de miARN diseñada para secuestrar el miARN sintético.

Se describen además procedimientos útiles para proporcionar plantas de cultivo mejoradas. Esto incluye un procedimiento para proporcionar una plantas de cultivo transgénica no natural que tiene al menos un rasgo alterado que incluye la expresión, en la plantas de cultivo transgénica no natural, una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo de miARN que reconoce y se une a un miARN maduro endógeno pero que no se escinde (por ejemplo, que no se escinde mediante una proteína Argonauta o una proteína análoga a AGO), en el que el miARN endógeno es al menos un miARN seleccionado entre (a) miARN maduro seleccionado entre un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o (b) un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**; y la secuencia señuelo de miARN incluye una secuencia ARN de entre 19 y 36 nucleótidos contiguos de ARN, en la que la secuencia señuelo de miARN reconoce y se une al miARN maduro endógeno, dando como resultado el emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno, formando de esta manera un duplete de ARN resistente a la escisión que incluye: (a) al menos un emparejamiento incorrecto entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 de dicho miARN maduro endógeno, o al menos una inserción en una posición de dicha secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 10-11 de dicho miARN maduro endógeno, (b) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 de dicho miARN maduro endógeno, y (c) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho miARN maduro endógeno, en el que cada uno de dichos emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho microARN maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario, dando como resultado por tanto la mencionada planta de cultivo transgénico no natural que presenta al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta de cultivo que no expresa la construcción de ADN recombinante, seleccionado entre el grupo de rasgos que consiste en:

- (i) tolerancia al estrés abiótico mejorada;
- (ii) tolerancia al estrés biótico mejorada;
- (iii) resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta;
- (iv) composición de metabolitos primarios modificada;
- (v) composición de metabolitos secundarios modificada;
- ((iv) elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas;
- (vii) rendimiento mejorado;
- (viii) capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes;
- (ix) características agronómicas modificadas;
- (x) características de crecimiento o reproductivas modificadas; y
- (xi) cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

Se describe además un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénica no natural que tiene al menos un rasgo alterado que incluye suprimir en la planta de cultivo transgénica no natural al menos una secuencia señuelo de miARN endógeno que reconoce y se une a un miARN maduro endógeno pero que no se escinde (por ejemplo, que no se escinde mediante una proteína Argonauta o una proteína análoga a AGO), en el que el miARN endógeno es al menos un miARN seleccionado entre (a) miARN maduro seleccionado entre un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850**, o (b) un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561 - 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**; y la secuencia señuelo de miARN incluye una secuencia ARN de entre 19 y 36 nucleótidos contiguos de ARN, en la que la secuencia señuelo de miARN reconoce y se une al miARN maduro endógeno, dando como resultado el emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno, formando de esta manera un duplete de ARN resistente a la escisión que incluye: (a) al menos un emparejamiento incorrecto entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 de dicho miARN maduro endógeno, o al menos una inserción en una posición de dicha secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 10-11 de dicho miARN maduro endógeno, (b) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 de dicho miARN maduro endógeno, y (c) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho miARN maduro endógeno, en el que cada uno de dichos emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho microARN maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario; dando como resultado por tanto la mencionada planta de cultivo transgénico no natural que presenta al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta de cultivo que no expresa la construcción de ADN recombinante, seleccionado entre el grupo de rasgos que consiste en:

- (i) tolerancia al estrés abiótico mejorada;
- (ii) tolerancia al estrés biótico mejorada;
- (iii) resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta;
- (iv) composición de metabolitos primarios modificada;
- (v) composición de metabolitos secundarios modificada;
- ((iv) elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas;
- (vii) rendimiento mejorado;
- (viii) capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes;
- (ix) características agronómicas modificadas;
- (x) características de crecimiento o reproductivas modificadas; y
- (xi) cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

La supresión de la al menos una secuencia señuelo de miARN endógeno se consigue por cualquier medio, incluyendo la expresión en la planta de cultivo transgénica no natural de un elemento de supresión génica (por ejemplo, tales como los elementos de ADN para suprimir la expresión descritos en el encabezado "Supresión de un miARN endógeno o natural"), o mediante cualquier otro medio de supresión génica.

En un ejemplo no limitante, una planta transgénica expresa en exceso, en condiciones de suficiencia de nutrientes, al menos una secuencia señuelo de miARN de un miARN que se expresa de forma natural en niveles elevados en condiciones de suficiencia de nutrientes y a bajos niveles en condiciones de deficiencia de nutrientes, dando como resultado de esta forma una comportamiento o rendimiento mejorado bajo deficiencia de nutrientes y una mejora en la utilización de los nutrientes por la planta. Por ejemplo, miRMON18 y miR399 se expresan en bajos niveles en condiciones de deficiencia de nitrógeno o fósforo, y a niveles elevados en condiciones de nitrógeno y fósforo suficientes, y de esta forma, sus genes diana naturales quedan suprimidos durante las condiciones de deficiencia de nitrógeno o fósforo y se expresan en niveles relativamente elevados en condiciones de suficiencia de nitrógeno y fósforo; esto da como resultado una mejora en la utilización del de nitrógeno y/o fósforo por la planta transgénica. De este modo, una planta transgénica que expresa en exceso una construcción de ADN recombinante que incluye al menos una secuencia señuelo de miRMON18 (o al menos una secuencia señuelo de miR399) da como resultado un mayor nivel de expresión de los genes diana miRMON18 naturales (o de los genes diana miR399 naturales) en condiciones de suficiente nitrógeno y fósforo, con respecto a una planta en la que no se expresa la construcción de ADN recombinante. En un ejemplo no limitante, se espera que una planta transgénica que exprese en exceso una construcción de ADN recombinante que incluye al menos una secuencia señuelo de miRMON18 acumule niveles relativamente elevados de las dianas de miRMON18 naturales (por ejemplo, genes que contienen un dominio SPX, tales como los genes representados gráficamente en la **Figura 12**, tal como se describe en los **Ejemplos 7, 9, y 10**).

La presente invención se explica de forma adicional en los siguientes Ejemplos. Los ejemplos no abarcados por el alcance de las reclamaciones se han incluido con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe realizaciones no limitantes de los procedimientos para identificar microARN de plantas de cultivo (arroz y maíz) y sus estructuras precursoras (replegadas), útiles en la preparación de construcciones de ADN recombinante de la presente invención. Varias bibliotecas de ARN pequeño (19 a 25 nucleótidos) se clonaron a partir de grano maduro y plántones de arroz maduro (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) (3 réplicas), a partir de hojas y semillas de maíz (maíz, *Zea mays*) (39 días después de la polinización) mediante secuenciación de alto rendimiento (Margulies y col. (2005) *Nature*, 437:376-380). Las secuencias obtenidas de esta manera se utilizaron para la predicción del miARN en secuencias genómicas de arroz y secuencias genómicas de maíz, respectivamente, empleando un conjunto de reglas derivado de miARN caracterizados anteriormente, seguido por inspección manual para eliminar estructuras replegadas mal previstas. El ARN pequeño que se emparejó perfectamente con el ARNt anotado, ARNr, transposón/retrotransposón y otras repeticiones conocidas, y los genomas de cloroplastos o mitocondrias se excluyeron del análisis.

Se usó la versión 4.0 de la anotación del genoma del arroz del Institute for Genomic Research (públicamente disponible en www.tigr.org) para predecir dos segmentos genómicos flanqueantes de ~310 nucleótidos en los que un ARN pequeño dado se localizó cerca del extremo izquierdo o derecho del segmento (proporcionando de esta manera bien una secuencia que consiste en 280 nucleótidos más el ARN pequeño más 10 nucleótidos, o bien una secuencia que consiste en 10 nucleótidos más el ARN pequeño más 280 nucleótidos. La estructura replegada de cada segmento obtenido de cada manera se predijo utilizando el programa RNAfold en el paquete Vienna como se describe en Hofacker y col. (1994) *Monatsh. f. Chemie*, 125:167-188. Para facilitar la predicción de la estructura, a cada ARN pequeño se le asignó una pseudoabundancia de 2.

Las estructuras se filtraron basándose en las características de los miARN precursores validados modificados a partir de los derivados por Jones-Rhoades y col. (2006) *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 57:19-53. Para los miARN de arroz, los requisitos de filtración incluyeron: (1) el ARN pequeño debe localizarse completamente en un brazo de la estructura replegada prevista (tallo-bucle); (2) el ARN pequeño y su segmento homólogo en el brazo opuesto deben tener secuencias de nucleótidos de al menos un 75% de complementariedad entre sí, y (3) el ARN pequeño y su homólogo, cuando forman el dúplete imperfecto, no deben contener una protuberancia simétrica mayor de 3 nucleótidos o una protuberancia asimétrica mayor de 2 nucleótidos. Las estructuras previstas que satisfacen los anteriores criterios se filtraron además seleccionando (1) solo los ARN pequeños de 20 o 21 nucleótidos de longitud y que tienen un uracilo como la base del extremo 5'; o (2) los ARN pequeños que se secuenciaron al menos 10 veces. Las etapas de filtrado finales incluyeron: (1) seleccionar ARN pequeños con menos de 23 emparejamientos perfectos en el genoma para eliminar los elementos repetitivos, y (2) el segmento utilizado para la predicción podría no incluir los ARN pequeños de la hebra negativa. En los casos donde se identificaron múltiples solapamientos de ARN pequeño, se seleccionó el miembro más abundante del clúster como la secuencia representativa.

En el caso de la predicción del miARN de maíz, se modificaron los procedimientos de predicción/filtración a partir de los utilizados para miARN de arroz, ya que aún no se encuentra disponible un genoma completo de maíz. Se analizaron los ARN pequeños procedentes de las bibliotecas de hojas y semillas de maíz de manera independiente para facilitar el uso de las abundancias de los ARN pequeños para la predicción del miARN. Se cartografiaron los ARN pequeños con Maize Assembled Gene Islands (MAGI versión 4), un conjunto de datos de secuencias genómicas de maíz ensambladas públicamente disponible como se describe en Fu y col. (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:12282-12287. Se excluyeron las secuencias de ARN pequeños que surgen de las hebras más y menos. Se predijeron las estructuras replegadas de microARN y se filtraron utilizando los mismos requisitos que para el arroz, y se inspeccionaron además manualmente para eliminar estructuras con regiones de bucle grandes (>100 nucleótidos) o muy desemparejadas. Los miARN caracterizados anteriormente excluidos por filtros se utilizaron como indicador de falsos negativos.

Un total de 260676 ARN pequeños únicos de arroz en el intervalo de tamaños de 19-25 nucleótidos se analizaron para los presuntos miARN novedosos. Tras filtrado e inspección manual, se identificaron 840 ARN pequeños correspondientes a 1072 loci, como miARN de arroz novedosos. De las 27 familias de miARN conocidas presentes en la base de datos de miARN "miRBase" (disponible en microrna.sanger.ac.uk/sequences/) y en la secuencia única original se capturaron un conjunto de 22 familias tras el filtrado. Se estimó una tasa de falsos negativos del 18,5 por ciento basándose en los miARN caracterizados (miRBase), lo que indica que la mayoría de miARN se capturaron con esta solución. De un total de 126691 ARN pequeños de semillas de maíz, se identificaron 116 miARN de maíz novedosos correspondientes a 281 loci de secuencias genómicas de maíz en la versión 4.0 de MAGI; de manera similar, de un total de 53103 ARN pequeños de hoja de maíz, se identificaron 79 miARN novedosos de maíz correspondientes a 302 loci. Los miARN de arroz y maíz y sus correspondientes secuencias precursoras de miARN, así como la posición de los nucleótidos del miARN maduro en cada secuencia precursora de miARN, se denominan por su número de identificación de secuencia respectivo en la Tabla 1 como sigue: miARN de semillas de maíz (**SEQ ID NOS. 1-116**), miARN de hojas de maíz (**SEQ ID NOS. 117 -195**), miARN de arroz (**SEQ ID NOS. 196 -1035**), secuencias precursoras de miARN de semillas de maíz (**SEQ ID NOS. 1036 -1316**), secuencias precursoras de miARN de hojas de maíz (**SEQ ID NOS. 1317 -1618**), y secuencias precursoras de miARN de arroz (**SEQ ID NOS. 1619 - 2690**). El total de 174 miARN novedosos predichos de los miARN del maíz (que representan 528 loci

genómicos) incluyeron 9 ortólogos de miARN que eran idénticos a los miARN conocidos anteriormente identificados en especies diferentes al maíz; estos se relacionan en la **tabla 1**.

Tabla 1: miARN y miARN precursores de maíz y arroz

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
1	1067	11	31	15	1308	11	31
1	1236	166	186	16	1129	128	146
1	1269	166	186	16	1199	11	29
2	1251	172	192	17	1040	45	68
3	1115	167	187	17	1246	11	34
4	1240	11	31	17	1247	45	68
5	1262	100	120	18	1131	104	127
6	1074	11	31	19	1119	142	162
6	1229	11	31	19	1166	11	31
6	1234	11	31	19	1169	143	163
6	1235	76	96	19	1172	69	89
6	1274	11	31	19	1175	11	31
6	1275	11	31	19	1177	143	163
6	1276	11	31	19	1180	11	31
6	1277	11	31	19	1186	11	31
6	1278	11	31	20	1087	230	251
6	1279	76	96	20	1258	11	32
6	1280	76	96	21	1046	11	31
6	1281	11	31	21	1157	63	83
6	1282	11	31	21	1216	73	93
6	1283	11	31	22	1254	102	122
6	1284	11	31	23	1261	11	30
6	1285	76	96	24	1125	70	90
6	1286	11	31	24	1314	11	31
6	1287	11	31	24	1315	11	31
6	1288	11	31	25	1161	11	31
6	1289	11	31	26	1124	11	31
7	1205	70	90	27	1198	77	96
7	1221	116	136	28	1309	74	94
8	1041	11	31	29	1114	11	29
8	1196	78	98	29	1232	11	29
9	1110	92	113	30	1192	70	91
9	1182	79	100	31	1077	72	92
9	1255	11	32	32	1136	88	108

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
10	1106	64	84	33	1054	38	58
11	1194	64	84	34	1053	11	31
12	1048	74	94	34	1096	11	31
12	1257	11	31	34	1292	84	104
12	1266	74	94	34	1307	84	104
12	1267	74	94	34	1313	85	105
13	1059	72	92	35	1063	11	31
13	1068	11	31	35	1214	11	31
13	1237	11	31	36	1156	11	31
14	1226	11	31	37	1055	11	30
14	1249	69	89	38	1291	83	103
15	1066	11	31	39	1116	11	31
15	1233	11	31	39	1138	11	31
15	1256	11	31	40	1201	82	102
15	1260	11	31	41	1065	65	85
15	1265	115	135	41	1070	11	31
41	1088	65	85	63	1295	151	171
41	1113	11	31	63	1296	151	171
41	1154	11	31	63	1297	151	171
41	1163	11	31	63	1298	151	171
41	1173	63	83	63	1299	11	31
42	1310	11	31	63	1300	11	31
43	1122	105	125	63	1301	151	171
44	1159	86	106	63	1302	11	31
45	1081	11	31	63	1303	11	31
46	1104	11	31	63	1304	152	172
47	1108	11	31	63	1305	11	31
48	1057	11	31	64	1038	101	120
48	1162	185	205	64	1084	11	30
49	1112	127	147	64	1127	11	30
49	1130	11	31	64	1133	11	30
49	1144	11	31	64	1147	101	120
49	1145	11	31	64	1160	11	30
49	1168	11	31	64	1170	183	202
49	1195	115	135	64	1171	11	30
49	1211	122	142	64	1185	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
49	1215	11	31	64	1190	11	30
49	1217	127	147	64	1193	11	30
49	1219	11	31	64	1206	11	30
50	1056	11	30	64	1208	11	30
51	1036	60	80	64	1244	11	30
51	1089	11	31	64	1245	11	30
52	1143	64	84	64	1253	11	30
53	1060	36	56	64	1259	11	30
54	1058	206	226	64	1268	183	202
54	1064	199	219	65	1098	241	261
54	1128	199	219	65	1189	241	261
54	1224	197	217	66	1045	11	31
54	1242	200	220	66	1252	133	153
54	1272	11	31	67	1094	71	91
54	1312	11	31	68	1152	11	31
55	1141	70	90	68	1158	11	31
56	1061	11	30	68	1203	11	31
57	1183	114	134	69	1097	43	63
58	1140	132	152	70	1103	11	31
59	1126	11	31	71	1239	41	61
60	1181	11	31	72	1044	11	31
61	1204	47	67	73	1271	44	64
62	1037	89	109	74	1042	76	96
62	1071	11	31	75	1230	11	31
62	1146	11	31	76	1149	11	31
62	1148	11	31	77	1218	11	30
62	1270	11	31	78	1073	141	161
63	1227	11	31	79	1047	11	31
63	1231	11	31	80	1293	82	101
63	1243	11	31	81	1080	11	31
82	1316	11	31	105	1212	11	31
83	1118	11	31	105	1225	11	31
84	1050	11	31	106	1306	11	31
85	1072	115	135	107	1062	11	30
86	1085	31	51	107	1075	11	30
86	1241	31	51	107	1091	75	94

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
87	1187	11	31	107	1121	11	30
87	1197	11	31	107	1134	11	30
87	1207	39	59	107	1142	11	30
87	1213	38	58	107	1176	75	94
88	1117	91	111	107	1191	76	95
89	1101	47	67	107	1200	76	95
90	1174	155	174	107	1248	73	92
91	1209	149	169	107	1263	76	95
91	1273	149	169	108	1078	11	31
92	1039	11	31	109	1135	75	95
92	1228	55	75	110	1153	11	31
92	1238	55	75	111	1150	110	130
92	1250	55	75	112	1123	11	30
93	1099	11	30	113	1202	73	93
94	1132	145	165	114	1223	144	164
94	1139	140	160	115	1069	11	31
94	1167	11	31	115	1079	11	31
95	1052	11	31	115	1092	11	31
96	1049	11	30	115	1290	11	31
96	1105	11	30	116	1090	11	31
97	1051	66	85	116	1095	182	202
97	1100	136	155	116	1107	11	31
98	1164	11	31	116	1155	193	213
99	1086	73	93	116	1188	198	218
99	1093	11	31	116	1264	199	219
99	1294	70	90	117	1366	11	31
100	1109	83	103	117	1538	166	186
100	1111	11	31	117	1578	166	186
100	1137	11	31	118	1557	172	192
100	1151	11	31	119	1397	167	187
100	1179	36	56	120	1449	213	233
100	1184	11	31	120	1540	11	31
100	1210	11	31	121	1572	100	120
100	1222	72	92	122	1507	189	208
101	1043	35	55	123	1369	11	31
102	1311	67	87	123	1534	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
103	1082	11	31	123	1536	11	31
103	1120	11	31	123	1537	76	96
103	1165	147	167	123	1583	11	31
103	1178	147	167	123	1584	11	31
103	1220	11	31	123	1585	11	31
104	1076	131	151	123	1586	11	31
104	1083	131	151	123	1587	11	31
105	1102	11	31	123	1588	11	31
123	1589	76	96	146	1479	70	91
123	1590	76	96	147	1320	11	31
123	1591	11	31	147	1380	11	31
123	1592	11	31	147	1381	11	31
123	1593	11	31	147	1382	11	31
123	1594	11	31	147	1383	11	31
123	1595	76	96	147	1384	11	31
123	1596	11	31	147	1385	11	31
123	1597	11	31	147	1409	97	117
123	1598	11	31	147	1411	100	120
123	1599	11	31	147	1417	102	122
124	1505	70	90	147	1422	11	31
124	1522	116	136	147	1456	11	31
125	1324	11	31	147	1483	11	31
125	1484	78	98	147	1493	100	120
126	1466	79	100	147	1502	11	31
126	1560	11	32	147	1517	100	120
127	1389	64	84	147	1545	11	31
127	1401	11	31	147	1550	11	31
128	1482	64	84	147	1561	11	31
129	1337	74	94	147	1564	11	31
129	1565	11	31	147	1566	11	31
129	1576	74	94	147	1569	11	31
129	1577	74	94	148	1372	72	92
130	1559	11	31	149	1424	74	95
131	1532	11	31	149	1616	11	32
131	1554	69	89	150	1457	152	175
132	1365	11	31	150	1513	152	175

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
132	1535	11	31	150	1515	152	175
132	1562	11	31	151	1398	11	31
132	1568	11	31	151	1442	11	31
132	1575	115	135	151	1469	11	31
132	1612	11	31	151	1506	11	31
133	1451	156	176	151	1520	191	211
133	1519	107	127	151	1551	190	210
134	1413	128	146	151	1581	192	212
134	1500	11	29	152	1504	99	119
135	1406	232	252	153	1503	82	102
136	1489	80	102	154	1410	38	58
137	1543	11	31	155	1487	200	220
138	1558	102	122	156	1386	11	31
139	1549	56	75	156	1396	43	63
140	1571	11	30	156	1546	11	31
141	1462	11	31	156	1563	11	31
142	1514	11	31	156	1601	11	31
143	1613	74	94	157	1360	91	110
144	1611	68	88	157	1400	95	114
145	1418	11	31	157	1415	95	114
145	1459	11	31	157	1425	11	30
145	1460	11	31	157	1426	92	111
157	1453	11	30	172	1448	67	87
157	1474	127	146	172	1458	68	88
157	1480	56	75	172	1477	68	88
157	1527	91	110	173	1582	36	56
157	1552	11	30	174	1322	136	156
157	1570	57	76	174	1330	9	29
157	1618	58	77	174	1349	11	31
158	1394	11	31	174	1355	136	156
159	1421	11	30	174	1399	137	157
159	1450	207	226	174	1491	136	156
159	1495	11	30	174	1508	136	156
160	1423	202	222	174	1509	11	31
160	1529	11	31	175	1615	11	31
160	1533	199	219	176	1392	117	136

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
161	1447	11	31	176	1438	43	62
161	1555	11	31	176	1464	11	30
162	1336	11	30	176	1490	11	30
162	1579	11	30	176	1492	43	62
163	1454	133	153	176	1498	11	30
164	1553	11	31	176	1499	43	62
165	1343	11	31	176	1510	11	30
165	1353	11	31	177	1371	11	31
165	1468	168	188	178	1358	75	95
165	1475	113	133	178	1364	59	79
165	1512	113	133	178	1390	11	31
165	1547	107	127	178	1393	75	95
166	1432	128	148	178	1395	11	31
166	1548	128	148	178	1408	71	91
167	1350	11	30	178	1428	57	77
168	1405	72	91	178	1434	11	31
169	1429	38	58	178	1436	75	95
170	1376	198	218	178	1443	75	95
170	1416	11	31	178	1455	56	76
170	1440	11	31	178	1461	75	95
170	1465	199	219	178	1463	75	95
170	1614	11	31	178	1467	75	95
171	1420	138	158	178	1470	75	95
172	1317	67	87	178	1476	11	31
172	1326	67	87	178	1485	11	31
172	1333	67	87	178	1488	11	31
172	1338	67	87	178	1496	11	31
172	1339	68	88	178	1516	11	31
172	1340	67	87	178	1518	11	31
172	1341	67	87	178	1523	75	95
172	1344	67	87	178	1525	75	95
172	1346	68	88	178	1528	11	31
172	1348	67	87	178	1531	10	30
172	1352	67	87	178	1542	11	31
172	1431	68	88	178	1544	11	31
172	1437	67	87	178	1556	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
178	1567	11	31	191	1328	11	31
178	1573	11	31	191	1331	72	92
178	1574	75	95	191	1332	72	92
179	1435	55	75	191	1335	72	92
180	1402	113	133	191	1351	11	31
180	1441	11	31	191	1357	11	31
180	1521	103	123	191	1359	75	95
180	1617	105	125	191	1361	72	92
181	1329	33	53	191	1362	11	31
182	1334	11	31	191	1363	72	92
182	1345	211	231	191	1368	11	31
182	1347	11	31	191	1370	72	92
183	1452	36	56	191	1373	72	92
184	1407	144	164	191	1374	72	92
185	1404	11	31	191	1375	11	31
185	1412	11	31	191	1377	11	31
185	1419	11	31	191	1378	72	92
185	1481	11	31	191	1379	72	92
185	1494	11	31	192	1356	11	31
185	1524	11	31	193	1323	77	97
185	1526	11	31	193	1354	11	31
186	1478	11	31	193	1387	11	31
186	1511	11	31	193	1388	11	31
186	1539	11	31	193	1433	112	132
187	1430	112	132	193	1444	11	31
187	1439	241	261	193	1445	11	31
188	1342	11	31	193	1446	11	31
188	1541	11	31	193	1473	77	97
189	1367	11	31	193	1486	11	31
189	1391	63	83	193	1501	11	31
189	1414	11	31	193	1580	75	95
189	1427	11	31	194	1472	33	53
189	1530	11	31	195	1600	63	83
189	1602	11	31	196	1663	281	299
189	1603	11	31	197	2542	11	31
189	1604	11	31	198	2532	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
189	1605	10	30	199	1977	66	86
189	1606	11	31	200	1946	11	30
189	1607	11	31	201	2365	11	31
189	1608	11	31	202	1735	34	53
189	1609	11	31	203	2046	64	84
189	1610	11	31	204	1746	281	301
190	1403	11	31	205	1778	11	31
190	1471	11	31	206	2189	45	64
190	1497	11	31	207	2549	11	31
191	1318	72	92	208	2597	11	31
191	1319	72	92	209	2519	195	214
191	1321	11	31	210	1829	257	277
191	1325	11	31	211	2291	241	260
191	1327	11	31	212	1938	11	30
212	1994	11	30	249	2682	11	30
213	2056	144	164	250	2005	73	93
213	2265	137	157	250	2092	73	93
214	1950	264	283	250	2406	52	72
214	2039	225	244	251	2202	11	29
214	2148	225	244	252	1919	239	258
214	2358	225	244	253	2409	248	271
214	2491	209	228	254	1926	11	31
215	2116	194	213	255	2445	247	267
216	2273	258	278	256	1804	11	31
217	1631	252	270	257	1774	149	168
218	1679	11	31	258	2394	11	31
219	2304	11	30	259	1697	87	107
220	2071	85	105	260	2268	37	55
221	1813	281	301	261	2063	281	304
222	2604	201	220	262	1686	11	31
223	2054	11	30	263	2184	11	31
224	2653	124	147	264	2158	48	67
225	1761	134	153	264	2399	217	236
226	2554	11	29	265	2353	11	34
227	1713	259	277	266	2524	11	31
228	2557	11	31	267	2183	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
229	1860	11	31	268	2140	146	169
229	1922	41	61	269	2038	11	31
230	2582	11	31	270	2257	54	74
231	2309	104	122	271	2389	112	131
232	1913	11	31	272	2522	256	275
233	1747	11	31	273	2422	37	56
234	1644	11	30	274	1969	11	29
235	2174	11	31	275	2481	228	248
236	2017	100	120	276	2080	92	112
236	2120	98	118	277	2261	59	78
237	2010	113	132	278	2368	166	188
238	2528	11	31	279	1627	11	30
239	2417	11	30	280	2006	11	31
240	1802	112	130	281	2431	11	30
240	2299	200	218	282	2200	228	248
240	2591	243	261	283	2081	38	58
240	2592	11	29	284	1902	11	31
241	1643	11	30	285	2343	11	31
241	2122	11	30	286	1887	233	253
241	2280	11	30	287	2393	139	159
242	2489	11	30	288	2262	47	67
243	2074	274	294	289	2137	71	91
244	1890	266	285	290	2684	11	31
245	2139	193	216	291	1771	30	49
246	1892	80	100	292	1807	238	256
247	1861	55	77	292	1954	11	29
248	2676	11	30	293	2103	11	30
249	2681	272	291	294	2656	11	31
295	2488	11	30	333	2636	11	31
296	1848	63	83	334	1951	11	31
297	2514	37	57	335	2510	36	55
298	1845	11	31	336	1700	11	31
299	2157	11	30	336	2622	11	31
300	2415	69	89	337	2446	242	262
301	2520	278	298	338	2082	11	32
302	2584	11	31	339	2301	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
303	2474	11	30	340	1721	11	30
304	2536	32	51	341	1876	11	31
305	1728	281	301	342	2659	11	30
306	2228	11	31	343	1937	11	31
306	2240	11	31	344	1864	11	30
307	2483	11	30	345	1869	128	148
308	1784	11	29	346	1692	11	30
309	1847	125	145	347	2276	277	297
310	1872	42	61	348	2141	11	29
311	1759	11	34	349	2023	11	31
311	1999	11	34	350	2219	11	31
311	2223	11	34	351	2472	176	196
311	2543	11	34	352	1724	11	31
312	2232	141	160	353	1955	11	30
313	1658	103	122	354	2426	11	31
313	2107	146	165	355	1978	57	76
314	2581	11	31	356	1881	60	80
315	2471	11	31	357	1974	163	182
316	2106	72	92	358	2466	11	30
317	2043	66	86	359	1633	44	63
318	1963	200	219	359	1797	102	121
319	2121	11	30	359	1889	11	30
319	2373	11	30	359	2128	281	300
319	2475	11	30	359	2129	11	30
319	2566	96	115	359	2254	11	30
320	1685	11	31	360	2241	115	135
321	2464	11	31	360	2363	114	134
322	1822	39	57	361	2117	39	58
323	1858	11	31	361	2513	11	30
324	2003	40	60	361	2530	39	58
325	2531	35	54	362	2533	51	69
326	1827	11	30	363	1707	89	109
327	2465	11	30	364	1801	41	61
328	1973	11	30	365	2428	41	61
329	2279	262	281	366	2221	31	50
330	1857	62	81	366	2439	280	299

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
331	2527	11	31	367	1852	29	48
332	1755	46	66	367	2252	30	49
333	1850	11	31	368	2069	11	30
333	2145	11	31	369	2462	11	30
333	2296	11	31	370	2031	11	30
333	2400	11	31	371	2197	36	56
372	2603	11	30	404	1948	47	67
373	2111	74	93	404	2380	47	67
374	1790	11	31	405	2470	11	30
375	1840	89	112	406	1680	11	31
375	2463	89	112	406	2355	11	31
375	2634	89	112	407	2251	64	83
375	2655	89	112	408	2499	71	90
376	1866	50	70	409	1911	11	34
376	2004	280	300	410	2162	11	30
377	1714	271	290	411	2360	11	31
377	2482	271	290	412	2073	11	30
378	2587	11	31	413	2231	35	55
379	1675	11	31	414	1637	11	30
379	2234	11	31	415	1673	11	30
380	2249	11	31	416	1819	11	29
381	1701	11	29	417	2529	49	68
382	2555	64	83	418	1785	277	296
383	2271	11	30	419	2379	45	65
384	1796	45	64	420	1958	248	268
385	2113	11	31	420	2123	248	268
385	2230	60	80	420	2218	247	267
385	2277	11	31	421	1874	71	91
385	2302	11	31	422	2352	11	30
385	2392	11	31	422	2635	11	30
385	2590	60	80	423	2297	245	265
386	1883	210	229	424	2680	280	298
387	2494	40	59	425	2552	252	272
388	1928	11	31	426	1893	11	34
388	2193	11	31	427	2068	183	203
388	2617	11	31	428	2225	165	184

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
389	2013	11	30	429	1738	11	31
390	1862	11	30	430	2640	11	31
391	1824	276	294	431	2083	11	30
391	1984	152	170	432	2233	221	241
391	1985	11	29	433	2097	102	121
392	1968	11	30	434	2623	11	29
392	2505	11	30	435	2272	11	34
393	1763	108	128	436	2246	11	30
394	1667	137	157	436	2449	11	30
395	1952	11	30	437	2217	11	31
395	1983	11	30	438	1638	11	29
396	1789	11	31	438	1639	273	291
397	1907	42	60	438	1695	11	29
398	2668	11	31	439	2227	124	144
399	2138	11	31	439	2660	118	138
400	2175	11	31	440	1688	90	110
401	2323	11	31	441	1622	120	140
402	2669	11	31	442	2388	34	54
403	1795	95	114	443	1708	240	258
403	2326	11	30	443	1709	11	29
443	2179	11	29	482	1703	147	167
443	2547	11	29	483	1775	148	168
444	1699	11	31	484	1839	11	30
444	2099	11	31	485	2119	56	76
445	2550	11	31	486	1906	152	170
445	2601	11	31	486	2143	11	29
446	2020	11	31	487	2633	76	96
447	1915	281	300	488	1734	132	150
447	1916	11	30	488	2045	133	151
448	1705	174	193	488	2506	129	147
448	2027	173	192	488	2672	134	152
449	1677	11	31	489	1772	58	78
450	1870	77	97	490	1687	11	34
451	1781	11	31	491	2649	76	96
452	2480	85	105	492	2436	73	93
452	2512	84	104	493	1798	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
453	2454	129	149	494	2335	11	30
454	1719	48	68	495	2568	11	31
454	2347	48	68	496	2627	80	100
455	2435	11	31	497	2461	11	31
456	1811	11	31	498	1745	141	161
456	2154	11	31	498	1949	11	31
457	1901	207	227	499	2130	30	50
458	1917	174	194	500	1660	11	30
459	2053	55	74	501	2002	11	30
460	2476	11	32	502	1882	11	31
461	2091	11	30	503	1956	11	34
462	1668	46	65	504	1694	11	30
462	2503	46	65	504	1903	11	30
463	2420	254	274	504	2395	11	30
464	2626	281	302	504	2515	11	30
465	2468	281	301	505	2151	279	300
466	1908	281	301	506	1787	11	31
467	2247	203	222	506	2126	89	109
467	2553	182	201	506	2127	11	31
468	2455	11	30	507	2317	135	154
469	1859	34	54	508	2180	11	31
469	2334	34	54	509	2346	11	31
470	1828	11	30	509	2645	11	31
471	2586	11	30	510	1936	11	30
472	2014	11	30	510	2516	11	30
473	1788	11	31	511	2245	11	30
474	2632	11	31	512	2354	137	157
475	2509	11	31	512	2478	141	161
476	2535	11	30	513	2411	47	67
477	2147	11	31	514	1716	35	55
478	1960	11	31	515	2283	11	31
479	1783	11	31	516	2095	11	31
480	2541	11	31	517	2432	11	31
481	2169	202	221	518	2608	165	185
519	2041	11	30	557	2589	251	271
520	2487	11	31	558	2236	82	102

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
521	1757	35	54	559	2629	11	30
522	1702	221	241	560	1832	177	197
523	1792	72	94	561	1737	11	31
523	2266	62	84	562	2523	11	31
524	2258	11	31	563	1625	11	31
525	2458	65	85	563	2327	281	301
526	1682	80	100	564	1930	55	74
526	1760	66	86	564	2560	55	74
526	2035	80	100	565	2325	40	60
526	2253	62	82	566	1725	115	135
527	1765	42	62	567	1684	11	31
528	2098	11	30	568	1729	272	290
529	1710	196	215	568	1766	205	223
530	2371	124	143	568	2108	119	137
531	1920	11	30	568	2307	262	280
532	2396	11	31	568	2367	11	29
533	2518	126	145	569	2644	54	73
534	1962	255	276	570	1947	11	31
535	2366	54	74	570	2185	11	31
536	2671	234	254	570	2384	11	31
537	2308	178	197	571	2594	78	97
538	1953	11	31	572	2062	11	31
539	1704	41	60	573	2290	232	250
540	1768	133	153	574	2314	11	31
540	1803	129	149	575	1793	11	31
540	2114	216	236	576	1645	59	79
541	2374	11	31	576	2239	280	300
542	2613	11	30	577	2293	111	130
543	1820	176	195	578	1629	11	30
544	1776	11	31	579	2643	11	31
545	1897	158	177	580	1970	11	30
546	2434	112	132	581	1929	11	33
546	2517	112	132	582	2538	11	30
547	2168	11	31	583	1786	102	122
547	2690	11	31	583	2639	50	70
548	1794	11	30	584	1986	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
549	2311	55	75	585	1698	53	72
550	1676	11	31	585	2391	54	73
551	2131	11	31	586	1894	11	30
552	1753	11	31	587	2559	213	231
553	1867	11	31	587	2576	11	29
554	2544	11	31	588	1619	36	56
555	2407	11	31	589	1868	11	30
556	2595	270	290	590	1621	281	299
557	1681	251	271	591	2067	245	265
557	2339	251	271	592	2457	11	31
557	2375	222	242	593	2163	11	31
557	2473	251	271	594	2207	11	30
595	2190	34	53	627	2303	11	31
596	2206	30	49	627	2593	11	31
597	2364	11	31	628	2646	125	145
598	2673	11	31	629	2378	40	60
599	1886	244	264	630	2451	53	72
600	1844	68	87	631	1885	133	151
601	2016	11	31	632	2153	245	264
601	2089	11	31	633	2689	11	31
601	2161	11	31	634	2133	11	31
601	2306	11	31	635	1657	11	30
601	2429	11	31	635	2040	80	99
602	2332	37	57	636	2419	126	145
603	2338	68	88	637	2024	247	265
604	2638	74	93	638	1770	11	31
605	2036	11	29	639	1626	73	93
606	2619	11	32	640	2220	95	115
607	2001	90	109	641	2430	11	31
608	1640	11	29	642	2181	11	31
608	2502	11	29	643	2447	11	31
609	1964	69	87	644	1647	127	150
610	2152	11	31	644	1995	183	206
611	1764	11	31	644	2546	184	207
612	2146	179	198	645	2324	11	31
613	1837	190	210	646	2101	222	241

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
614	2427	105	125	647	1931	11	31
615	2178	11	30	648	1863	35	54
616	1750	11	31	648	2115	279	298
616	1923	11	31	649	2630	11	31
616	2172	11	31	650	2609	84	103
616	2259	11	31	651	2165	39	58
616	2275	11	31	652	1980	38	58
616	2610	11	31	653	2390	274	294
617	2548	112	132	654	1918	105	125
618	2135	84	104	655	1779	11	31
619	2479	100	119	656	2424	110	129
620	2007	55	75	657	1944	33	52
620	2008	11	31	658	2049	165	184
621	1642	91	111	659	2282	67	87
621	1865	98	118	660	2194	11	30
621	2048	106	126	661	2000	281	300
622	1654	11	30	662	2061	275	295
623	2526	11	31	663	2562	11	31
624	2410	11	31	664	1988	11	30
625	2450	11	31	665	1722	281	300
626	2571	274	292	666	2285	11	31
627	1649	11	31	667	2318	11	34
627	1717	11	31	668	2421	11	31
627	1943	11	31	669	2021	236	256
627	2094	11	31	670	2212	146	166
627	2260	11	31	671	1623	47	65
672	2029	11	30	707	2340	11	31
673	1810	11	31	708	1830	11	31
674	1875	11	31	709	1921	11	31
675	2284	107	127	710	2093	33	52
675	2397	107	127	711	1665	191	210
676	2109	11	31	712	2651	11	31
677	2337	11	30	713	2534	79	100
678	1942	11	30	713	2662	79	100
679	2572	11	31	714	2144	11	35
680	2173	11	30	715	2064	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
681	1992	11	31	716	2545	86	105
682	1849	11	30	717	1636	11	31
683	2565	63	82	718	2248	11	30
684	2086	11	30	719	2320	11	30
685	2561	53	72	720	1739	99	119
685	2625	53	72	721	2286	11	31
686	1834	60	80	722	2321	11	31
687	2077	11	30	723	2216	36	55
688	2051	92	112	724	1814	82	105
688	2508	81	101	725	2288	11	30
689	2484	11	31	726	2256	245	263
690	1666	68	89	727	1905	11	31
691	2105	11	30	727	2440	11	31
691	2599	11	30	728	1998	71	91
692	1630	33	53	729	1624	54	74
693	1971	68	88	730	1940	11	31
694	2047	11	30	730	2328	111	131
695	1674	207	226	731	1662	11	29
695	1909	72	91	732	2118	11	30
695	2198	246	265	733	1809	60	79
695	2199	11	30	733	2037	183	202
695	2537	80	99	733	2150	73	92
696	2319	11	35	734	2596	11	31
697	2011	195	215	735	2414	11	31
698	1818	11	29	736	2192	11	31
698	1846	11	29	737	2196	11	30
698	2030	11	29	738	2521	39	59
698	2166	11	29	739	1678	11	31
698	2242	37	55	740	1791	152	172
698	2674	62	80	740	1853	158	178
698	2675	11	29	740	2134	155	175
699	2647	11	31	741	2058	129	149
700	2686	214	234	742	1635	194	214
701	2018	151	170	742	1914	11	31
701	2351	125	144	742	2362	11	31
702	2614	234	253	743	1653	220	238

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
703	1957	11	31	743	2104	281	299
704	1731	11	30	744	2300	11	31
705	2079	218	238	745	1648	82	102
706	2370	281	301	746	2423	11	30
746	2648	11	30	780	2149	11	30
747	2305	11	30	780	2331	11	30
748	1855	11	30	780	2477	11	30
748	1961	11	30	780	2511	11	30
749	1982	11	34	781	2563	164	184
749	2022	11	34	782	2208	149	168
749	2075	11	34	783	2186	275	294
749	2292	11	34	784	1823	11	32
750	2344	11	29	785	1879	11	31
751	2019	53	73	786	2666	11	31
752	1758	74	94	787	2490	279	298
753	1780	32	52	788	1752	11	31
754	2631	99	119	789	2052	89	109
755	2564	11	31	789	2628	89	109
756	2570	11	31	790	1733	62	82
757	2574	44	63	791	1777	11	31
758	1880	11	29	791	2412	11	31
759	1799	11	31	791	2658	11	31
760	2469	85	104	792	1898	281	301
761	2066	11	30	793	1815	138	157
762	1826	11	31	794	2456	181	201
763	2382	11	31	795	2112	159	178
764	2132	233	253	796	1740	116	136
764	2177	233	253	797	2359	11	32
765	2688	11	31	798	2441	11	31
766	1773	87	105	799	2585	11	31
767	2160	11	31	800	2665	11	31
768	1945	225	244	801	2313	237	256
769	2342	266	284	802	1941	11	30
770	1712	102	121	803	1646	130	150
771	2087	11	30	804	2349	11	31
771	2235	11	30	805	1720	147	167

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
771	2567	11	30	805	2191	147	167
772	2270	11	31	806	2100	11	30
772	2312	11	31	807	1659	269	289
772	2383	11	31	808	2229	269	289
772	2657	11	31	809	2443	281	300
773	2176	178	197	810	2600	114	134
774	1748	11	30	811	2215	216	236
774	1842	11	30	812	1693	11	30
775	1723	45	64	813	1749	72	92
775	2615	45	64	813	2156	72	92
776	2072	11	31	813	2278	72	92
777	1655	11	30	813	2416	72	92
778	1989	123	146	813	2551	116	136
779	2032	11	30	814	2195	11	31
779	2263	11	30	815	2281	271	291
779	2425	11	30	816	2264	11	30
779	2620	11	30	817	1711	11	30
780	1805	11	30	818	1981	11	31
819	1854	11	30	862	1727	44	64
820	2413	148	168	863	2205	200	220
821	2404	262	282	864	2164	53	71
822	2090	44	64	865	2498	11	30
822	2654	112	132	866	1769	42	62
823	2525	44	64	867	1726	31	50
824	2402	128	147	868	1652	11	29
824	2606	135	154	868	1730	156	174
825	2387	11	31	868	1884	11	29
826	1762	11	31	868	1967	11	29
827	1895	36	55	869	1821	279	299
828	2467	11	31	870	1620	11	31
829	2102	11	31	871	1767	281	300
830	2588	11	30	872	2155	11	31
831	1671	11	31	873	1800	39	57
832	1650	11	30	874	2501	11	31
833	1843	281	300	875	2211	226	246
834	1976	30	49	876	2009	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
834	2448	30	49	877	2110	11	31
835	2125	11	30	878	1991	11	30
836	2255	11	31	879	2044	11	29
837	2683	37	56	880	1833	11	31
838	2274	11	30	881	2124	173	193
839	1634	11	31	882	2408	11	31
840	2605	281	300	883	1751	122	142
841	2497	124	143	884	1744	11	31
842	2685	11	31	885	2289	190	209
843	2376	281	301	886	1825	11	31
844	1925	82	102	887	2171	11	30
845	2438	11	31	888	2345	11	31
846	2607	11	31	889	2034	50	69
847	2398	71	90	890	2059	11	31
848	2459	165	185	891	2026	194	212
849	2460	234	254	892	2573	11	32
850	1975	11	30	893	1689	11	30
851	2579	11	30	893	2201	11	30
852	2042	11	30	894	1904	56	76
852	2385	85	104	895	2209	11	30
853	1933	11	31	896	1736	11	30
854	2159	214	234	897	2295	100	120
854	2369	214	234	898	2330	11	31
855	2187	41	60	899	1664	281	300
855	2237	44	63	900	2641	54	74
856	2269	207	227	901	2678	11	31
857	2050	11	31	902	1932	11	31
858	1987	82	101	903	1841	11	31
859	1656	11	31	903	2583	11	31
860	2210	11	31	903	2661	11	31
861	1900	11	30	904	2348	70	90
861	1979	11	30	905	2650	11	31
906	2507	46	65	945	1782	11	30
907	1910	47	66	946	1669	11	31
907	2618	35	54	947	2403	36	55
908	2057	134	154	948	1927	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
909	2070	11	31	949	2287	11	31
909	2667	11	31	950	2356	11	31
910	2167	73	92	951	2015	131	151
911	2310	68	88	952	2616	11	29
912	2578	11	30	953	2486	64	83
913	1706	33	53	954	1899	255	275
914	1670	34	54	955	1742	132	151
915	1683	71	91	956	2493	11	30
916	1754	11	31	957	1715	11	31
916	2226	11	31	958	2492	11	31
917	2028	272	292	959	1997	11	31
918	2214	11	30	959	2213	11	31
919	1806	84	104	960	1966	75	95
920	2333	281	301	961	2012	11	31
921	2316	11	30	962	2224	11	31
922	2025	11	31	963	2188	176	195
922	2315	11	31	964	2598	58	78
922	2405	11	31	965	2418	11	30
922	2437	11	31	966	2444	11	30
923	2357	261	281	967	2372	11	31
924	2381	11	31	968	1888	11	31
925	1871	82	101	969	1651	11	31
926	2433	186	205	970	2652	11	30
927	2377	273	292	971	1965	275	295
928	1632	270	290	972	1743	11	31
929	2485	118	138	973	1877	11	33
930	2540	11	30	974	2386	274	293
930	2602	11	30	975	2580	11	31
930	2670	11	30	976	2637	281	300
931	1812	11	31	977	2577	39	59
932	2294	240	260	978	1836	128	148
933	2687	37	56	979	2452	11	30
934	2401	86	106	980	2076	76	96
935	2084	11	31	981	1838	281	301
936	1661	113	133	982	1690	11	31
936	1939	112	132	983	2222	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
936	2088	112	132	984	1935	11	31
936	2677	90	110	985	1816	11	30
937	2078	11	30	986	1628	11	30
938	1934	273	292	987	2504	11	31
939	1851	280	298	988	2350	234	253
940	1817	11	30	989	1831	11	30
941	1835	11	30	990	2065	11	30
942	2495	11	30	991	2142	11	31
943	2267	130	150	992	1896	11	31
944	2621	11	31	993	1672	11	34
994	2624	11	31	1015	2611	35	55
995	1959	97	117	1016	2033	91	111
996	2238	235	255	1017	2569	135	155
996	2612	271	291	1018	2361	11	31
997	1972	238	258	1019	1718	11	31
998	2204	11	31	1020	2558	80	100
999	2496	94	114	1021	2243	105	124
1000	2055	79	99	1022	2136	11	30
1001	1691	11	34	1023	1878	11	31
1002	2336	11	30	1024	2182	11	31
1003	2096	11	31	1025	1891	77	96
1003	2539	131	151	1026	1924	140	160
1004	2085	11	31	1027	2341	255	275
1005	2298	11	31	1028	2244	147	167
1006	1641	245	264	1028	2556	142	162
1006	1996	11	30	1028	2663	114	134
1006	2203	11	30	1029	1756	225	244
1007	2679	153	173	1029	2329	195	214
1008	1741	11	31	1030	1856	11	31
1008	2322	11	31	1031	1808	139	159
1009	2642	11	29	1032	1873	57	76
1010	2442	11	31	1033	1993	72	92
1011	2575	11	31	1034	1696	55	78
1012	2250	11	31	1035	1912	33	53
1013	1732	54	77	1035	1990	33	53
1013	2060	53	76	1035	2500	33	53

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
1013	2453	53	76	1035	2664	33	53
1014	2170	60	80				

Tabla 2: miARN de maíz

ID ARN	SEQ ID NO.	Homólogo*	Predicho en almendra de maíz	Predicho en hoja de maíz
15996	3	ptc-miR390c	y	y
19644	4	osa-miR396e	y	y
25372	7	ptc-miR172f	y	y
35979	9	ath-miR167d	y	y
36116	10	osa-miR528	y	y
56811	133	ptc-miR396e	n	y
59250	16	ptc-miR398c	y	y
432006	138	sbi-miR164c	y	y
1392730	32	ath-miR171a	y	n
*"ptc", <i>Populus trichocarpa</i> ; "osa", <i>Oryza sativa</i> ; "ath", <i>Arabidopsis thaliana</i> ; "sbi", <i>Sorghum bicolor</i>				

5 Ejemplo 2

Se predijeron los genes del arroz previstos para ser diana de los miARN de arroz novedosos a partir de la versión 4.0 de anotación del genoma de arroz del Institute for Genomic Research (públicamente disponibles en www.tigr.org), basándose en las reglas de complementariedad de secuencia, descritas en Zhang (2005) Nucleic Acids Res., 33:W701-704 y por Rhoades y col. (2002) Cell, 110:513-520. Estas dianas previstas eran secuencias que incluían al menos un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro seleccionado entre las **SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730 - 3921, SEQ ID NOS. 5498 - 6683, SEQ ID NOS. 8409 - 8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812 - 8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850** o por un miARN maduro derivado de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561- 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. La **Tabla 3** relaciona ejemplos no limitantes de sitios de reconocimiento del miARN (**SEQ ID NOS. 2691- 2729**) que son reconocidos por un miARN maduro de arroz (**SEQ ID NO. 197**).

Tabla 3

Os_miRNA_60735 secuencia de miARN UCCGUCCCAAAUUAUAGCCAC (SEQ ID NO. 197)						
Diana de arroz prevista		Sitio de reconocimiento de miARN				
Nombre y anotación del locus	Posición del nucleótido en el locus	secuencia de mARN correspondiente a ADNc	SEQ ID NO.	Puntuación	N.º de emparejamientos incorrectos	
LOC_Os01g65130.1 1197.m126 26 ADNc de la proteína expresada	1086 - 1106	guugcuauuuuuuggacgga	2691	1	1	
LOC_Os11 g37540.1 11981.m075 99 ADNc de Serina/treonina-proteína quinasa Doa, presunto, expresado	1925 - 1945	guugcuauuuuuuggacgga	2692	1	1	
LOC_Os08g36030.1 11978.m075 92 ADNc de la familia de proteínas de respuesta a virus vegetales expresado	1126 - 1146	auugcuauuuuuuggacgga	2693	1	2	
LOC_Os12g12470.2 11982.m268 68 ADNc de la oxidorreductasa P1 dependiente de NADP presunto, expresado	1095 - 1115	guuuuuuuuuuuuggacgga	2694	1,5	2	
LOC_Os09g20410.1 11979.m052 48 ADNc de la proteína hipotética	587 - 607	guugcuauuuuuuggacgga	2695	1,5	2	
LOC_Os06g12790.3 11976.m320 28 ADNc de la proteína ARAC10 de unión a GTP de tipo RAC, presunto, expresado	3792 - 3812	auuguuuuuuuuegacpga	2696	1,5	3	
LOC_Os11 g24540.1 11981y col. m063 80 ADNc de la familia de proteínas peptidasas de péptidos señal, expresado	2004 - 2024	auuguuuuuuuuuggacgga	2697	1,5	3	
LOC_Os02g38750.1 11972.m089 63 ADNc de la proteína hipotética	55-75	auguuuuuuuuuuggacgga	2698	1,5	3	
LOC_Os07g49480.2 11977.m290 28 ADNc de la proteína expresada	2531-2551	auuguuuuuuuuuggacgga	2699	1,5	3	
LOC_Os01g56640.1 11971.m97546 ADNc del factor de transcripción jumonji, presunto, expresado	660 - 680	auguuuuuuuuuuggacgga	2700	1,5	3	
LOC_Os06g12790.2 11976.m322 47 ADNc de la proteína ARAC10 de unión a GTP de tipo RAC, presunto, expresado	1947 - 1967	uuugcuauuuuuuggacgga	2701	1,5	3	
LOC_Os10g22560.1 11980.m052 63 ADNc de la familia de proteínas POT, expresado	1954 - 1974	uuugcuauuuuuuggacgiza	2702	1,5	3	
LOC_Os06g30280.1 11976.m075 72 ADNc de la proteína expresada	1895 - 1915	guugcuauuuuuuggacgga	2703	2	2	
LOC_Os03g14800.3 11973.m069 17 ADNc de la aminotransferasa, proteína de la familia de clases I y II, expresado	1826 - 1846	aaapcuauuuuuuggacgga	2704	2	3	

(continuación)

Os_miRNA_60735 secuencia de miARN UCCGUCCCAAAUAUAGCCAC (SEQ ID NO. 197)						
Diana de arroz prevista		Sitio de reconocimiento de miARN				
Nombre y anotación del locus	Posición del nucleótido en el locus	secuencia de mARN correspondiente a ADNc	SEQ ID NO.	Puntuación	N.º de emparejamientos incorrectos	
LOC_Os05g25430.1 11975.m068 36 ADNc de la familia de proteínas de la proteína quinasa, presunto, expresado	684 - 704	guuguuaauuuuugsgaugga	2705	2	3	
LOC_Os04g41229.2 11974.m789 64 ADNc de la proteína que contiene el dominio de unión al ADN de la hélice-bucle-hélice, expresado	175 - 195	guugcuauuuuugsgacgga	2706	2.5	2	
LOC_Os01g06740.1 11971.m073 04 ADNc de la proteína inactivante de ribosoma, expresado	1362 - 1382	gcaguuauuuuugsgacgga	2707	2.5	3	
LOC_Os03g14800.2 11973.m351 26 ADNc de la aminotransferasa, proteína de la familia de clases I y II, expresado	861-881	augcuuacuuuugsgacgga	2708	2.5	4	
LOC_Os09g36100.1 11979.m065 60 ADNc de la proteína expresada	1469 - 1489	acaguuauuuuugsgacgga	2709	2.5	4	
LOC_Os 10g40740.1 11980.m068 42 ADNc de la proteína que contiene el dominio de unión al ADN de la hélice-bucle-hélice, expresado	1049 - 1069	auacuuaauuuuugsgacgga	2710	2.5	4	
LOC_Os06g04970.1 11976.m052 26 ADNc de la proteína expresada	989-1009	auacuuaauuuuugsgacgga	2711	2.5	4	
LOC_Os 11 g43760.1 11981y col. m082 11 ADNc de la familia de proteínas de las lipasas	2628 - 2648	auacuuaauuuuugsgacgga	2712	2.5	4	
LOC_Os12g11660.1 11982.m051 45 ADNc de la proteína expresada	1479 - 1499	guugaauuuuugsgacgga	2713	3	3.	
LOC_Os01g64330.1 11971 .m425 82 ADNc de la proteína expresada	630 - 650	guuguuuuuuuugsgacgga	2714	3	3	
LOC_Os07g04840.2 11977.m290 60 ADNc del potenciador de la proteína 2 que evoluciona con oxígeno precursor del cloroplasto, presunto, expresado	574 - 594	guugcuauuuuugsgacgga	2715	3	3	
LOC_Os09g13440.2 11979.m220 62 ADNc de la proteína expresada	2068-2088	auugcuauuuuugsgaugga	2716	3	4	
LOC_Os06g12790.1 11976.m059 95 ADNc de la proteína ARAC10 de unión a GTP de tipo RAC, presunto, expresado	2271-2291	auugcuauuuuugsgaugga	2717	3	4	
LOC_Os09g17730.1 11979.m050 31 ADNc del interactor de la bomba de protones, presunto, expresado	958 - 978	uuuccuauuuuagsgacgga	2718	3	4	
LOC_Os11 g40390.1 11981y col. m078 85 ADNc de la proteína expresada	1302 - 1322	augcuuaauuuuugsgacgga	2719	3	4	

(continuación)

Os_miRNA_60735 secuencia de miARN UCCGUCCCAAAUAUAGCCAC (SEQ ID NO. 197)						
Diana de arroz prevista		Sitio de reconocimiento de miARN				
Nombre y anotación del locus	Posición del nucleótido en el locus	secuencia de mARN correspondiente a ADNc	SEQ ID NO.	Puntuación	N.º de emparejamientos incorrectos	
LOC_Os11g39670.1 11981y col. m078 14 ADNc de la familia de proteínas de la seril-ARNt sintetasa, expresado	924 - 944	auugcuauuuuuuagacgga	2720	3	4	
LOC_Cs07g04840.1 11977 m049 51 ADNc del potenciador de la proteína 2 que evoluciona con oxígeno precursor del cloroplasto, presunto, expresado	4246 - 4266	uuugcuuuuuuuuugggacgga	2721	3	4	
LOC_Os03g47960.1 11973 m098 09 ADN de la proteína que contiene el dominio HECT presunto, expresado	1125 - 1145	uuugcuauuuuuuagagacgga	2722	3	4	
LOC_Os01g60780.1 11971y col. m122 06 ADNc de la proteína de membrana integral, presunto, expresado	3110-3130	uugcuauuuuuuugggacgga	2723	3	4	
LOC_Os10g01820.1 11980.m217 47 ADNc de la proteína expresada	711-731	augcuuuuuuuuugagacgga	2724	3	4	
LOC_Os06g48030.3 11976.m321 66 ADNc del precursor de la peroxidasa 16, presunto, expresado	1475 - 1495	cuguuuuuuuuuuugggacgga	2725	3	4	
LOC_Os02g02980.1 11972.m056 48 ADNc de la enfermedad de susceptibilidad 5 potenciada, presunto, expresado	1357 - 1377	uuugcugaaauuuugggpccgga	2726	3	5	
LOC_Os08g32170.1 11978.m072 11 ADNc de la oxidoreductasa, familia de proteínas de la 20G-Fe oxigenasa, expresado	1297 - 1317	uuugcugaaauuuuagggcgga	2727	3	5	
LOC_Os11g39670.2 11981y col. m288 46 ADNc de la familia de proteínas de la seril-ARNt sintetasa, expresado	114 - 134	guggcuuuuuuuugggguggu	2728	3	5	
LOC_Os08g25010.111978.m065 20 ADNc de la proteína que contiene el dominio TBC, expresado	367 - 387	cugguuuuuuuuggg,2augga	2729	3	5	

Ejemplo 3

Este ejemplo describe realizaciones no limitantes de la construcción de ADN recombinante en la que al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana incluye un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN endógeno derivado de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036 - 2690, SEQ ID NOS. 3922 - 5497, SEQ ID NOS. 6684 - 8408, SEQ ID NOS. 8561- 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816 - 8819**. Más específicamente, este ejemplo ilustra los ejemplos no limitantes de elementos del ADN para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, un miARN endógeno o una secuencia señuelo de un miARN endógeno.

La **Figura 2A** representa gráficamente de manera esquemática los ejemplos no limitantes de elementos del ADN para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, un miARN endógeno. Estos elementos de ADN incluyen al menos un primer elemento de supresión del gen ("GSE" o "GSE1") para suprimir al menos un primer gen diana, en el que el primer elemento de supresión del gen está incluido en un intrón flanqueado en uno o ambos lados por un ADN que no codifica proteínas. Estos elementos de ADN utilizan un intrón (en muchas realizaciones, se prefiere un intrón derivado de una región 5' no traducida o un intrón potenciador de la expresión) para liberar un elemento de supresión del gen sin requerir la presencia de ningún exón de codificación de proteínas (secuencia de codificación). Estos elementos de ADN pueden incluir al menos un segundo elemento de supresión del gen ("GSE2") para suprimir al menos un segundo gen diana, al menos un elemento de expresión del gen ("GEE") para expresar al menos un gen de interés (que puede ser una secuencia codificante o no codificante o ambas), o ambos. En las realizaciones que contienen un elemento de expresión génica opcional, el elemento de expresión génica puede localizarse en el exterior (por ejemplo, adyacente a) del intrón. En algunas realizaciones, el intrón que contiene el primer elemento de supresión del gen se encuentra en 3' respecto a un terminador.

Para diferenciar más claramente los elementos de ADN de la invención (que contienen al menos un elemento de supresión del gen incluido en un único intrón flanqueado en uno o ambos lados por un ADN que no codifica proteínas) de los procedentes de la técnica anterior, la **Figura 2B** representa gráficamente de manera esquemática ejemplos de construcciones de ADN recombinante de la técnica anterior. Estas construcciones pueden contener un elemento de supresión del gen que se localiza adyacente a un intrón flanqueado por una secuencia de codificación de proteína, o entre dos intrones discretos (en los que no está incluido el elemento de supresión del gen en ninguno de los dos intrones discretos), o puede incluir un elemento de expresión génica que incluye un elemento de supresión del gen incluido en un intrón que está flanqueado por múltiples exones (por ejemplo, exones que incluyen la secuencia de codificación de una proteína).

La **Figura 3** representa gráficamente ejemplos no limitantes de elementos del ADN para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, un miARN endógeno, útiles en las construcciones de ADN recombinante de la invención. Cuando se dibujan como una única hebra (**Figuras 3A a 3E**) se representan gráficamente de forma convencional en la dirección 5' a 3' de la transcripción (izquierda a derecha); las flechas indican la secuencia de sentido contrario (punta de la flecha apuntando a la izquierda), o la secuencia de sentido directo (punta de la flecha apuntando a la derecha). Estos elementos de ADN pueden incluir: ADN que incluye al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del al menos un primer gen, o ADN que incluye múltiples copias de al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del al menos un primer gen diana (**Figura 3A**); ADN que incluye al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del al menos un primer gen diana, o ADN que incluye múltiples copias de al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del al menos un primer gen diana (**Figura 3B**); ADN que se transcribe a ARN para la supresión del al menos un primer gen diana formando un ARN bicatenario e incluye al menos un segmento de ADN de sentido contrario que es de sentido contrario para al menos un segmento del al menos un gen diana y al menos un segmento de ADN de sentido directo que tiene al menos un segmento del al menos un primer gen diana (**Figura 3C**); ADN que se transcribe a ARN para suprimir el al menos un primer gen diana formando un único ARN bicatenario e incluye múltiples segmentos de ADN de sentido contrario en serie que son de sentido contrario para al menos un segmento del al menos un primer gen diana y múltiples segmentos de ADN de sentido directo en serie que tienen al menos un segmento del al menos un primer gen diana (**Figura 3D**); ADN que se transcribe a ARN para suprimir el al menos un primer gen diana formando múltiples ARN bicatenarios e incluye múltiples segmentos de ADN de sentido contrario que son de sentido contrario para al menos un segmento del al menos un primer gen diana y múltiples segmentos de ADN de sentido directo que tienen al menos un segmento del al menos un primer gen diana, y en el que dichos múltiples segmentos de ADN de sentido contrario y los múltiples segmentos de ADN de sentido directo se disponen en una serie de repeticiones invertidas (**Figura 3E**); y ADN que incluye nucleótidos derivados de un miARN, o ADN que incluye nucleótidos de ARNip (**Figura 3F**).

La **Figura 3F** representa gráficamente diversas disposiciones no limitantes de ARN bicatenario que se puede transcribir a partir de realizaciones de elementos de ADN para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, un miARN endógeno, útiles en las construcciones de ADN recombinante de la invención. Cuando se forma dicho ARN bicatenario, puede suprimir uno o más genes diana, y puede formar un único ARN bicatenario o múltiples ARN bicatenarios o un "tallo" o múltiples "tallos" de un único ARN bicatenario. Cuando se forman múltiples "tallos" de un ARN bicatenario, se pueden disponer en disposiciones de "cabeza de martillo" u "hoja de trébol". En algunas realizaciones, los tallos bicatenarios pueden formar una disposición de "pseudonudo" (por ejemplo, donde el ARN

del separador o el bucle de un tallo bicatenario forma parte de un segundo tallo bicatenario); véanse, por ejemplo, las representaciones gráficas de arquitecturas de pseudonudos en Staple y Butcher (2005) PLoS Biol., 3(6):e213. El separador de ADN (localizado entre o adyacente a las regiones de ARNs) es opcional pero suele estar incluido y generalmente incluye ADN que no corresponde al gen diana (aunque en algunas realizaciones puede incluir ADN de sentido directo o de sentido contrario del gen diana). El separador de ADN puede incluir la secuencia que se transcribe a ARN monocatenario o al menos ARN parcialmente bicatenario (tal como en una disposición "tallo-bucle en contacto"), o a un ARN que asume una estructura secundaria o una configuración tridimensional (por ejemplo, un bucle grande de secuencia de sentido contrario del gen diana o un aptámero) que confiere al transcrito una característica deseada adicional, tal como una estabilidad aumentada, una semivida aumentada *in vivo*, o una especificidad celular o tisular.

Se puede encontrar una descripción adicional de elementos del ADN y procedimientos para suprimir la expresión de un gen diana, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0200878, que se ha incorporado por referencia al presente documento.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe realizaciones no limitantes de procedimientos para utilizar microARN, precursores de microARN, sitios de reconocimiento de microARN, y promotores de microARN para modular la expresión la expresión de al menos un gen diana.

Se desvelan diversas utilidades potenciales de un miARN o su sitio de reconocimiento mediante el patrón de expresión del miARN. Es útil el conocimiento de la distribución espacial o temporal o la inducibilidad de la expresión de un miARN maduro dado, por ejemplo, para diseñar construcciones recombinantes que se van a expresar de una manera específica espacial o temporal o induciblemente. Un procedimiento no limitante para determinar un patrón de expresión del miARN maduro es mediante aislamiento del miARN maduro (o su precursor) y analizar el patrón de expresión mediante transferencias Northern con una sonda adecuada (es decir, sondas específicas del miARN maduro o del miARN precursor).

La **Figura 4** representa gráficamente un ejemplo no limitante de los resultados de análisis de transferencia Northern para los miARN maduros aislados de diferentes tejidos de maíz. Una sonda se hibrida con los miARN maduros de dos familias (miR156 y miR157). Los miARN maduros individuales se expresaron a diferentes niveles en células o tejidos específicos, por ejemplo, Zm-miR390 no se expresó, o se expresó solo a niveles bajos, en la raíz y en la hoja adulta, y miR156 se expresó en raíces, hojas, y estambres. De este modo, por ejemplo, la construcción de ADN recombinante de la presente invención que incluye una unidad de transcripción del transgén impulsada por un promotor constitutivo y un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN miR390 maduro de maíz es útil para la expresión del transgén en tejidos de la raíz y en hojas adultas pero no en tejidos donde el miR390 maduro se expresa a niveles elevados. Para ilustrar adicionalmente el uso de las construcciones y los procedimientos de la invención para controlar la expresión de un transgén, se usó un gen indicador como el propio transgén, o como un derivado del transgén. Por ejemplo, cuando se desea la expresión de un gen indicador (por ejemplo, la proteína fluorescente verde, GFP) en tallo de maíz y en tejido de mazorca inmadura, se incluye un sitio miR156 diana en un casete de expresión de GFP y se expresa en una planta de maíz transgénico de forma estable bajo el control del promotor CaMV 35S. En tejidos (por ejemplo, raíces, hojas, y estambres) donde miR156 se expresa fuertemente, la expresión de GFP está suprimida. La supresión del fenotipo puede limitarse a tipos de células muy específicos en los tejidos suprimidos, mostrando las células adyacentes la expresión o un gradiente de expresión de GFP adyacente a aquellas células que expresan el miR156 maduro.

Otro procedimiento no limitante para determinar un patrón de expresión del miARN maduro es analizar los perfiles de transcripción de las secuencias de ácido nucleico que incluyen la secuencia del miARN maduro, por ejemplo, siguiendo un procedimiento general que incluye las etapas de:

- (a) proporcionar una secuencia de miR inicial que incluye la región del tallo-bucle, por ejemplo, a partir de las secuencias de miR públicamente disponibles en la base de datos "miRBase" (disponible en línea en microrna.sanger.ac.uk/sequences);
- (b) aplicar algoritmos de análisis de la secuencia, tales como BLAST que es bien conocido en la técnica (véase Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol., 215:403-410) para identificar secuencias homólogas o idénticas (por ejemplo, a partir de secuencias patentadas en micromatrices tipo probesets preparadas con ADN de genoma completo); y
- (c) analizar los perfiles de transcripción de las secuencias probesets homólogas identificadas en la etapa (b) e identificar los miARN que tienen un patrón de expresión en los tejidos deseados (es decir, tejidos reproductivos masculinos o femeninos).

Preferentemente, se añade una cuarta etapa:

- (d) para las secuencias probesets homólogas para las que se encuentran los perfiles de transcripción deseados, confirmando la identificación del gen de miARN ya sea mediante alineación de la secuencia de tallo-bucle de la secuencia miR inicial con la secuencia probeset, o bien para miARN potencialmente novedosos, determinar que se prevé que la secuencia se pliegue en una estructura de tallo-bucle característica de un miARN. También

preferentemente, se usa una etapa opcional, en el que se incluyen una o más comparaciones BLAST frente a conjuntos de datos de secuencias adicionales diferentes del conjunto de datos de la secuencia probese (antes de la etapa (b) anterior), permitiendo la identificación adicional de sondas que no se encuentran comprendidas en la región replegada prevista del gen miR; falsos positivos, por ejemplo, debido a los emparejamientos en los conjuntos de datos de secuencias adicionales que incluyen cóntigos cortados y empalmados incorrectamente, que se identifiquen por su ausencia de características de miARN tales como una estructura replegada adecuada, y se eliminen.

La **Figura 5** representa gráficamente los perfiles de transcripción de las secuencias probese que se identificaron, utilizando el procedimiento descrito en los párrafos anteriores, que incluye secuencias de miARN precursor que tienen patrones de expresión específicos de tejido reproductor masculino de maíz (polen). Dichos miARN precursores son adecuados para su uso en construcciones de ADN recombinante de la presente invención diseñada para la expresión de un miARN natural (en este ejemplo, un miARN específico de polen) en condiciones no naturales (por ejemplo, bajo el control de un promotor diferente del promotor natural del miARN precursor). Estos miARN precursores son también útiles para proporcionar una secuencia "estructural" que puede modificarse o diseñarse mediante ingeniería genética para suprimir un gen diana diferente del gen diana natural o endógeno. Un ejemplo no limitante de una construcción de ADN recombinante de la presente invención incluye un promotor constitutivo fuerte que se usa para impulsar la expresión de la unidad de transcripción del transgén que codifica una proteína o fragmento de proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* ("Bt") y un sitio de reconocimiento para un miARN específico de polen, dando como resultado una expresión de Bt fuerte en tejidos de la planta excepto para el polen. Adicionalmente, los promotores naturales de estos precursores de miARN son útiles para la expresión específica de polen de cualquier gen de interés

En una estrategia alternativa, se identificó un sitio de reconocimiento de miARN existente (natural o endógeno), por ejemplo, usando las reglas de complementariedad de secuencia, descritas en Zhang (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:W701-704 y por Rhoades y col. (2002) *Cell*, 110:513-520. El sitio de reconocimiento del miARN natural se muta (por ejemplo, mediante mutagénesis química) lo suficiente para reducir o evitar la escisión (véase Mallory y col. (2004) *Curr. Biol.*, 14:1035-1046). De este modo, un gen que contiene un sitio de reconocimiento de un miARN natural y que tiene efectos deseables, por ejemplo, un tamaño aumentado de la hoja o la semilla, puede mutarse y de esta manera expresarse a niveles mayores que si estuviera presente el sitio de reconocimiento del miARN natural no mutado o endógeno. Una realización es sustituir un gen natural con un homólogo diseñado mediante ingeniería genética, en el que un miARN natural se ha mutado o incluso eliminado, que es menos susceptible a la escisión por un miARN dado.

Otro ejemplo específico de esta estrategia es la inclusión de uno o más sitios de reconocimiento de un miARN maduro no sustancialmente expresado en raíces de maíz pero expresado en la mayoría de otros tejidos (tales como, aunque no de forma limitativa, miRNA162, miRNA164, o miARN390 como se representa gráficamente en la **Figura 4**) en una construcción de ADN recombinante para la expresión de la proteína o fragmento de proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* ("Bt", véanse, por ejemplo, las secuencias insecticidas de *B. thuringiensis* y los procedimientos de uso de las mismas desvelados en la patente de Estados Unidos con número 6.953.835 y en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número 60/713.111, presentadas el 31 de agosto de 2005, que se incorporan por referencia en el presente documento) como el transgén, por ejemplo, en una construcción que incluye el casete de expresión e35S/Bt/hsp17. Al incluir uno o más de estos sitios de reconocimiento en el casete de expresión se reduce la expresión de los transcritos en la mayoría de tejidos diferentes de la raíz, pero mantiene niveles de expresión del ARN diana de Bt elevados en raíces, tal como es deseable para controlar plagas tales como el gusano de la raíz del maíz. En realizaciones similares, se incluyen combinaciones de diferentes sitios de reconocimiento del miARN en la construcción para conseguir el patrón de expresión deseado en uno o más tejidos específicos.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe realizaciones no limitantes de micro ARN de plantas de cultivo y sus estructuras precursoras (replegadas), útiles en la preparación de construcciones de ADN recombinante de la presente invención. Se obtuvo un total de 1327933 ARN pequeños únicos (20 a 24 nucleótidos de longitud) mediante secuenciación de alto rendimiento de 30 bibliotecas de maíz (maíz) (Margulies y col. (2005) *Nature*, 437:376-380). Las secuencias obtenidas se utilizaron para predecir los microARN de maíz y sus estructuras precursoras procedentes de secuencias genómicas de maíz utilizando los procedimientos descritos anteriormente en el **Ejemplo 1**. En total, 1192 ARN pequeños en 1576 secuencias genómicas de maíz patentadas se predijeron como nuevos miARN. Los miARN de maíz y sus correspondientes miARN precursores, así como la posición de los nucleótidos del miARN maduro en cada secuencia precursora de miARN, se denominan por sus números de identificación de secuencia respectivos en la **Tabla 4** como sigue: miARN de maíz (**SEQ ID NOS. 2730 - 3921**) y secuencias precursoras de miARN de maíz (**SEQ ID NOS. 3922 - 5497**).

Tabla 4: miARN y miARN precursores de maíz y arroz

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2730	3928	84	104	2772	4059	11	34
2731	4099	92	113	2772	4051	104	127
2732	3935	11	31	2772	4056	11	34
2733	4093	11	31	2773	4215	11	34
2734	5134	11	32	2774	4718	215	237
2735	4864	188	211	2775	5098	37	56
2736	4123	11	30	2776	5011	11	30
2737	4108	4	27	2777	5262	62	82
2738	5217	11	33	2778	5022	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2738	5277	11	33	2779	5369	47	66
2739	4328	71	90	2780	5038	11	34
2740	4635	42	62	2781	3974	1	24
2741	4591	11	34	2782	4933	103	124
2742	3925	11	34	2783	4380	89	109
2743	4036	11	34	2784	4752	11	33
2744	4586	11	32	2785	4341	209	232
2745	5245	37	57	2786	5408	11	31
2746	5417	30	53	2786	5356	11	31
2747	4527	171	190	2787	5048	37	57
2748	5486	11	32	2788	4920	153	174
2749	4440	11	32	2789	5366	35	55
2749	4428	11	32	2790	4159	203	222
2750	5469	241	261	2791	4798	44	67
2751	5066	11	30	2792	4530	11	31
2752	5095	61	82	2793	5269	11	31
2753	4468	113	133	2794	4334	6	29
2754	4924	37	59	2795	5287	11	30
2755	5242	11	30	2796	5362	11	30
2756	5292	83	103	2796	5396	11	30
2757	3959	11	33	2796	5344	11	30
2758	5489	150	171	2796	5310	11	30
2759	3929	11	34	2796	5360	11	30
2760	5153	11	30	2797	5440	118	138
2761	4251	11	34	2797	5456	118	138
2762	5361	35	55	2798	4962	70	93
2763	3995	11	34	2799	4522	11	34
2764	4448	11	30	2800	4286	11	34
2764	4473	11	30	2801	4299	11	30
2765	4784	11	30	2801	4235	11	30
2766	4478	63	83	2802	4103	11	32
2767	4477	11	34	2803	5136	37	58
2768	4275	11	33	2803	5208	37	58
2768	4223	11	33	2804	4894	11	31
2769	5084	11	31	2805	4413	11	30
2769	5063	61	81	2806	4807	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2770	3985	11	34	2807	4844	426	449
2771	5384	11	32	2808	4022	118	141
2772	4053	11	34	2809	5312	11	30
2772	4058	113	136	2810	4270	52	71
2772	4057	113	136	2811	4233	8	30
2811	4244	253	275	2854	4726	11	34
2811	4293	75	97	2855	4606	11	34
2812	4517	55	77	2855	4729	11	34
2813	4456	40	59	2855	4565	11	34
2814	4258	87	107	2856	4684	11	33
2815	5276	242	261	2857	4660	11	34
2816	4638	54	77	2858	5284	92	115
2816	4815	54	77	2859	5354	60	83
2817	4378	11	34	2859	5395	61	84
2818	5298	33	54	2859	5336	11	34
2819	4208	11	30	2859	5394	11	34
2820	4187	11	30	2859	5430	11	34
2820	4176	11	30	2859	5449	11	34
2821	5333	103	123	2859	5355	11	34
2822	4958	11	31	2859	5444	226	249
2823	4500	11	34	2860	5070	56	77
2824	4373	11	34	2860	5077	11	32
2825	4024	11	34	2861	4086	111	134
2826	5407	47	67	2861	4089	11	34
2826	5448	11	31	2862	4461	298	321
2827	5479	230	253	2863	4663	54	75
2828	4201	53	72	2864	4878	37	57
2829	4709	204	224	2865	4965	11	34
2830	4525	141	160	2866	4232	11	34
2831	4876	125	147	2867	4007	40	62
2832	4122	11	31	2868	4991	64	83
2833	4060	109	132	2869	5180	35	56
2833	4055	11	34	2870	4247	71	92
2834	5302	74	94	2871	4179	11	34
2835	5308	60	79	2872	5470	35	56
2836	4238	75	95	2873	3983	65	88

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2837	5119	11	32	2874	4263	11	31
2838	4873	83	103	2875	5204	64	83
2839	4947	11	30	2876	4364	11	30
2840	4791	231	253	2877	5359	218	238
2841	4567	11	33	2878	4291	11	34
2842	5463	11	33	2879	4217	11	34
2843	4957	42	62	2880	4921	11	30
2844	5205	38	61	2881	4075	11	34
2845	4239	65	85	2881	4067	11	34
2846	5059	149	169	2882	4508	11	34
2847	3964	79	102	2883	5120	11	33
2848	4516	48	71	2884	4276	34	53
2849	4121	11	32	2884	4318	34	53
2850	4526	72	95	2885	4598	11	32
2851	4659	11	30	2886	5445	72	91
2851	4670	11	30	2887	4045	38	60
2851	4668	11	30	2888	5473	11	34
2852	4206	616	636	2888	5324	11	34
2853	5331	443	465	2889	4030	11	33
2889	5363	116	138	2923	4981	122	141
2889	4039	11	33	2924	5071	11	32
2889	4035	11	33	2925	4620	45	65
2889	4029	106	128	2926	4008	11	34
2889	4031	11	33	2927	3994	252	275
2889	4032	11	33	2928	4280	11	34
2890	4174	11	34	2929	4142	77	97
2891	5271	35	58	2930	4982	11	30
2891	5109	36	59	2931	4917	4	27
2891	5163	35	58	2932	4126	106	128
2891	5159	35	58	2933	3945	202	222
2892	4578	11	34	2934	4269	11	32
2892	4774	11	34	2935	4483	154	177
2893	3934	155	178	2936	5393	46	69
2893	3923	11	34	2937	4319	186	208
2894	4504	11	31	2938	4080	69	92
2895	5196	60	80	2939	4918	11	33

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2896	4863	11	33	2940	4499	11	30
2897	3953	11	34	2941	4327	304	323
2897	3967	46	69	2942	5146	121	144
2897	3955	11	34	2943	5106	208	228
2897	3949	49	72	2944	4680	11	30
2898	5397	11	32	2945	4209	11	34
2898	5392	11	32	2946	5453	132	151
2899	4383	36	59	2947	4166	137	157
2900	5240	36	59	2948	5386	11	32
2901	5005	58	80	2949	5199	11	32
2901	4880	58	80	2950	4969	44	63
2902	4750	11	32	2951	5033	179	199
2903	4279	11	34	2951	5091	180	200
2904	4230	229	248	2952	4063	11	34
2905	4955	39	59	2953	5232	138	158
2906	4736	51	70	2954	5494	11	31
2906	4605	51	70	2955	4972	11	30
2907	5379	138	158	2956	5008	245	268
2908	5435	11	32	2957	4111	6	26
2909	5127	11	31	2958	4501	37	56
2910	5368	11	31	2959	5349	11	34
2911	4877	11	34	2960	3971	11	31
2912	5023	50	73	2960	3956	217	237
2913	4087	11	32	2960	3963	92	112
2914	5303	174	193	2961	4044	54	76
2915	5461	54	77	2962	5050	11	33
2916	4789	44	63	2963	4421	116	138
2917	3937	11	34	2964	4083	200	219
2918	4218	135	158	2965	4566	11	32
2919	5040	119	139	2966	4193	11	34
2920	5147	11	34	2967	5376	62	85
2921	5329	54	77	2968	4787	31	50
2922	4135	67	86	2968	4759	31	50
2969	4333	53	72	3003	4285	11	34
2969	4385	53	72	3004	5351	11	32
2970	4391	11	32	3005	5477	49	69

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2971	4537	11	30	3006	5237	11	34
2972	5317	133	153	3006	5219	11	34
2972	5318	136	156	3006	5238	11	34
2972	5446	62	82	3007	4246	11	31
2972	5380	136	156	3008	4466	41	62
2972	5471	162	182	3009	3977	11	34
2972	5452	136	156	3009	3979	37	60
2972	5341	140	160	3009	3975	37	60
2972	5460	11	31	3009	3972	38	61
2972	5374	11	31	3010	5112	11	32
2972	5451	137	157	3011	4085	254	277
2973	4084	11	34	3012	5003	313	336
2974	4116	41	60	3013	4625	11	30
2975	5468	11	31	3014	5459	108	131
2976	4474	11	34	3015	5143	85	104
2977	4744	11	34	3016	5334	34	57
2978	4447	11	34	3017	5482	11	30
2979	4738	11	30	3018	5326	139	161
2980	4132	11	34	3019	3941	69	92
2981	4505	11	30	3019	3938	69	92
2982	5124	11	33	3019	3943	69	92
2983	4888	35	58	3020	4682	11	30
2984	4558	11	34	3021	4214	115	138
2985	4449	41	60	3022	4691	11	32
2986	5410	116	136	3022	4753	11	32
2987	5030	11	34	3023	4717	11	30
2988	4767	11	30	3024	5018	78	97
2988	4633	11	30	3025	4776	11	31
2989	5288	35	56	3026	4105	11	34
2990	4101	245	266	3027	4115	11	30
2991	5178	11	32	3027	4167	173	192
2991	5198	8	29	3028	4892	640	659
2991	5275	11	32	3029	4154	11	32
2991	5185	11	32	3030	4749	11	32
2991	5160	11	32	3030	4783	11	32
2992	4097	11	34	3031	4611	179	200

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
2993	4656	11	31	3032	4721	11	34
2994	4514	219	241	3033	5365	118	138
2994	4398	219	241	3034	4705	112	131
2995	5437	11	34	3034	4570	113	132
2996	4117	39	58	3034	4827	104	123
2997	4446	11	31	3035	4714	42	63
2998	5421	6	27	3035	4829	11	32
2999	4259	11	30	3035	4733	43	64
3000	5423	11	31	3036	4617	11	33
3001	4948	101	121	3037	4847	126	146
3002	5268	11	31	3038	5130	11	31
3038	5223	11	31	3069	5258	11	34
3038	5156	11	31	3070	5188	44	67
3038	5248	11	31	3071	4054	43	66
3038	5183	11	31	3072	4542	38	60
3038	5278	11	31	3072	4742	38	60
3039	4314	60	80	3073	5260	11	30
3040	4502	113	136	3074	5434	213	234
3041	5327	117	140	3075	5381	11	30
3042	4363	11	31	3076	4312	94	117
3042	4503	11	31	3077	4874	11	34
3042	4388	107	127	3078	4930	89	108
3043	4370	39	59	3079	4139	11	34
3044	4151	138	161	3080	5174	94	116
3045	5170	11	30	3081	5121	120	139
3046	4061	11	34	3081	5184	121	140
3046	4073	11	34	3082	4722	11	34
3046	4070	11	34	3083	4836	11	30
3046	4065	11	34	3084	5193	11	34
3046	4062	102	125	3085	5315	115	138
3046	4064	11	34	3086	4664	172	195
3046	4076	11	34	3087	5162	11	31
3047	4546	11	33	3088	4914	70	89
3048	5311	118	137	3089	4110	220	243
3049	4204	11	31	3090	4102	11	34
3050	5370	11	34	3091	5279	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3050	5357	49	72	3092	4141	193	216
3051	4671	11	32	3093	4869	11	34
3051	4716	11	32	3094	5135	11	30
3052	5346	102	123	3095	5041	56	79
3052	5465	102	123	3096	4553	42	63
3053	4409	59	80	3097	5020	37	58
3053	4467	59	80	3097	5017	37	58
3054	5001	59	82	3098	5442	174	194
3054	4853	60	83	3099	5382	74	94
3055	5429	39	61	3099	5330	11	31
3056	4518	6	26	3100	4495	11	34
3057	5062	11	34	3101	4253	75	96
3058	4207	155	174	3102	3944	41	64
3059	4492	11	34	3102	3942	11	34
3060	5224	50	73	3103	5073	58	77
3061	4047	97	120	3104	4137	142	163
3062	3984	1	24	3105	4066	11	31
3063	5385	50	73	3106	5028	70	90
3064	5090	58	77	3107	5267	105	128
3065	3940	11	30	3108	5169	11	33
3066	5353	36	56	3109	4543	165	184
3067	5358	11	34	3110	4702	11	31
3068	4697	206	226	3111	4313	11	34
3068	4674	207	227	3112	5132	140	159
3068	4560	206	226	3113	5404	4	24
3113	5398	4	24	3155	4405	11	31
3114	5116	11	34	3155	4462	11	31
3115	4818	11	31	3156	4990	200	220
3116	4026	48	71	3157	4497	74	96
3117	5141	136	159	3158	4041	11	34
3118	4420	11	30	3159	4646	46	67
3119	5013	11	30	3160	4623	385	404
3120	4336	11	30	3161	5202	11	30
3121	3999	34	53	3162	4970	11	33
3121	3998	34	53	3163	4788	204	227
3122	4631	37	58	3164	4937	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3123	4127	11	30	3164	4837	11	30
3124	4180	11	31	3164	4893	11	30
3125	4104	11	34	3165	4694	11	32
3125	4106	11	34	3165	4792	11	32
3126	5047	11	31	3166	5388	71	90
3126	4908	11	31	3166	5387	71	90
3127	5350	38	59	3167	4443	35	58
3127	5457	38	59	3168	4867	59	78
3128	5467	41	61	3169	4692	29	48
3129	4602	11	31	3170	4224	11	31
3130	5348	70	90	3171	4498	11	34
3131	5034	11	31	3172	5273	11	32
3132	4773	43	62	3173	4927	54	77
3132	4614	51	70	3174	5024	11	31
3132	4687	51	70	3175	5431	265	285
3133	5026	8	28	3176	4315	40	63
3134	4376	11	33	3177	4575	11	33
3135	4748	66	87	3178	4459	193	216
3136	4402	160	180	3178	4340	194	217
3137	4379	188	208	3179	4194	11	34
3138	4779	115	135	3179	4152	99	122
3139	5426	52	71	3180	5436	92	111
3140	5295	38	57	3181	5427	35	54
3141	5094	11	31	3182	4033	39	61
3142	5415	50	73	3183	4643	223	243
3143	4794	104	125	3183	4609	223	243
3144	5250	11	34	3183	4808	223	243
3145	4735	11	34	3183	4802	181	201
3146	4799	11	34	3184	5145	227	250
3146	4703	6	29	3185	5029	67	90
3146	4615	45	68	3186	4261	185	207
3147	4686	205	224	3187	5036	169	188
3148	3980	70	90	3188	4146	11	33
3149	4109	221	244	3189	4549	11	31
3150	4610	57	76	3189	4576	11	31
3151	5167	176	196	3189	4548	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3152	4149	11	34	3189	4594	11	31
3153	4384	1	20	3189	4732	4	24
3154	4899	143	164	3190	5015	11	34
3191	5046	64	84	3231	4819	11	32
3192	5280	11	34	3231	4689	11	32
3193	5343	152	173	3231	4662	11	32
3193	5352	11	32	3232	4658	10	33
3193	5490	11	32	3233	5340	154	176
3194	4465	11	34	3234	4375	11	33
3195	5142	11	32	3235	5131	9	31
3196	5039	11	31	3236	4724	139	159
3196	5053	11	31	3237	4256	52	74
3197	4521	68	88	3238	5051	34	55
3198	4975	11	30	3239	4453	32	55
3199	4415	11	33	3240	5372	11	30
3200	5261	37	59	3241	4444	135	154
3200	5113	11	33	3241	4365	11	30
3201	5087	11	34	3242	4731	150	169
3201	4866	122	145	3243	5213	11	31
3202	4834	11	31	3244	5314	11	31
3202	4651	11	31	3245	4854	11	30
3203	4513	217	239	3246	5320	187	207
3204	4175	57	80	3247	4938	99	122
3205	4839	11	34	3248	4489	11	32
3206	5253	41	60	3249	5474	11	30
3207	4881	11	33	3249	5371	11	30
3208	4715	11	31	3250	5002	11	30
3209	4618	400	423	3251	4699	34	57
3210	4648	11	30	3252	4153	11	31
3211	4362	45	65	3253	4130	11	34
3212	5149	226	248	3254	5138	11	33
3213	5286	81	102	3255	5222	50	72
3213	5300	81	102	3255	5200	50	72
3214	5074	11	34	3256	4107	11	31
3214	4849	11	34	3257	4858	75	94
3215	4762	52	72	3258	4826	11	33

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3216	5377	11	34	3259	5042	44	67
3217	4751	34	53	3260	4696	11	32
3218	4841	11	30	3261	4953	221	241
3219	5186	11	31	3262	4931	11	32
3220	4520	30	49	3263	3987	212	235
3221	3986	116	139	3264	3968	96	119
3222	5420	149	168	3265	4629	71	90
3222	5450	149	168	3266	4600	11	31
3223	5282	35	57	3266	4564	207	227
3224	5319	104	124	3267	4419	45	67
3225	5100	35	56	3268	4964	41	60
3226	4250	11	31	3269	4950	153	172
3226	4268	11	31	3270	4801	33	52
3227	3936	111	131	3271	4048	238	261
3228	4191	37	60	3272	5118	11	34
3229	4740	11	34	3272	5151	11	34
3230	4300	118	141	3272	5264	11	34
3273	4357	11	32	3303	4321	11	34
3274	4009	11	32	3304	4185	49	69
3275	5265	11	30	3304	4136	49	69
3275	5225	29	48	3304	4287	49	69
3275	5126	11	30	3304	4322	49	69
3275	5270	11	30	3305	4588	11	34
3275	5251	105	124	3306	5236	11	34
3275	5137	1	20	3307	4143	11	30
3276	4213	218	238	3308	4302	11	30
3277	4071	36	59	3308	4240	11	30
3278	4678	11	31	3309	4366	11	32
3279	4377	11	30	3310	5472	52	73
3280	4895	40	59	3311	4649	11	30
3280	5108	40	59	3312	4490	11	34
3280	4997	40	59	3313	4642	113	133
3280	4840	40	59	3314	4559	232	252
3280	5014	40	59	3314	4701	232	252
3280	4890	40	59	3315	4216	11	31
3280	4851	40	59	3316	4339	37	59

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3281	4506	11	30	3317	4423	138	157
3282	4353	38	59	3318	5241	55	78
3282	4346	38	59	3319	5255	34	54
3283	4234	257	277	3320	3927	40	60
3283	4168	323	343	3320	3930	40	60
3283	4220	245	265	3320	3926	40	60
3284	4273	11	33	3320	3932	45	65
3285	5243	166	187	3320	3922	39	59
3286	4393	142	165	3320	3924	132	152
3287	4359	11	30	3320	3933	40	60
3288	5211	11	34	3321	4254	60	79
3288	5175	11	34	3322	5166	213	236
3288	5283	11	34	3323	4647	61	81
3289	4308	157	178	3323	4657	61	81
3290	3982	11	34	3323	4603	61	81
3291	4052	11	32	3324	5235	73	96
3292	4589	11	34	3325	4406	34	55
3293	4852	52	72	3326	5207	8	30
3294	4389	118	141	3327	4800	11	32
3295	4768	36	57	3328	4942	11	32
3296	4812	11	32	3329	4796	11	34
3297	3978	37	56	3330	4998	35	56
3298	4761	11	30	3331	4741	240	261
3298	4685	11	30	3332	5306	60	83
3299	4825	11	33	3333	4555	181	203
3299	4745	11	33	3334	4909	41	60
3299	4770	11	33	3335	5304	11	34
3300	5086	56	78	3335	5383	11	34
3301	4486	11	31	3336	5462	31	50
3302	4870	41	61	3337	4636	11	33
3302	5060	41	61	3337	4683	11	33
3338	5105	40	63	3364	3970	11	34
3339	4552	100	122	3364	3965	11	34
3340	4078	39	62	3365	5161	50	71
3341	4835	11	31	3365	5165	50	71
3342	5187	75	96	3365	5173	50	71

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3343	4679	158	181	3366	4460	11	30
3344	4865	11	32	3367	4690	11	31
3344	4862	11	32	3368	4337	87	110
3345	5274	11	34	3369	4534	201	222
3346	4936	11	33	3370	4040	7	30
3347	4352	11	31	3371	5004	11	34
3348	4221	11	31	3372	4720	41	63
3349	5072	11	31	3372	4554	40	62
3349	5083	11	31	3372	4688	40	62
3350	4695	117	139	3373	4401	11	31
3351	5230	71	94	3373	4355	139	159
3352	4961	167	187	3374	4418	11	33
3353	5227	11	30	3374	4412	11	33
3354	4147	92	115	3375	4098	38	58
3355	4536	11	33	3376	5378	11	31
3356	5443	110	130	3377	4562	11	30
3357	5321	247	266	3378	4813	38	57
3358	4196	28	47	3379	4804	153	173
3359	5487	35	56	3379	4613	153	173
3360	4227	11	30	3380	4088	11	34
3361	4488	119	139	3381	4644	229	252
3362	4001	107	130	3382	4708	11	31
3362	4003	8	31	3383	5206	11	30
3362	4012	105	128	3384	4301	36	59
3362	4011	112	135	3385	4471	11	31
3363	4926	136	155	3386	4951	11	30
3364	5433	11	34	3386	5097	11	30
3364	3961	11	34	3386	4904	11	30
3364	4005	11	34	3386	5107	11	30
3364	3960	11	34	3386	5007	11	30
3364	3947	151	174	3387	4298	204	223
3364	3976	11	34	3388	4984	41	64
3364	3966	106	129	3389	5027	11	31
3364	3973	11	34	3390	4082	51	73
3364	3950	11	34	3391	4640	165	184
3364	3958	11	34	3392	4427	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3364	3962	11	34	3393	4411	11	30
3364	3969	11	34	3394	4855	45	68
3364	3957	11	34	3395	5220	11	32
3364	4002	104	127	3395	5272	11	32
3364	3954	11	34	3396	4335	11	32
3364	3952	7	30	3397	5476	215	236
3364	3946	11	34	3397	5390	215	236
3364	3948	11	34	3398	4442	87	107
3364	4006	11	34	3399	4838	11	30
3400	4222	37	58	3434	4574	11	34
3401	4435	11	34	3435	4231	11	34
3402	3990	11	34	3436	4439	215	238
3403	5176	200	219	3437	5454	84	104
3404	5297	49	72	3437	5328	78	98
3405	4095	61	84	3438	5228	11	30
3406	4906	11	32	3439	5432	34	53
3407	4172	11	31	3440	5144	11	30
3408	4226	74	96	3441	4424	136	159
3409	5195	79	98	3442	5290	11	30
3410	4941	33	54	3443	5332	11	31
3411	4330	11	31	3444	4090	11	34
3412	4666	11	30	3445	4743	190	210
3413	4316	72	95	3446	4438	11	34
3414	5168	33	53	3447	4069	11	31
3414	5210	33	53	3447	4072	11	31
3415	5484	37	60	3448	4392	11	34
3415	5491	47	70	3449	4828	11	31
3415	5401	37	60	3450	3992	81	104
3415	5455	37	60	3451	4868	45	64
3415	5458	37	60	3452	4128	11	31
3415	5402	38	61	3453	4338	111	134
3416	4960	11	34	3454	4288	11	31
3416	4919	11	34	3455	4202	11	30
3416	5035	11	34	3456	5010	11	34
3416	5093	11	34	3457	4928	48	71
3417	5406	64	84	3458	4601	43	64

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3418	4512	56	78	3458	4723	43	64
3419	4793	197	217	3458	4582	11	32
3420	4712	42	61	3458	4786	11	32
3420	4675	42	61	3459	4929	117	136
3421	5103	11	30	3460	4074	11	34
3421	4923	11	30	3461	4183	11	30
3421	5043	11	30	3462	4450	126	149
3422	4203	11	30	3463	4805	39	62
3423	4369	255	274	3464	4898	11	30
3424	5488	11	31	3465	4949	76	97
3425	4857	11	33	3466	4769	32	51
3425	4910	11	33	3467	4833	43	66
3426	4403	11	34	3467	4550	43	66
3427	4356	75	98	3468	4988	50	73
3428	4354	11	32	3469	4414	47	66
3429	4766	11	31	3470	5064	34	55
3429	4730	11	31	3471	4381	117	138
3429	4760	11	31	3472	4939	11	34
3429	4561	11	31	3473	5115	11	32
3430	5244	11	30	3474	5139	11	33
3431	5294	11	34	3475	4907	83	102
3432	4985	74	93	3476	4343	11	34
3433	4000	11	34	3476	4348	42	65
3477	4091	54	75	3523	4150	11	31
3478	4932	60	80	3523	4296	11	31
3479	4775	11	32	3523	4118	11	31
3480	4345	11	32	3523	4320	11	31
3481	4900	11	31	3523	4294	11	31
3482	4155	11	34	3523	4225	11	31
3483	5226	287	309	3524	5447	1	22
3484	4283	45	64	3525	4612	11	31
3485	4935	245	265	3526	5057	87	106
3486	5214	72	91	3527	5122	11	30
3487	5189	46	69	3528	5291	133	153
3488	4529	156	179	3529	3931	123	143
3489	4367	11	34	3530	5068	119	138

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3490	4563	11	32	3531	4971	32	52
3491	4585	11	30	3531	4885	32	52
3492	4049	114	137	3531	4915	33	53
3493	4795	39	60	3532	5079	11	30
3494	3988	11	30	3533	5293	53	76
3495	4050	74	97	3534	4331	11	32
3496	5335	11	32	3535	4094	231	254
3497	4634	11	30	3536	4368	11	33
3498	4934	11	30	3536	4484	11	33
3499	4624	65	84	3537	5342	142	161
3500	4911	76	96	3538	4482	45	68
3501	5466	11	33	3539	4886	127	146
3502	5316	146	165	3540	4015	86	109
3503	4832	34	54	3540	4018	11	34
3503	4756	34	54	3540	4017	85	108
3504	4342	11	33	3540	4025	85	108
3505	4622	37	56	3540	4016	85	108
3506	5289	11	30	3540	4014	11	34
3507	5464	130	153	3540	4023	85	108
3508	5054	11	30	3540	4021	85	108
3509	4480	11	34	3540	4020	85	108
3509	4351	11	34	3540	4027	11	34
3510	5325	11	33	3540	4028	11	34
3511	5475	11	31	3540	4013	85	108
3512	5305	11	33	3540	4019	85	108
3513	4307	63	86	3541	5140	11	30
3514	4290	37	59	3542	4823	185	205
3515	5281	11	33	3543	4806	11	32
3516	4544	114	137	3544	4954	11	30
3516	4739	214	237	3545	4292	11	30
3516	4681	32	55	3546	4184	11	32
3517	4332	79	102	3547	4989	11	31
3518	4747	52	74	3548	4496	11	34
3519	5391	11	32	3549	4311	50	69
3520	5192	11	30	3549	4112	11	30
3521	4249	40	62	3550	4568	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3522	4816	303	326	3550	4540	11	30
3551	4822	78	99	3590	4252	11	32
3552	5389	11	31	3591	5212	133	153
3553	5285	227	246	3591	5179	133	153
3554	5493	11	32	3592	4946	113	135
3555	4140	153	172	3593	4632	226	249
3556	5065	41	60	3594	5441	94	117
3557	5323	11	34	3595	4551	11	32
3558	4974	11	33	3596	5078	11	33
3559	4297	303	324	3597	4430	11	32
3560	4510	11	34	3598	4170	43	65
3561	4781	139	162	3599	4266	11	33
3562	4242	223	245	3599	4267	11	33
3562	4178	223	245	3599	4165	11	33
3562	4177	223	245	3599	4305	11	33
3562	4190	223	245	3600	4282	33	53
3562	4257	223	245	3601	5150	68	87
3563	3996	11	31	3602	5403	81	103
3564	4081	69	92	3602	5492	81	103
3565	4579	60	79	3603	4493	373	392
3566	5099	136	155	3604	4211	11	34
3567	4665	238	259	3605	5075	11	31
3568	5069	101	120	3606	4973	11	30
3569	5367	11	32	3607	4884	107	126
3570	4010	50	73	3608	5438	11	31
3571	5413	11	31	3608	5416	11	31
3572	4532	11	32	3609	4780	214	234
3573	4654	11	31	3610	4426	11	33
3574	4422	49	71	3611	4344	11	32
3575	5080	11	34	3612	4887	163	186
3576	4979	11	31	3613	4144	11	31
3576	5067	11	31	3614	4667	102	125
3577	4856	11	32	3615	5249	37	60
3578	4966	38	61	3615	5218	36	59
3579	4400	48	67	3615	5129	36	59
3580	4437	11	31	3616	4725	11	32

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3581	5123	39	62	3616	4719	11	32
3582	5215	11	34	3616	4538	11	32
3582	5155	40	63	3616	4765	11	32
3582	5182	40	63	3616	4547	11	32
3582	5266	40	63	3616	4661	11	32
3583	4672	11	32	3616	4809	11	32
3584	5082	51	71	3616	4604	11	32
3584	4913	37	57	3616	4541	11	32
3585	4956	88	111	3616	4650	11	32
3586	5203	11	31	3617	4349	11	30
3587	4455	133	152	3618	5400	57	79
3588	4145	11	34	3619	4515	11	31
3588	4323	11	34	3620	5114	11	32
3589	5412	11	31	3621	4569	92	112
3590	4161	11	32	3622	4830	143	162
3623	4810	35	56	3662	5409	56	75
3623	4764	198	219	3662	5497	62	81
3624	4616	99	118	3663	4129	11	31
3625	4487	111	131	3664	4746	11	33
3626	4472	43	62	3665	5425	11	33
3627	5337	11	34	3666	4860	11	31
3628	5158	11	31	3667	4655	11	32
3629	5309	11	34	3668	4967	11	30
3630	5418	94	117	3668	4843	71	90
3630	5439	94	117	3669	5485	11	30
3631	5424	36	56	3669	5338	11	30
3632	5307	42	65	3669	5478	11	30
3633	4245	11	33	3670	3989	11	33
3634	4523	134	157	3671	4978	11	30
3634	4507	41	64	3672	4325	11	34
3635	4653	119	142	3672	4197	201	224
3636	5171	38	58	3672	4181	11	34
3637	5322	88	107	3673	4046	128	151
3637	5347	85	104	3674	5246	209	232
3638	4469	11	31	3675	4952	34	53
3638	4371	11	31	3676	4976	62	83

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3638	4404	108	128	3677	4163	11	30
3639	4875	11	32	3678	4445	11	30
3640	5133	67	90	3679	4777	84	103
3641	5092	11	34	3680	5422	47	70
3642	4587	11	30	3681	4524	42	61
3643	4329	78	100	3682	4068	11	31
3644	4896	50	71	3683	4511	183	206
3645	3991	7	29	3684	5496	11	31
3646	4347	51	74	3685	4557	155	178
3647	4037	94	114	3686	4310	11	31
3647	4038	11	31	3687	5254	46	68
3647	4034	104	124	3688	5000	44	64
3648	5104	81	101	3688	4905	11	31
3649	4188	58	81	3689	4848	150	170
3650	4711	162	183	3689	4903	150	170
3650	4831	162	183	3689	4889	177	197
3650	4652	162	183	3689	4994	150	170
3651	4079	11	33	3690	4995	43	63
3652	4219	11	34	3690	4943	43	63
3653	4959	131	150	3691	5399	38	57
3654	4173	240	263	3692	5480	128	151
3655	4134	11	30	3693	4817	11	34
3656	4361	11	30	3694	5301	11	34
3657	4451	11	31	3695	5009	79	100
3658	4871	11	33	3696	4125	43	63
3659	4043	11	34	3697	4360	11	32
3660	4387	11	32	3698	4113	71	90
3661	4425	41	61	3699	4901	11	31
3661	4457	42	62	3699	4922	11	31
3700	5012	231	250	3743	4597	70	89
3700	4980	231	250	3743	4797	105	124
3701	4284	73	95	3744	5191	11	34
3702	4639	11	34	3744	5172	11	34
3703	4189	36	59	3745	5177	176	199
3704	5483	68	87	3746	4192	11	32
3705	5058	11	34	3747	4326	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3706	5037	57	77	3748	3939	11	34
3707	4382	31	51	3749	4983	11	34
3708	5364	11	31	3749	4944	11	34
3708	5419	11	31	3750	5101	94	113
3709	4669	11	32	3751	4374	69	92
3710	4519	151	174	3752	4987	11	30
3711	4693	11	30	3753	4572	11	30
3712	4433	11	34	3754	4755	43	66
3713	4790	11	33	3755	5234	11	34
3714	4595	67	89	3756	4396	11	30
3715	4248	41	60	3757	4120	212	231
3716	4164	156	176	3758	4210	136	157
3717	4993	110	133	3759	5157	11	34
3718	4186	11	32	3760	3993	33	54
3718	4133	63	84	3761	5373	118	138
3719	4463	11	34	3762	4621	37	56
3720	4963	11	34	3762	4581	37	56
3721	4324	11	30	3762	4803	37	56
3721	4281	11	30	3763	5052	5	24
3722	4198	11	32	3764	4372	11	31
3723	4811	149	172	3765	4429	11	31
3724	4676	220	239	3766	5375	227	250
3725	4706	43	64	3767	4883	44	64
3726	4004	11	31	3767	4916	44	64
3727	5252	11	32	3768	4728	11	34
3728	5259	11	34	3769	4757	45	67
3729	5256	35	54	3770	3951	11	31
3730	4539	138	159	3771	5164	41	64
3730	4599	11	32	3772	4556	11	32
3731	4700	40	63	3772	4821	162	183
3732	4533	11	34	3773	5428	44	67
3733	4264	11	31	3774	4491	11	31
3734	4996	11	31	3775	5263	116	136
3735	4148	11	33	3776	4205	11	30
3736	4481	11	30	3776	4236	32	51
3737	4607	11	30	3776	4243	230	249

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3738	4627	242	261	3776	4195	33	52
3739	5239	37	58	3777	4260	52	75
3740	5154	11	34	3778	4727	51	74
3741	4925	11	32	3779	4160	11	31
3742	4754	101	120	3779	4157	11	31
3743	4785	70	89	3780	5117	79	99
3743	4619	70	89	3781	4434	162	181
3782	5021	11	34	3824	5045	112	131
3783	4479	11	30	3825	4237	79	102
3783	4395	11	30	3826	4897	11	30
3784	5411	181	203	3827	4485	233	254
3784	5414	214	236	3828	4408	28	51
3784	5339	214	236	3829	4417	11	32
3785	5209	134	154	3829	4528	36	57
3786	4265	11	30	3830	4303	179	202
3787	5128	11	30	3831	3981	11	34
3788	5181	86	105	3832	5076	11	31
3789	5194	11	30	3833	4580	11	32
3790	4778	194	215	3834	4494	11	31
3791	4902	32	53	3835	4119	11	34
3791	4861	32	53	3836	4637	92	115
3792	4272	11	34	3837	4407	11	34
3793	5233	11	32	3838	4912	11	30
3794	4608	199	222	3839	4673	11	32
3795	4228	42	65	3840	4882	241	261
3796	4350	11	34	3841	4278	76	96
3797	5111	11	32	3842	4879	11	32
3798	4306	66	85	3843	5125	29	48
3799	5313	31	51	3844	4476	41	64
3799	5345	32	52	3845	4641	11	31
3800	5049	110	130	3846	5216	11	33
3801	5231	99	121	3847	4241	49	70
3802	5257	11	34	3848	4945	11	30
3803	4992	119	139	3849	4162	11	30
3804	4590	11	30	3850	5032	11	33
3805	4470	49	70	3851	4593	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3806	5495	78	100	3852	3997	11	34
3807	5405	203	226	3853	4431	11	31
3808	4454	37	57	3854	4571	40	59
3808	4535	37	57	3854	4630	40	59
3809	5481	42	64	3855	4096	36	57
3810	4100	135	154	3855	4092	11	32
3811	4077	49	72	3856	5296	38	59
3812	4859	11	31	3857	4626	11	30
3812	5088	11	31	3858	4212	104	127
3813	5089	11	34	3859	4577	177	197
3814	4452	66	87	3860	4229	11	30
3815	4698	45	65	3860	4182	11	30
3816	4394	11	30	3861	4968	11	30
3817	4410	49	72	3862	5299	11	32
3818	4158	71	90	3863	4042	11	34
3819	4891	45	65	3864	4475	11	32
3820	4758	68	91	3865	4386	34	54
3821	4509	11	31	3865	4432	34	54
3822	4295	33	52	3866	4441	11	32
3822	4317	33	52	3866	4416	11	32
3823	5201	11	34	3867	4545	11	30
3868	4820	34	54	3894	4464	11	32
3869	5056	61	80	3895	5006	11	34
3870	5102	11	31	3896	4399	11	30
3871	5019	93	114	3897	4999	46	65
3872	4262	43	66	3898	5110	57	79
3872	4200	43	66	3899	5152	54	75
3873	5081	34	53	3900	4710	41	62
3873	5044	34	53	3901	4199	42	61
3874	4986	122	141	3902	4872	74	97
3875	4271	11	31	3903	4782	36	56
3876	4397	43	62	3904	4771	102	121
3877	4850	104	124	3905	4573	11	30
3878	4584	11	30	3905	4824	11	30
3879	5016	49	72	3905	4713	11	30
3880	4156	8	31	3905	4734	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
3881	4274	44	63	3905	4596	11	30
3881	4131	44	63	3905	4707	11	30
3881	4114	44	63	3905	4583	11	30
3881	4124	11	30	3906	4842	11	30
3881	4289	44	63	3906	5085	11	30
3882	5148	11	34	3907	5061	11	31
3882	5229	11	34	3908	5197	38	58
3883	4436	11	32	3909	4846	79	99
3884	4940	47	68	3910	4169	11	33
3884	4845	47	68	3911	5190	11	32
3884	5025	47	68	3912	4704	11	33
3885	5055	11	34	3912	4763	11	33
3886	4255	65	85	3913	4531	37	56
3887	5096	11	32	3914	4737	11	32
3888	4304	141	161	3915	4814	11	33
3888	4277	141	161	3916	5221	132	153
3889	4358	11	30	3916	5247	132	153
3890	4645	11	34	3917	4390	33	53
3891	4977	11	30	3918	4138	173	196
3892	4628	11	32	3919	4677	42	64
3893	4592	37	57	3920	4171	11	34
3893	4772	37	57	3920	4309	11	34
3894	4458	11	32	3921	5031	64	87

Ejemplo 5

Este ejemplo describe realizaciones no limitantes de micro ARN de plantas de cultivo y sus estructuras precursoras (replegadas), útiles en la preparación de construcciones de ADN recombinante de la presente invención.

- Se prepararon bibliotecas de ARN pequeño de maíz (maíz, *Zea mays*) o de soja (*Glycine max*) que crece bajo estrés hídrico y condiciones de control (**Tabla 5**). Se evaluaron las etapas de sequía para la soja utilizando un sistema de puntuación relativa de 1,0 (sin efecto o control) a 4,0: en la **Figura 6** se ilustran los ejemplos de las plantas de soja en cada etapa. Las secuencias de ARN pequeño obtenidas de esta manera se utilizaron para predecir novedosos microARN adicionales y sus estructuras precursoras (replegadas) a partir de secuencias genómicas de maíz o soja, respectivamente, utilizando los procedimientos descritos anteriormente en el **Ejemplo 1**. A partir del maíz, se predijeron 1186 miARN de maíz en 1725 secuencias genómicas de maíz, y a partir de soja, se predijeron 134 miARN de soja en 181 secuencias genómicas de soja (**Tabla 6**). Estos miARN y sus correspondientes secuencias precursoras de miARN, así como la posición de los nucleótidos del miARN maduro en cada secuencia precursora de miARN, se denominan por sus números de identificación de secuencia respectivos en la **Tabla 6** como sigue: miARN de maíz (**SEQ ID NOS. 5498 - 6683**), secuencias de miARN precursor de maíz (**SEQ ID NOS. 6684 - 8408**), miARN de soja (**SEQ ID NOS. 8409 - 8560**), y secuencias de miARN precursor de soja (**SEQ ID NOS. 8561 - 8417**).

Tabla 5

Número de biblioteca	Planta de cultivo	Tejido	Estadio de desarrollo	Tratamiento
42	maíz (<i>Zea mays</i>)	hoja joven de tejido sumidero	V8	control
43	maíz (<i>Zea mays</i>)	hoja joven de tejido sumidero	V8	sequía leve
44	maíz (<i>Zea mays</i>)	hoja joven de tejido sumidero	V8	control
45	maíz (<i>Zea mays</i>)	hoja joven de tejido sumidero	V8	sequía intensa
46	maíz (<i>Zea mays</i>)	raíz	V8	control
47	maíz (<i>Zea mays</i>)	raíz	V8	sequía leve
48	maíz (<i>Zea mays</i>)	raíz	V8	control
38	soja (<i>Glycine max</i>)	hoja de plántula	plántula	control
39	soja (<i>Glycine max</i>)	hoja de plántula combinada	plántula	sequía, etapa 3.0 y 3.5 combinada*
40	soja (<i>Glycine max</i>),	raíz	maduro	control
41	soja (<i>Glycine max</i>)	raíz madura combinada	maduro	sequía, todas las etapas 1.5 y 3.5 combinadas*

* Para las bibliotecas 39 y 41 preparadas a partir de soja, las muestras de las etapas indicadas se combinaron; Se evaluaron las etapas de sequía para la soja utilizando un sistema de puntuación relativo como sigue:

1.0 = sin efecto

1.5 = meristemo o un trifolios marchito

2.0 = dos trifolios marchitos

2.5 = todos los trifolios marchitos

3.0 = trifolios inferior completamente seco y quebradizo.

3.5 = todos los trifolios, pero el superior completamente seco y quebradizo, el trifolios superior todavía blando

4.0 = todo completamente seco y quebradizo

Tabla 6: miARN y miARN precursores de maíz y soja

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5498	8176	11	34	5534	6824	11	31
5499	7089	11	34	5535	6912	136	155
5500	6978	99	119	5535	7220	137	156
5500	8029	97	117	5535	7779	140	159
5500	8030	97	117	5536	7920	45	65
5500	8195	99	119	5537	7921	11	35
5500	8205	99	119	5538	8284	11	31
5500	8236	99	119	5539	6829	143	164

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5501	7554	143	164	5539	6864	11	32
5502	7902	11	34	5539	6905	11	32
5503	6723	57	80	5539	6952	144	165
5503	7359	11	34	5539	7709	11	32
5504	7087	11	34	5540	7045	91	115
5504	8156	11	34	5540	7207	91	115
5505	7303	62	85	5540	7641	91	115
5506	8120	35	56	5540	7834	91	115
5507	8047	11	32	5540	7835	91	115
5508	6970	5	28	5541	8303	11	31
5509	7685	74	97	5542	8230	109	132
5510	6881	63	84	5543	7839	34	55
5511	7068	70	91	5543	7840	34	55
5511	8217	69	90	5544	6856	11	34
5512	7772	55	74	5545	6686	204	224
5513	7585	11	34	5545	7092	199	219
5514	7009	42	61	5546	7888	38	61
5514	7335	42	61	5547	7293	11	34
5514	7912	42	61	5548	7871	11	32
5514	8272	42	61	5549	7979	39	62
5514	8354	42	61	5550	7324	11	34
5515	8130	11	32	5550	7922	157	180
5516	7085	55	77	5551	7691	45	68
5517	7845	11	32	5552	8233	40	63
5518	8270	135	158	5553	7170	47	70
5519	7363	50	69	5554	8390	36	59
5520	7853	11	32	5555	7177	11	31
5520	8147	11	32	5556	7525	61	81
5521	7710	11	30	5557	6991	39	62
5522	7521	2	25	5558	7879	111	132
5522	7655	187	210	5559	7627	11	32
5523	7152	11	34	5560	7485	11	34
5524	6774	145	167	5560	7565	40	63
5525	6790	159	179	5560	8056	11	34
5526	7947	11	34	5561	6690	11	34
5527	7744	6	25	5562	6832	54	75

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5528	7233	11	32	5563	7459	45	65
5529	7476	11	30	5563	7460	45	65
5530	7933	11	33	5563	7507	46	66
5531	7971	11	34	5563	7730	45	65
5532	6815	11	34	5563	7756	46	66
5533	8034	41	63	5563	8058	46	66
5563	8064	47	67	5583	7668	11	31
5563	8065	46	66	5584	6762	80	103
5564	7571	47	70	5585	7937	11	30
5565	7030	11	30	5586	8175	11	31
5566	7059	11	34	5587	7477	73	96
5566	7514	11	34	5588	8180	37	60
5566	8111	11	34	5589	7934	35	58
5566	8215	11	34	5590	7517	123	146
5566	8337	11	34	5591	7566	11	34
5567	6748	66	89	5592	7781	11	32
5568	6725	97	117	5593	7760	87	110
5568	6830	97	117	5594	7223	11	31
5568	8307	11	31	5594	7417	11	31
5569	7287	11	31	5594	7496	11	31
5570	6778	11	31	5594	7816	11	31
5570	8172	213	233	5594	7872	11	31
5571	7882	45	66	5594	7897	11	31
5572	7227	56	79	5594	8024	11	31
5573	7491	33	56	5594	8026	11	31
5574	7296	122	142	5595	6958	40	63
5575	7614	11	34	5595	8016	11	34
5576	6793	112	132	5596	8285	76	99
5577	6741	40	63	5597	8125	11	34
5577	6942	39	62	5598	8008	42	63
5577	7057	40	63	5599	7414	38	61
5577	7206	39	62	5600	6708	74	93
5577	7381	40	63	5600	8041	11	30
5577	7388	39	62	5600	8042	11	30
5577	7423	40	63	5601	7823	11	34
5577	7427	39	62	5602	7483	338	359

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5577	7504	40	63	5603	6685	71	91
5577	7907	39	62	5603	7780	102	122
5577	7956	40	63	5604	7072	118	138
5577	7958	39	62	5605	7893	11	31
5577	7965	39	62	5606	7646	70	92
5577	7966	40	63	5607	8348	104	127
5577	7997	39	62	5608	7290	60	80
5577	8011	40	63	5609	7670	189	212
5577	8025	40	63	5610	6949	92	112
5577	8170	39	62	5611	6870	39	61
5577	8185	39	62	5611	6878	218	240
5577	8312	40	63	5611	7243	218	240
5578	7978	58	81	5611	8235	39	61
5578	8131	58	81	5612	7546	11	32
5579	7430	62	83	5613	8264	11	34
5579	7442	62	83	5614	7829	11	31
5579	7698	62	83	5614	8314	11	31
5580	7914	55	78	5615	6760	11	31
5581	6869	113	136	5616	7310	51	71
5582	7396	11	34	5617	7373	11	32
5618	7440	11	34	5651	7055	11	33
5619	7475	211	234	5651	7763	11	33
5620	8356	404	423	5652	7755	11	34
5621	7715	11	32	5652	7828	11	34
5622	6993	99	122	5653	8115	32	51
5623	7841	11	31	5654	7821	48	71
5624	7183	81	101	5655	6694	11	33
5625	6861	35	55	5656	6990	11	31
5626	8122	11	34	5656	7793	11	31
5627	6767	11	33	5657	8250	11	30
5627	7919	11	33	5658	8080	11	34
5628	6957	11	34	5659	7394	11	34
5629	7383	73	95	5660	8305	11	31
5629	7634	73	95	5661	6873	11	31
5630	7809	38	59	5662	7264	51	74
5630	7810	37	58	5662	8287	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5630	7936	38	59	5663	7001	11	32
5631	7140	40	61	5664	8394	11	34
5631	7197	40	61	5665	7406	78	97
5632	6730	215	234	5665	7470	11	30
5632	7754	218	237	5666	7144	41	62
5633	7577	134	153	5666	7635	41	62
5633	7613	134	153	5667	6698	11	34
5634	7003	72	91	5668	7117	11	32
5635	7812	11	30	5668	7154	11	32
5636	8049	60	83	5668	7457	11	32
5637	8375	11	33	5669	8135	117	137
5638	8164	11	31	5670	6906	58	78
5639	7573	37	56	5671	7167	11	34
5640	8259	11	34	5672	7217	165	184
5641	7240	11	30	5672	7326	165	184
5642	8128	222	245	5673	6977	66	85
5643	7660	11	32	5674	7526	130	149
5644	6804	37	59	5675	7820	11	32
5644	6924	37	59	5676	7765	11	34
5644	7138	37	59	5677	7110	48	69
5644	7439	37	59	5678	7319	11	35
5644	7450	37	59	5679	8171	46	65
5644	7588	37	59	5679	8241	46	65
5644	7591	37	59	5680	7555	31	54
5644	7786	37	59	5680	8143	31	54
5644	7905	37	59	5681	6707	11	31
5644	7928	37	59	5682	8129	1	22
5645	8204	38	60	5683	7060	11	31
5646	6687	187	209	5683	7078	52	72
5647	7330	11	32	5684	7802	11	34
5648	7587	11	34	5685	7356	11	34
5649	7435	292	315	5686	6847	11	34
5650	7653	11	34	5687	8326	11	31
5650	8066	11	34	5688	7314	144	164
5689	7512	11	34	5725	8396	11	32
5690	8193	157	177	5726	7836	211	232

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5691	8210	11	34	5727	8148	11	34
5692	7323	47	69	5727	8149	49	72
5693	8278	11	34	5728	7175	11	33
5694	8393	69	89	5729	7134	11	34
5695	8004	70	91	5730	6858	86	108
5696	6765	36	55	5731	6836	11	33
5696	7556	36	55	5732	7910	107	126
5696	7771	36	55	5733	6884	233	256
5697	7601	83	104	5734	7010	11	30
5698	7266	11	35	5735	8158	11	30
5699	7873	137	157	5736	6989	11	33
5700	7093	11	34	5737	7964	11	34
5701	7034	11	30	5738	7041	76	97
5701	7246	11	30	5738	8268	75	96
5702	6968	56	79	5739	6850	11	32
5703	7469	42	63	5740	6724	182	204
5704	7891	11	34	5740	8209	84	106
5705	8166	11	31	5741	7193	181	204
5706	7295	58	78	5741	7194	191	214
5707	7752	11	32	5741	7798	181	204
5708	6909	11	34	5742	7354	83	104
5708	7581	97	120	5743	6716	50	73
5709	8155	55	75	5743	6736	11	34
5710	7704	11	33	5744	7253	240	262
5711	8032	11	31	5745	8084	97	120
5712	7868	11	34	5746	6853	113	133
5712	7869	11	34	5747	7564	11	31
5713	6766	42	62	5747	8330	11	31
5714	7644	11	34	5748	7166	11	34
5715	7132	75	98	5749	7182	96	116
5715	7245	11	34	5750	8222	211	231
5715	8276	11	34	5751	6860	178	199
5715	8344	11	34	5752	7018	11	34
5716	6781	11	33	5753	7026	11	31
5717	6754	11	35	5754	7484	124	145
5718	7358	11	31	5755	8255	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5718	8178	11	31	5756	7944	11	34
5719	7895	29	49	5757	7297	11	34
5720	7813	11	31	5758	7650	11	30
5721	7631	11	31	5759	8174	46	67
5722	7105	11	31	5760	7474	11	34
5723	7063	42	61	5760	7510	11	34
5723	7163	42	61	5760	7511	11	34
5723	8308	42	61	5761	7360	11	30
5724	6734	11	32	5761	8246	11	30
5724	7121	11	32	5762	8403	29	52
5724	7632	11	32	5763	7005	64	86
5725	8046	11	32	5764	8310	11	33
5765	6894	3	24	5797	7336	184	204
5766	7558	46	67	5798	7073	43	64
5767	7520	232	252	5798	8001	33	54
5767	8017	148	168	5799	7499	11	32
5767	8100	70	90	5800	8385	218	238
5768	7611	236	255	5801	6865	117	137
5769	8345	107	127	5801	7524	117	137
5770	7025	11	31	5802	7037	96	117
5771	7143	11	34	5803	7822	36	56
5772	7447	11	32	5804	8145	114	137
5773	7590	11	34	5805	7398	36	59
5774	6739	152	175	5806	7992	11	34
5774	7669	151	174	5807	6820	40	63
5774	8013	152	175	5808	7205	82	103
5775	6720	11	32	5809	7899	11	34
5775	7165	11	32	5810	7490	58	81
5775	7638	11	32	5811	6833	11	32
5775	8377	11	32	5811	7727	11	32
5776	7686	74	97	5812	7408	11	31
5777	7340	11	32	5813	6848	11	31
5777	7397	11	32	5814	6941	192	211
5777	8239	77	98	5815	7069	37	58
5778	8192	11	30	5815	8368	37	58
5779	8048	11	34	5816	8357	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5780	7239	78	101	5817	8108	11	30
5781	7945	11	31	5818	7814	11	30
5782	8408	11	31	5819	7529	28	48
5783	8057	11	30	5819	8248	28	48
5784	7204	237	256	5820	6763	47	66
5785	7599	135	158	5821	8012	11	30
5786	6921	11	31	5821	8091	11	30
5787	7677	11	31	5822	8054	54	73
5788	8124	55	76	5823	7268	239	259
5789	7817	11	32	5824	6732	11	34
5790	6934	11	32	5824	6827	11	34
5790	7015	11	32	5824	7184	11	34
5790	7124	11	32	5825	8340	11	30
5790	7317	11	32	5826	7300	11	34
5790	7428	11	32	5827	8050	11	30
5790	7488	11	32	5828	8245	68	90
5790	7532	11	32	5829	7981	11	33
5790	7575	11	32	5829	7983	11	33
5790	7576	11	32	5830	7331	185	205
5790	7665	11	32	5831	7862	35	54
5791	7738	11	34	5832	7642	57	80
5792	7040	44	68	5832	8266	57	80
5793	7530	11	33	5833	8247	40	61
5794	7076	47	70	5834	7931	11	30
5795	7988	3	23	5834	8359	11	30
5796	6718	52	75	5835	7697	35	56
5836	7759	11	33	5876	7913	159	178
5837	8187	41	64	5877	8263	137	161
5838	7279	44	63	5878	8083	11	32
5839	8038	189	210	5879	8087	11	30
5839	8200	189	210	5880	7705	49	72
5840	7860	2	22	5881	7262	11	31
5841	6959	11	34	5881	7277	11	31
5841	7462	11	34	5881	8194	11	31
5842	6784	52	71	5882	7664	53	72
5842	8378	11	30	5883	6849	36	55

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5843	6772	73	96	5883	7410	11	30
5843	7181	73	96	5884	7874	11	32
5844	7932	155	178	5885	6948	11	32
5845	8074	11	32	5886	6756	11	31
5846	8306	11	30	5886	6837	11	31
5847	7202	38	61	5886	7016	11	31
5848	6780	41	61	5886	7654	11	31
5849	7833	11	34	5887	8159	48	68
5850	7619	11	31	5888	7948	79	98
5851	6819	11	34	5889	7353	32	52
5851	7274	38	61	5890	6972	57	77
5851	8144	38	61	5891	8275	11	31
5851	8386	38	61	5892	7020	11	34
5852	6787	34	55	5893	7625	11	31
5852	8189	34	55	5894	7606	41	60
5853	7247	11	31	5894	7608	9	28
5854	6938	143	164	5895	6809	11	34
5855	7191	168	188	5896	6823	98	120
5855	7316	168	188	5896	6893	98	120
5856	7737	76	97	5896	7848	100	122
5857	7918	44	67	5897	6795	11	30
5858	7551	11	34	5898	7843	11	32
5859	7774	11	34	5899	8298	11	32
5860	7375	11	33	5900	8363	11	34
5861	7745	132	152	5901	7248	10	33
5862	8211	181	203	5902	7885	11	31
5863	7652	132	155	5903	6875	11	35
5864	7355	11	33	5904	6975	112	133
5865	7927	42	61	5905	7461	11	34
5866	7434	196	218	5906	6951	46	69
5867	8039	67	86	5907	6877	11	35
5868	6731	11	34	5907	7390	11	35
5869	6929	63	84	5908	8199	75	97
5870	7864	7	27	5909	7883	39	62
5871	8133	30	50	5910	7088	85	108
5872	8292	211	230	5911	6709	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5873	7226	11	34	5912	7265	30	50
5874	7237	66	89	5912	7663	30	50
5875	8079	11	33	5912	8339	30	50
5876	7508	172	191	5913	6885	221	244
5914	8406	11	30	5952	6892	11	31
5915	7550	11	34	5953	6703	130	151
5916	7804	75	98	5953	6789	130	151
5917	8327	60	83	5954	7127	11	33
5918	7487	11	34	5955	7728	73	96
5919	7681	44	65	5955	8208	73	96
5920	7012	115	136	5956	7801	52	74
5921	7256	11	34	5957	7612	11	31
5922	7000	42	66	5958	7213	33	52
5923	8367	11	31	5958	7768	33	52
5924	6919	11	34	5959	6786	40	60
5925	7749	36	55	5960	7633	11	32
5926	8352	11	30	5961	7790	11	31
5927	7838	11	32	5961	7950	11	31
5928	7074	38	57	5962	7351	11	34
5928	8063	38	57	5963	6995	54	77
5929	6826	40	60	5964	8027	42	65
5930	8109	125	144	5964	8347	42	65
5931	8387	76	96	5965	7466	108	127
5932	7042	11	31	5966	7500	11	34
5932	7049	11	31	5967	7495	49	69
5932	7210	11	31	5968	7463	80	104
5932	7875	11	31	5968	8296	80	104
5933	6764	11	31	5969	7156	11	31
5933	8365	11	31	5969	7377	39	59
5934	8202	115	136	5970	8099	52	75
5935	7991	11	30	5971	6821	11	34
5936	7118	11	31	5971	7549	198	221
5936	7850	11	31	5971	7807	198	221
5936	7851	11	31	5971	7880	198	221
5936	8141	11	31	5972	8253	11	35
5936	8213	11	31	5973	8154	107	130

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5936	8228	11	31	5974	8214	11	31
5937	7115	11	32	5975	7986	11	32
5938	6713	11	30	5976	7150	89	109
5938	6947	11	30	5977	7723	42	65
5939	6976	134	155	5978	6845	139	159
5940	6984	11	34	5978	6902	139	159
5941	7857	11	32	5978	7275	11	31
5941	8075	11	32	5978	7707	140	160
5942	7713	38	57	5979	7887	11	30
5943	7622	50	69	5980	6710	86	107
5944	6852	11	31	5980	6998	86	107
5945	7528	11	33	5980	7302	86	107
5946	7954	54	74	5981	7855	11	33
5947	8198	11	34	5982	6722	46	67
5948	6910	236	257	5982	7436	46	67
5949	7975	11	31	5982	8023	46	67
5950	7844	230	251	5983	6930	202	224
5951	8094	73	93	5984	8364	42	63
5985	7392	48	67	6019	7819	11	32
5986	7100	42	61	6020	7192	11	35
5986	7208	42	61	6021	8119	11	32
5986	7209	42	61	6022	6911	30	49
5986	7569	42	61	6023	7031	11	31
5986	7865	42	61	6024	7232	11	32
5986	7866	42	61	6025	6840	173	194
5986	7867	42	61	6026	8062	160	180
5986	8053	42	61	6027	8035	54	78
5986	8244	42	61	6028	8186	11	33
5987	7014	11	31	6029	6880	39	59
5988	7116	11	32	6030	8076	33	53
5988	8404	11	32	6031	6992	11	30
5989	6866	92	115	6032	7230	119	141
5990	7849	137	160	6032	8229	11	33
5991	7630	168	187	6033	6798	57	76
5991	8260	168	187	6034	7064	201	222
5992	6791	11	32	6035	8383	65	86

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
5993	8116	10	29	6036	8289	11	34
5994	7407	175	195	6037	7082	11	31
5995	7158	11	31	6038	7648	48	70
5996	8107	88	111	6039	8407	200	220
5997	7252	188	209	6040	7095	54	77
5997	7675	182	203	6041	8163	11	34
5998	7106	38	58	6042	7501	45	69
5999	8045	46	69	6042	7580	45	69
6000	7224	56	76	6042	7962	45	69
6001	7225	36	56	6043	6955	11	31
6001	7735	36	56	6043	7446	11	31
6002	6749	11	34	6043	7515	11	31
6003	7273	64	83	6043	7543	11	31
6004	6983	56	79	6043	7617	11	31
6004	7832	56	79	6043	7618	11	31
6005	6859	119	141	6043	7726	11	31
6006	7692	11	32	6043	8098	11	31
6007	7773	36	55	6043	8290	11	31
6008	8096	11	32	6044	7086	11	34
6009	8146	80	99	6044	7306	11	34
6010	7133	236	256	6044	7736	11	34
6010	7568	204	224	6045	7620	231	252
6011	8078	11	34	6045	7906	231	252
6012	8092	241	261	6046	7321	11	33
6013	6816	211	232	6047	6967	11	31
6014	6817	11	35	6048	7101	11	30
6014	7909	11	35	6048	8333	11	30
6015	6705	35	55	6048	8362	11	30
6016	7379	45	68	6049	7216	11	30
6017	7762	68	92	6049	7706	11	30
6018	7027	11	35	6050	7481	11	33
6018	7173	11	35	6051	8040	11	33
6052	6807	11	31	6092	7308	51	73
6053	7431	11	32	6092	7688	51	73
6053	8203	11	32	6092	8301	51	73
6054	7218	11	34	6093	7539	11	33

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6054	7968	11	34	6094	7380	58	79
6055	8043	38	57	6094	8293	58	79
6056	8336	11	30	6095	7135	11	31
6057	8225	11	33	6096	8257	11	34
6058	6818	52	71	6096	8291	11	34
6059	7996	11	34	6097	7129	34	53
6060	6918	11	32	6098	7747	11	31
6061	8090	11	32	6099	6943	86	106
6062	7021	11	30	6100	8182	11	34
6063	7441	51	71	6100	8221	11	34
6064	7667	385	408	6101	6904	11	32
6065	8273	50	72	6101	8254	11	32
6066	7046	11	34	6102	7972	118	142
6067	8021	31	50	6103	6693	11	32
6068	6769	100	121	6104	7190	82	101
6068	7033	100	121	6105	7673	11	34
6069	7438	49	71	6106	7142	11	34
6070	6931	42	63	6107	7892	11	31
6070	7930	42	63	6108	7672	34	53
6071	8384	11	30	6109	7628	11	31
6072	8349	11	30	6110	8282	11	33
6072	8350	11	30	6111	6935	11	30
6073	6944	11	30	6111	7259	11	30
6073	8315	11	30	6111	7678	234	253
6074	6862	11	30	6112	6770	41	60
6075	7748	11	32	6112	7352	41	60
6076	6974	73	93	6113	7775	11	35
6077	7393	11	31	6114	7700	11	30
6077	7680	11	31	6115	6854	11	31
6077	7732	11	31	6115	7294	11	31
6077	7859	11	31	6116	8328	11	31
6078	6750	211	230	6117	7357	304	326
6079	8376	11	30	6118	7051	210	232
6080	6792	11	33	6119	7572	204	227
6081	8281	11	32	6120	8085	66	85
6082	7552	11	30	6121	7125	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6083	7168	47	70	6121	7305	11	30
6084	7443	45	68	6122	8358	11	34
6085	7061	11	31	6123	7285	53	73
6085	7583	35	55	6123	7312	53	73
6086	6738	40	60	6123	7458	52	72
6087	7367	11	34	6123	7502	53	73
6088	8399	11	32	6123	7544	53	73
6089	6752	36	59	6123	7545	53	73
6090	6863	11	31	6123	7643	53	73
6091	7806	11	30	6123	7717	53	73
6123	7718	53	73	6155	7035	89	109
6123	7719	53	73	6155	7109	89	109
6123	7720	53	73	6156	7028	11	35
6123	7721	53	73	6156	7400	11	35
6123	7890	53	73	6156	8103	11	35
6123	8123	53	73	6157	7288	11	32
6123	8150	53	73	6157	8355	11	32
6123	8151	53	73	6158	8360	58	81
6123	8152	53	73	6159	8095	37	56
6123	8153	53	73	6160	7666	38	58
6124	7119	53	76	6161	7036	11	33
6125	7141	11	33	6162	8067	11	35
6126	6895	11	31	6163	7637	11	34
6127	6923	11	30	6164	6907	173	195
6127	7188	11	30	6164	7401	173	195
6128	8112	51	74	6164	8031	173	195
6129	6867	36	58	6165	6900	11	31
6129	8343	36	58	6166	7989	11	34
6130	8127	69	89	6167	7249	11	31
6131	7915	11	34	6168	7038	157	176
6132	6986	11	30	6169	7270	49	68
6133	7984	11	32	6170	7547	6	27
6134	7753	11	32	6171	7985	11	31
6135	6879	11	34	6172	7782	11	34
6136	8341	45	68	6173	7769	11	34
6137	7503	126	145	6174	7595	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6138	6886	85	104	6175	7953	11	35
6139	6768	34	53	6176	8392	11	32
6139	6916	34	53	6177	7731	248	269
6140	7318	11	30	6177	8279	242	263
6141	7778	11	33	6178	7826	11	32
6142	8179	11	30	6179	6882	39	62
6143	6721	11	30	6179	7344	11	34
6143	8019	11	30	6179	7584	39	62
6144	7322	147	169	6179	7695	39	62
6145	7395	42	62	6179	8117	38	61
6146	7815	72	92	6180	7767	11	32
6147	8237	96	117	6180	7789	11	32
6148	7412	35	56	6180	7926	11	32
6149	6932	11	34	6181	7472	11	30
6150	6719	37	61	6182	8389	70	89
6150	6940	37	61	6183	7370	11	31
6150	7361	37	61	6183	7878	11	31
6150	8267	38	62	6184	6794	71	93
6150	8286	37	61	6185	6697	11	31
6151	7605	11	35	6185	7337	11	31
6152	7378	37	60	6185	8294	11	31
6152	8366	11	34	6186	7881	43	62
6153	6771	11	31	6187	7777	11	33
6154	7112	11	32	6188	6890	11	34
6189	7179	174	197	6218	7387	51	71
6190	6898	11	34	6218	7419	51	71
6191	7451	11	34	6218	7518	11	31
6192	7594	11	34	6218	7527	51	71
6193	7136	59	79	6218	7795	11	31
6193	8373	59	79	6218	7908	51	71
6193	8382	59	79	6218	7998	51	71
6194	8142	42	65	6218	8114	11	31
6195	6962	11	33	6218	8184	51	71
6195	6981	11	33	6218	8335	11	31
6195	7350	11	33	6219	8201	11	34
6195	7418	11	33	6220	7621	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6195	7536	11	33	6221	7098	11	31
6195	7537	11	33	6222	7847	47	68
6195	7538	11	33	6223	7896	33	53
6195	8391	11	33	6224	8051	11	34
6196	7114	100	121	6225	8231	49	72
6197	6776	104	123	6226	8036	10	33
6197	6810	104	123	6227	7448	41	64
6198	7198	11	32	6228	7990	1	24
6198	7222	11	32	6229	7684	137	160
6198	7924	51	72	6230	6737	11	34
6199	6689	72	93	6230	7155	11	34
6199	7342	72	93	6231	7473	11	34
6199	7498	72	93	6232	7024	44	63
6200	7236	11	31	6232	8010	43	62
6201	8052	11	34	6232	8329	44	63
6202	7235	11	35	6233	6908	41	60
6202	8162	11	35	6234	8274	40	63
6202	8169	11	35	6235	8136	11	30
6203	7320	11	34	6236	6726	137	160
6204	6980	11	31	6237	8110	11	34
6205	7123	11	30	6238	7884	38	59
6206	7559	304	325	6239	7995	11	30
6207	6950	43	62	6240	8000	46	69
6207	6987	43	62	6241	7751	11	34
6207	7858	11	30	6242	6702	11	30
6208	7493	11	33	6242	8331	11	30
6209	8240	203	222	6242	8397	11	30
6210	7011	11	34	6243	7054	75	95
6211	7982	37	57	6243	7346	75	95
6212	6758	11	30	6244	7050	11	34
6212	8304	11	30	6245	6855	71	90
6213	6777	45	68	6245	8370	71	90
6214	7052	40	59	6246	7900	84	106
6215	7137	46	68	6247	6846	112	135
6215	7139	47	69	6248	7579	47	68
6216	7382	11	30	6248	7734	47	68

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6217	6997	33	52	6249	7278	128	148
6218	7267	11	31	6250	7146	11	30
6251	7708	38	58	6288	7846	51	72
6252	7313	47	70	6289	7659	11	34
6253	6699	11	34	6290	7405	47	70
6254	7199	72	93	6290	7955	47	70
6255	6868	49	69	6290	7960	47	70
6255	7362	49	69	6291	7651	36	55
6255	7604	49	69	6291	7904	61	80
6256	7977	39	62	6292	8168	52	73
6257	8302	11	31	6293	7743	11	30
6258	8196	11	31	6294	7519	11	32
6259	7108	11	34	6295	7238	11	30
6260	8243	236	259	6295	7385	11	30
6261	7284	11	32	6295	7903	11	30
6261	7746	11	32	6296	7159	11	30
6262	7349	38	58	6297	7214	11	31
6262	7402	11	31	6298	8297	42	62
6263	7261	33	55	6299	7886	44	63
6263	7629	34	56	6300	6936	170	189
6263	8309	33	55	6301	8118	134	156
6264	7189	11	34	6302	8177	376	397
6265	6899	11	34	6303	7776	11	34
6266	6889	33	52	6304	7081	40	61
6267	6937	11	35	6305	7348	42	65
6268	7455	11	31	6306	7586	59	82
6269	6796	11	31	6307	6963	112	132
6269	7656	11	31	6308	6805	11	35
6270	6897	78	102	6308	7257	11	35
6271	7102	35	55	6309	7332	83	102
6271	8197	35	55	6310	7825	237	260
6272	6825	86	109	6311	7333	11	34
6272	7090	86	109	6311	7334	11	34
6273	7961	53	75	6312	6802	11	35
6274	8044	54	74	6312	6925	11	35
6275	7077	34	55	6312	7080	11	35

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6276	7203	95	116	6312	7592	11	35
6277	7478	71	91	6312	7596	11	35
6278	7494	177	200	6312	7600	11	35
6278	7999	11	34	6312	7639	11	35
6279	7870	11	34	6312	7699	11	35
6280	7877	11	34	6312	7702	11	35
6281	7505	11	34	6312	7733	11	35
6281	7533	11	34	6312	7842	11	35
6281	7534	11	34	6312	7923	11	35
6282	7325	82	103	6312	8081	11	35
6283	7694	190	209	6312	8093	11	35
6284	6994	31	51	6312	8183	11	35
6284	8061	31	51	6313	6808	11	31
6285	6887	48	70	6313	6828	11	31
6286	7456	141	164	6314	7065	11	32
6287	7489	46	67	6314	7066	11	32
6314	7067	11	32	6357	7315	11	31
6314	8388	11	32	6358	6751	196	215
6315	7425	213	234	6359	6759	11	31
6316	7509	11	34	6360	8206	200	222
6317	7416	11	30	6360	8351	200	222
6318	7788	92	111	6361	7609	11	31
6319	6891	34	54	6362	7492	11	32
6319	7169	151	171	6363	8371	350	374
6320	6753	79	99	6364	6927	116	135
6321	7250	31	51	6365	7104	230	251
6322	6806	52	75	6366	7255	11	31
6323	8319	305	325	6367	7126	64	83
6324	7365	55	75	6368	7980	11	33
6325	7131	11	34	6369	7602	11	32
6326	7764	38	57	6370	7854	11	33
6327	6922	11	30	6371	8157	11	31
6328	8018	141	160	6372	7570	136	156
6329	7742	98	117	6373	7343	52	71
6330	7187	11	31	6374	8002	11	30
6331	6969	70	93	6374	8022	11	30

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6332	7391	62	85	6375	6746	43	63
6333	8402	236	258	6375	7004	43	63
6334	7898	37	60	6375	7157	11	31
6335	7426	11	32	6375	7384	43	63
6336	7366	217	236	6375	7939	43	63
6337	6888	11	34	6375	8374	11	31
6338	7486	189	211	6376	7987	11	32
6339	6953	11	32	6377	7471	11	33
6339	7925	11	32	6377	7480	52	74
6340	8165	11	32	6377	7689	51	73
6341	6839	11	33	6378	7111	11	34
6342	7079	242	262	6379	7097	167	187
6343	7289	11	31	6379	7662	11	31
6343	7852	11	31	6380	7701	11	30
6344	7750	11	31	6381	7974	95	118
6345	7657	10	30	6382	7062	62	85
6345	8251	11	31	6383	8220	69	91
6346	7107	11	33	6384	7347	40	60
6347	7180	240	262	6384	8223	40	60
6347	8219	236	258	6385	7113	40	64
6348	7800	11	30	6385	7164	40	64
6349	8288	218	237	6385	7729	11	35
6350	6954	11	30	6386	6982	58	78
6351	6985	43	66	6387	7083	65	89
6352	7624	48	68	6387	7946	70	94
6353	7269	11	31	6387	8316	71	95
6354	7007	11	33	6388	7645	11	34
6355	6961	208	228	6389	6896	11	35
6355	8265	208	228	6390	7071	35	55
6356	6691	11	34	6390	7084	35	55
6391	6801	48	72	6426	7976	389	412
6392	7722	11	30	6427	8037	49	73
6393	7582	219	242	6428	7916	11	30
6394	7172	240	262	6429	8342	33	54
6395	8405	11	34	6430	7531	11	31
6396	7949	65	87	6431	7830	3	25

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6397	8401	82	103	6432	7411	133	155
6398	8097	37	59	6433	6965	45	64
6399	6701	47	70	6433	7449	46	65
6400	7075	11	32	6433	7562	45	64
6401	7298	11	34	6433	8033	11	30
6402	8059	35	56	6434	7791	155	176
6403	7301	11	30	6435	7516	134	157
6403	8256	11	30	6436	7389	69	89
6404	7120	30	50	6437	8334	76	96
6405	7258	11	33	6438	7147	11	30
6406	7263	11	31	6438	7147	54	73
6407	8003	11	34	6438	8269	11	30
6408	6876	11	31	6439	7272	11	30
6409	6914	11	31	6439	8271	11	30
6409	7938	11	31	6440	8227	52	75
6410	6779	32	52	6441	7636	11	34
6410	7364	32	52	6442	7593	11	34
6411	7043	11	32	6442	7593	67	90
6411	7797	11	32	6442	8381	11	34
6412	6883	11	30	6442	8381	67	90
6413	6733	46	68	6443	7818	46	69
6414	7467	81	101	6443	8077	44	67
6415	7422	11	31	6444	7676	11	34
6415	7766	11	31	6444	7808	11	34
6416	7148	34	53	6445	7420	11	31
6417	7661	11	33	6446	6814	138	157
6418	6757	11	31	6447	6728	202	222
6418	7468	11	31	6447	7368	201	221
6419	6834	37	56	6448	7535	11	34
6420	6851	11	35	6449	6822	1	24
6420	6971	11	35	6449	7513	11	34
6420	7311	11	35	6450	8249	47	70
6420	7374	11	35	6451	7056	11	34
6420	7626	11	35	6452	7309	98	119
6420	7784	11	35	6453	7299	32	51
6420	7799	11	35	6453	7623	26	45

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6420	8313	11	35	6454	8104	71	93
6420	8338	11	35	6455	7291	51	72
6421	7017	215	238	6455	7292	51	72
6422	7053	125	148	6456	7658	31	50
6422	7185	11	34	6457	7099	11	34
6423	8325	11	30	6457	8132	11	34
6424	7757	11	30	6457	8139	11	34
6425	7211	32	52	6458	8258	11	30
6459	6841	60	84	6490	6857	11	34
6460	6901	51	72	6490	7376	11	34
6461	8082	11	30	6490	8181	11	34
6462	7640	11	34	6491	6783	11	32
6463	7091	11	31	6491	7429	11	32
6464	8070	11	32	6491	7889	10	31
6465	7329	62	81	6491	8167	11	32
6465	7574	62	81	6492	7589	196	215
6465	7716	62	81	6493	7911	62	83
6465	7935	62	81	6494	7231	11	31
6465	8317	62	81	6495	7371	11	34
6465	8353	62	81	6496	6956	11	34
6465	8369	62	81	6496	8007	11	34
6466	7597	70	90	6497	8207	11	33
6467	7437	221	244	6498	7006	11	34
6467	7541	75	98	6499	7341	189	209
6468	6874	11	30	6500	7682	45	69
6468	6945	11	30	6501	7674	11	35
6468	7153	11	30	6501	7712	11	35
6469	7803	192	213	6502	7008	11	33
6470	7940	11	34	6503	7465	170	191
6470	7940	67	90	6504	7022	11	30
6471	6727	11	32	6505	6920	47	66
6471	6913	11	32	6505	8311	47	66
6472	7432	2	23	6506	7304	60	79
6473	7345	11	31	6507	6785	92	111
6474	7703	62	85	6507	8105	29	48
6475	7969	30	49	6507	8134	28	47

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6476	7130	35	57	6508	7542	71	94
6477	7162	251	272	6509	6714	41	64
6478	7201	74	98	6509	7894	41	64
6478	7413	11	35	6509	7959	42	65
6478	7421	74	98	6510	7761	186	209
6478	7452	74	98	6511	7603	250	273
6478	7567	74	98	6512	7254	11	30
6478	7963	74	98	6513	7497	240	262
6479	7952	11	30	6514	7445	41	60
6480	7128	68	92	6515	7200	169	189
6481	7610	11	34	6515	7280	169	189
6482	8121	11	32	6515	7649	169	189
6483	7506	11	32	6516	6973	11	32
6483	7787	11	32	6516	7327	11	32
6483	7901	11	32	6516	7957	11	32
6484	8318	42	63	6517	8014	41	63
6484	8346	42	63	6518	7942	81	104
6485	7372	11	34	6519	7186	11	30
6486	7369	11	35	6520	7464	61	84
6487	7805	87	106	6521	7687	11	32
6488	6915	36	59	6522	6988	11	30
6489	7444	60	82	6523	6843	11	30
6524	7013	11	32	6559	7876	120	143
6525	6844	11	32	6560	7282	90	112
6525	8188	11	32	6560	7283	185	207
6525	8320	11	32	6561	6979	11	34
6526	7328	143	164	6561	7219	11	34
6527	6799	11	32	6562	7215	35	58
6528	7271	11	32	6563	6695	11	34
6529	7242	11	32	6563	6743	57	80
6530	8138	11	34	6563	6835	11	34
6531	6742	11	30	6563	7070	57	80
6532	7399	11	31	6563	7453	11	34
6533	7607	176	195	6563	7724	11	34
6534	7171	3	22	6563	7740	11	34
6535	7029	41	62	6563	7741	11	34

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6535	7176	41	62	6563	7824	11	34
6535	7195	41	62	6563	8086	57	80
6535	7196	11	32	6563	8140	57	80
6535	8101	108	129	6563	8321	11	34
6536	7424	11	31	6564	6706	11	30
6537	6811	11	34	6565	6755	101	122
6538	7917	11	32	6565	6797	100	121
6539	7039	11	32	6565	7725	101	122
6539	7244	11	32	6565	8191	101	122
6539	7647	11	32	6566	7002	11	35
6540	8324	174	197	6567	8280	11	34
6541	6933	11	34	6568	7212	61	80
6542	6704	11	33	6569	7023	11	31
6542	6773	11	33	6569	7693	11	31
6542	7160	11	33	6569	7994	11	31
6542	7970	11	33	6569	8160	11	31
6543	6946	11	31	6569	8161	11	31
6544	7229	11	30	6570	8323	11	32
6544	8361	11	30	6571	8322	84	107
6545	7151	11	32	6572	7307	11	34
6546	7260	3	24	6573	7796	11	34
6547	7561	11	32	6574	7683	11	34
6548	8190	11	31	6575	6803	195	215
6548	8218	11	31	6576	7967	11	33
6549	8072	11	34	6577	7557	55	78
6550	7563	34	57	6578	7403	2	23
6551	8226	11	31	6579	6996	11	34
6552	6747	11	34	6579	7415	46	69
6553	7827	11	30	6579	7714	11	34
6554	6871	86	107	6580	8238	11	35
6554	7783	86	107	6581	6700	11	33
6555	7598	11	34	6582	6696	35	55
6556	7941	9	29	6583	7103	11	34
6556	8060	9	29	6584	7161	34	54
6557	7479	8	30	6585	8242	11	33
6558	7861	11	34	6586	7433	100	123

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6587	7386	11	30	6628	7548	38	58
6588	8332	95	118	6629	7739	11	32
6589	8224	11	31	6629	8252	11	32
6590	7019	11	32	6630	8261	11	32
6590	8277	11	32	6630	8295	204	225
6591	7094	11	31	6631	7578	57	78
6592	7785	11	33	6632	7047	41	60
6593	7792	211	234	6632	7234	41	60
6594	7951	11	30	6632	7522	41	60
6595	7560	39	59	6633	7221	11	31
6596	6903	219	240	6634	7482	11	32
6597	6939	11	30	6634	8068	11	32
6598	6800	11	34	6635	8005	11	33
6599	8379	41	65	6636	8137	50	73
6600	6999	11	30	6637	6842	11	31
6600	7690	11	30	6638	6813	31	51
6601	6717	11	34	6638	7286	31	51
6601	7679	11	34	6638	8006	31	51
6602	7409	224	244	6639	6745	11	31
6603	8212	34	53	6639	7241	11	31
6604	7615	11	32	6639	7454	4	24
6604	7616	11	32	6640	7338	11	34
6604	7671	11	32	6641	7811	166	186
6604	7696	11	32	6642	8283	82	103
6605	6831	91	115	6643	6812	11	34
6605	8088	91	115	6644	8102	11	31
6606	8071	37	60	6645	6775	11	31
6607	6964	11	31	6646	7044	11	30
6608	8398	143	162	6647	6838	165	185
6609	8089	45	65	6648	6684	54	74
6610	8020	11	34	6649	7048	196	219
6611	8299	11	31	6650	7794	78	99
6612	6692	130	153	6651	8216	86	106
6612	6872	130	153	6652	8009	226	246
6613	6928	41	64	6653	6740	11	31
6614	7145	11	35	6653	7149	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6615	7758	71	90	6653	8126	11	31
6616	7711	172	195	6653	8395	11	31
6617	8073	79	102	6654	7281	7	30
6618	6711	104	125	6655	7096	11	31
6619	6782	42	61	6655	7993	11	31
6620	7251	41	61	6656	7339	187	210
6621	7770	11	30	6657	6788	11	31
6622	7943	61	85	6657	6926	106	126
6623	7837	33	52	6657	7856	45	65
6624	6761	11	31	6657	8055	94	114
6625	8262	11	32	6658	8380	43	66
6626	7122	52	75	6659	6735	207	227
6627	6729	11	32	6659	7276	125	145
6627	7178	11	32	6659	7553	11	31
6660	6712	34	57	8424	8619	30	50
6661	7523	11	35	8425	8717	11	32
6662	8106	44	67	8426	8639	11	31
6663	6688	115	136	8427	8573	146	166
6664	7929	6	29	8428	8684	376	396
6665	6744	11	34	8429	8650	158	177
6666	8232	208	228	8430	8568	11	32
6667	8028	48	70	8430	8576	11	32
6668	7032	174	195	8430	8664	11	32
6669	8400	11	34	8431	8600	11	33
6670	8069	39	62	8432	8718	699	719
6671	7540	11	32	8433	8723	11	31
6672	7058	11	34	8434	8561	11	33
6673	8015	73	96	8435	8729	62	84
6674	6917	11	34	8436	8635	11	34
6675	6715	61	81	8437	8678	36	57
6675	6960	61	81	8438	8694	45	68
6675	7228	61	81	8439	8589	11	31
6676	6966	11	34	8440	8631	80	100
6677	7863	84	107	8441	8685	11	31
6678	7404	98	121	8442	8616	67	87
6678	7973	11	34	8443	8574	11	31

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
6678	8173	11	34	8444	8581	11	32
6679	7174	11	32	8445	8712	57	78
6680	8300	11	31	8446	8659	61	81
6681	7831	41	64	8447	8567	11	31
6682	8234	240	263	8448	8632	75	96
6683	8113	11	32	8449	8643	53	73
6683	8372	11	32	8450	8677	176	196
8409	8604	11	31	8451	8690	11	31
8409	8626	11	31	8452	8687	11	33
8410	8649	11	31	8453	8585	11	34
8411	8660	104	123	8454	8599	11	31
8412	8674	11	30	8455	8665	11	30
8413	8655	11	31	8456	8647	208	228
8414	8671	129	149	8457	8668	184	204
8415	8594	70	90	8458	8722	64	84
8415	8740	70	90	8459	8666	11	32
8416	8713	11	31	8460	8610	11	33
8417	8648	129	149	8461	8570	217	240
8418	8562	11	30	8462	8636	11	30
8418	8588	11	30	8463	8692	164	184
8418	8592	70	89	8464	8719	242	261
8419	8579	11	31	8465	8691	58	78
8420	8571	70	90	8466	8607	11	30
8420	8634	75	95	8466	8622	11	30
8421	8584	11	31	8467	8680	11	31
8422	8572	99	118	8468	8653	11	31
8422	8590	76	95	8469	8708	167	187
8423	8612	11	30	8470	8706	11	35
8471	8583	115	135	8512	8728	79	99
8472	8564	99	118	8513	8679	152	172
8472	8566	101	120	8514	8642	11	30
8472	8577	101	120	8515	8601	118	138
8472	8645	94	113	8516	8736	63	82
8472	8658	101	120	8517	8633	11	31
8472	8661	94	113	8518	8701	11	30
8473	8595	11	35	8519	8700	42	62

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
8474	8725	11	31	8520	8623	11	30
8475	8670	96	119	8521	8630	11	30
8476	8596	11	30	8522	8682	176	199
8477	8615	638	658	8523	8646	11	32
8478	8704	11	34	8524	8602	11	31
8479	8625	57	81	8525	8724	11	30
8480	8731	84	104	8526	8716	115	134
8481	8608	11	30	8527	8669	39	60
8482	8733	11	34	8528	8688	11	30
8483	8672	227	250	8529	8627	11	31
8484	8624	11	33	8530	8689	93	117
8485	8703	117	140	8530	8734	92	116
8486	8667	11	30	8531	8673	11	31
8487	8621	40	59	8532	8705	151	172
8488	8580	11	34	8533	8698	11	31
8489	8618	11	32	8534	8629	11	32
8490	8644	53	74	8535	8613	376	395
8491	8720	11	31	8536	8609	11	31
8492	8628	46	69	8537	8741	67	86
8493	8686	11	32	8538	8578	11	31
8494	8697	49	68	8538	8654	11	31
8495	8732	55	74	8539	8597	126	146
8496	8614	122	144	8540	8598	155	174
8497	8591	53	73	8541	8582	11	32
8498	8652	11	32	8542	8587	61	81
8499	8693	60	80	8543	8707	166	186
8500	8651	8	27	8544	8637	64	84
8501	8663	11	31	8544	8638	64	84
8502	8586	11	31	8544	8699	64	84
8503	8739	11	30	8545	8641	73	93
8504	8605	187	210	8546	8726	64	85
8504	8737	185	208	8547	8715	11	31
8505	8657	77	99	8548	8575	11	31
8506	8711	11	31	8549	8620	11	32
8507	8702	11	30	8550	8603	11	31
8508	8727	11	31	8551	8735	158	178

(continuación)

ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi		ARNmi SEQ ID NO.	pre-ARNmi SEQ ID NO.	Posición del nucleótido del ARNmi en el pre-ARNmi	
		desde	hasta			desde	hasta
8509	8617	130	149	8552	8681	75	95
8509	8640	231	250	8553	8676	11	31
8510	8709	149	168	8553	8730	11	31
8511	8565	60	80	8554	8683	11	31
8512	8593	79	99	8555	8675	100	120
8512	8721	79	99	8556	8611	76	96
8556	8662	76	96	8558	8714	11	32
8556	8695	76	96	8559	8563	11	30
8556	8710	76	96	8559	8606	11	30
8557	8656	355	375	8559	8738	11	30
8558	8696	11	32	8560	8569	11	32

El microARN y sus precursores y promotores, especialmente los que tienen un patrón de expresión diferencial entre condiciones de agua suficiente y agua insuficiente (sequía o estrés hídrico), son útiles en los rasgos deseables diseñados mediante ingeniería genética (por ejemplo rendimiento aumentado, germinación mejorada) en cultivos que pueden experimentar estrés hídrico. Se encontró una utilidad similar en otros miARN (y sus precursores o promotores) que tienen patrones de expresión específicos para otras condiciones de estrés abiótico o biótico por ejemplo, miARN que tiene un patrón de expresión diferencial entre condiciones de nutrientes suficientes y nutrientes insuficientes, o entre condiciones estresadas térmicamente y no estresadas térmicamente. Los procedimientos adecuados incluyen la introducción de un sitio de reconocimiento de un miARN exógeno en una secuencia, la delección o modificación de un sitio de reconocimiento de un miARN endógeno a partir de una secuencia, el diseño mediante ingeniería genética de una secuencia de un miARN natural o un miARN precursor a fin de reconocer una secuencia diferente de la secuencia diana endógena, y el uso de un miARN promotor para proporcionar un patrón de expresión concreto.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe la identificación de un miARN de plantas de cultivo (miRMON18) que tiene un patrón de expresión específico caracterizado por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o una fuerte expresión en condiciones de fósforo suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de fósforo.

Los ARN pequeños se clonaron y se identificaron los presuntos miARN a partir de una variedad de tejidos y estadios de desarrollo en arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare), maíz (*Zea mays* var. LH244), y soja (*Glycine max* var. A3525), según las técnicas anteriormente descritas en los Ejemplos 1 y 5. Las abundancias del ARN pequeño se normalizaron entre las bibliotecas y se calcularon como transcritos por cuarto de millón de secuencias (tpq). Un miARN maduro presunto (ARN pequeño número 370903, al que se asignó el nombre común "miRMON18") con la secuencia UUAGAUGACCAUCAGCAAACA se identificó en bibliotecas de ARN pequeño de arroz (**SEQ ID NO. 393**), maíz (**SEQ ID NO. 3227**), y soja (**SEQ ID NO. 8742**). Esta secuencia no se emparejó con ningún miARN conocido en miRBase.

Se identificó una secuencia precursora de miRMON18 a partir del genoma del arroz como CCAUGAACCUGUUUUGUUGCUGGUCAUCUAGCUACCCGUGCAUGCCUGGAGAUU GGAGAAUAAUUGACGAUGCAGCAGUCGGCUUAAUUGGCUCUUGGGCACGCGUGGU UAGAUGACCAUCAGCAAACAAGUUCGUGAG, (**SEQ ID NO. 1763, Figura 7B**). Se identificó otra presunta secuencia precursora de miRMON18 a partir de los datos genómicos disponibles del maíz como CUCCGAACCUGUUUUGUUGGUGGUCAUUUAACCAUGCAUGCUUCGAUCGAUGGA UUGGUGCAUGCAUGGAUUUUGCAUAGUGUGAUGCAUGGCGCAUCAGUGCAU GGUUGAUGACCAUCAGCAAACAUGUUCUUGAG (**SEQ ID NO. 3936, Figura 7A**). La posición del miRMON18 maduro se ha representado anteriormente en texto subrayado en estas secuencias del precursor (**SEQ ID NO. 1763 y la SEQ ID NO. 3936**). Se predijo que cada miRMON18 precursor formaba una estructura replegada (**Figura 7A y 7B**), con el miARN maduro (miRMON18) situado en el brazo 3' de la estructura replegada, con el miARN* previsto ("miRMON18*") situado en el brazo 5'; esto era consistente con la abundancia mucho mayor del miRMON18 maduro

con respecto a la del miRMON18* observada en el locus simple MRT4577_378723C.3 del maíz. Una estructura replegada que tiene la secuencia UGCAACCCUUGAAUGUGUUUGUUGAUUGAUUACACAUGUUGAUCAUCCUUGUGUUGAUUGGUUUU AGAUGACCAUCAACAAACUCUUUCGUGGUUUUGCA (**SEQ ID NO. 8743, Figura 7C**) se identificó en *Arabidopsis thaliana* como el precursor de un miARN maduro relacionado con la secuencia UUAGAUGACCAUCAACAAACU (miR827, **SEQ ID NO. 8744**). El miR827 maduro se observó solamente en baja abundancia en *Arabidopsis thaliana*. La alineación de dos miARN maduros muestra que el miR827 difiere de miRMON18 en dos nucleótidos (**Figura 7D**). Esta diferencia en dos nucleótidos entre miRMON18 y miR827 parece estar conservada entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, donde miRMON18 se ha identificado en maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, no se muestran los datos) y miR827 se ha identificado en dicotiledóneas (*Arabidopsis thaliana*).

Las transferencias Northern comprobaron la expresión del miRMON18 de 21-mer en muestras de tejido de al menos el arroz (grano y semilla) y maíz (almendra, hoja, y raíz) procedentes de plantas en condiciones normales de crecimiento (sin estrés), como se representa gráficamente en la **Figura 8A**. Los microARN precursores originados como transcritos poliadenilados generados por la ARN polimerasa II y un perfil de transcripción convencional del miRMON18 precursor del maíz (**SEQ ID NO. 3936**, correspondiente al probeset A1ZM068928_at) confirmaron adicionalmente una expresión elevada en endospermo, callo, y plántulas de maíz **Figura 8B**), donde la expresión en otros tejidos de esta muestra está por debajo del umbral de detección de 500 unidades.

La expresión del miRMON18 precursor del maíz (**SEQ ID NO. 3936**) se analizó en tejidos de maíz procedentes de plantas crecidas en condiciones deficientes en agua (sequía) (**Figura 9A**), condiciones frías (**Figura 9B**), y condiciones deficientes en nitrógeno (**Figura 9C**). La expresión del miRMON18 precursor se vio poco afectada, relativamente, por las condiciones del agua en la raíz, brote, mazorca, almendra, y estambre, donde la expresión en hojas y tallo aumentó en condiciones de deficiencia de agua con respecto a las condiciones de agua suficiente (**Figura 9A**); la expresión también se vio poco afectada, relativamente, por la temperatura (**Figura 9B**). Sin embargo, la expresión de miRMON18 fue muy sensible a las condiciones del nitrógeno, observándose una supresión de aproximadamente 2 veces en limitación de nitrógeno (nitrato de amonio 2 milimolar), con respecto a la expresión observada con suficiente nitrógeno (nitrato de amonio 20 milimolar) (**Figura 9C**). Este patrón de expresión sensible al nitrógeno se comprobó mediante cuantificación de imagen de fósforo en las transferencias Northern de muestras de ARN pequeño, que mostraron una supresión promedio de 9,6 veces en el miRMON18 maduro de 21-mer en 3 puntos temporales (**Figura 10A**). De este modo, miRMON18 mostró una expresión global mejorada en endospermo y almendra de maíz, y una fuerte supresión en hojas inducida por la deficiencia en nitrógeno.

En otro experimento, se hizo crecer el maíz en un sistema hidropónico con fosfato suficiente hasta el estadio V3, a continuación, se privó de fosfato durante un máximo de 3 días. Se tomaron muestras de tejido foliar a 1 y 3 días después de haber comenzado la privación de fosfato. A los 3 días, las plantas volvieron a la suficiencia de nitrógeno, y se recuperaron las muestras tomadas a los 30 minutos y 6 horas. Se tomaron muestras de control para cada punto temporal de plantas crecidas de forma continua bajo suficiencia de fosfato. La **Figura 10B** representa gráficamente los resultados de las transferencias Northern analizadas con una sonda de miRMON18 y demuestran que, en este experimento, el miARN miRMON18 maduro mostró en el tejido foliar una expresión intensa en condiciones de suficiente fosfato, y una supresión en condiciones de deficiencia de fosfato.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la identificación de genes que tienen sitios de reconocimiento de miARN (sitios de reconocimiento de miRMON18) regulados de forma natural mediante un miARN de plantas de cultivo (miRMON18) que tiene un patrón de expresión caracterizado por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o una fuerte expresión en condiciones de fosfato suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de fosfato.

Las dianas presuntas del miRMON18 maduro (UUAGAUGACCAUCAGCAAACA, **SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**) se identificaron y se incluyó un clado de genes en la familia del dominio ("SYG1/Pho81/XPR1"). Se asignó al dominio SPX el identificador de familia/dominio de proteínas Pfam PF03105, y se trata de un dominio hidrófobo descubierto en el extremo N de varias proteínas, que incluye, de forma típica, un tramo de aproximadamente 180 restos con tres subdominios más pequeños de 35-47 aminoácidos; véanse, por ejemplo, la entrada SPX de la base de datos Pfam actualmente conservada en el Janelia Farms Research Campus del Howard Hughes Medical Institute, disponibles para el público en pfam.janelia.org/family?acc=PF03105.

La mayoría de las proteínas en la familia del dominio SPX incluye otros dominios conservados en su extremo C. Por ejemplo, varias proteínas de la familia del dominio SPX incluyen también, en su extremo C, un dominio EXS ("ERD1, XPR1, y SYG1"), Pfam PF03124, que está posiblemente implicado en la clasificación de proteínas; véanse, por ejemplo, pfam.janelia.org/family?acc=PF03124. Otras proteínas SPX incluyen un dominio conservado VTC (chaperona del transportador vacuolar 2), Pfam PF09359; véanse, por ejemplo, pfam.janelia.org/family?acc=PF09359. Varias proteínas SPX incluyen un dominio conservado MFS_1 o MFS ("superfamilia del facilitador mayor"), Pfam PF07690, que está implicado en el transporte de pequeños solutos tales como azúcares pequeños y sales inorgánicas en respuesta a gradientes iónicos quimiosmóticos; véase

pfam.janelia.org/family?acc=PF07690. Es probable que el dominio SPX sea un factor de transcripción, y puede funcionar como un dominio de dimerización.

Las proteínas SPX incluyen las codificadas por los genes PHO, que están implicadas en la carga de fosfato inorgánico en el xilema de las raíces; véanse, por ejemplo, Wang y col. (2004) *Plant Physiol.*, 135:400-411, que han descrito la identificación de varios homólogos de PHO1, la conservación del dominio SPX en estas proteínas, y la expresión predominante del promotor de PHO1 en los tejidos vasculares de raíces, hojas, tallos, o flores, así como en algunos tejidos no vasculares. Las proteínas de la familia del dominio SPX están posiblemente implicadas en la transducción de la señal asociada a la proteína G (y, por tanto, son posiblemente sensores de fosfato inorgánico); véase Ticconi y Abel (2004) *Trends Plant Sci.*, 9:548-555. Los genes PHO1 incluyen tanto el dominio SPX como un dominio EXS. Los miembros del clado PHO también incluyen un dominio RING (At1g02860 y At2g38920), o un dominio MFS (At4g22990, At4g11810, y At1g63010); véase Wang y col. (2004) *Plant Physiol.*, 135:400-411, especialmente la Figura 3 y la Figura 6d.

Recientemente, se ha notificado que un gen denominado NLA es necesario para la adaptación a una baja disponibilidad de nitrógeno en *Arabidopsis thaliana*; véase Peng y col., (2007) *Plant Cell*, 50:320-337. NLA ("AtNLA", locus At1g02860), que tiene asignado el número de registro UniProtKB/Swiss-Prot Q2V4F9, tiene la secuencia de MRT3702_101115C, **SEQ ID NO. 8745**; la anotación de la proteína NLA está disponible para el público en beta.uniprot.org/uniprot/Q2V4F9 and at pfam.janelia.org/protein?id=Q94C80_ARATH. El gen NLA de *Arabidopsis* que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8745** contiene un dominio SPX, un dominio MFS_1, y un dominio RING, e incluye la secuencia de un sitio de reconocimiento de miR827 (diana) TGTGTGTTGATGGTCATCTAA (**SEQ ID NO. 8746**) situado en las posiciones de los nucleótidos de 135 a 155, que se validó como diana para miR827 de *Arabidopsis*. El NLA codifica una ubiquitina ligasa dedo de cinc RING de tipo C3HC4 (AT1G02860.1, **SEQ ID NO. 8747**); la mutación de este gen perturba la adaptabilidad de *Arabidopsis* a la limitación de nitrógeno.

Se secuenciaron diez clones adicionales del gen AtNLA. Los clones 1, 4, y 5 contenían una secuencia parcial AtNLA (**SEQ ID NO. 8748**). El clon 2 contenía una secuencia AtNLA que carece del dominio SPX (**SEQ ID NO. 8749**). El clon 3 contenía una secuencia AtNLA que carece del dominio RING (**SEQ ID NO. 8750**). El clon 6 contenía un fragmento genómico AtNLA (**SEQ ID NO. 8751**) con un sitio de reconocimiento de miR827 perturbado (secuencia diana) situado en las posiciones de nucleótidos 2142 - 2162. El clon 7 contenía otra secuencia AtNLA (At1g63010, **SEQ ID NO. 8752**). El clon 8 contenía otro fragmento genómico AtNLA (At1g63010, **SEQ ID NO. 8753**) con un sitio de reconocimiento de miR827 perturbado (secuencia diana) situado en las posiciones de nucleótidos 2142 - 2162. El clon 9 contenía otra secuencia AtNLA (At1g63010, **SEQ ID NO. 8754**) que carece del dominio SPX. El clon 10 contenía una secuencia AtNLA (At1g63010, **SEQ ID NO. 8755**) que carece del dominio MFS.

Se ensamblaron numerosos ADNc "virtuales" a partir de las secuencias genómicas y de ADNc del maíz, que describen genes independientes dianas de miRMON18. La primera de estas novedosas dianas de miRMON18 ("SPX_MFS_117961287", derivada de BAC en Gl:117961287) tenía la secuencia de la **SEQ ID NO. 8756** e incluía un codón de inicio ATG en las posiciones de nucleótidos 326 - 328 y un codón de detención TGA en las posiciones de nucleótidos 2414 - 2416; el marco de lectura abierto más largo (marco de traducción = 2) codificado por **SEQ ID NO. 8756** tenía la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 8757**. Una versión de corte y empalme alternativo de esta primera novedosa diana génica de miRMON18 es la **SEQ ID NO. 8758** ("SPX_MFS_117961287_2"), que incluye un codón de inicio ATG en las posiciones de nucleótidos 87 - 89 y un codón de terminación TGA en las posiciones de nucleótidos 1137 - 1139; el marco de lectura abierto más largo (marco de traducción = 3) codificado por **SEQ ID NO. 8758** tenía la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 8759**.

La segunda de estas dianas novedosas de miRMON18 tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8760** ("SPX_MFS2", derivada de BAC en Gl:118200525) e incluyó un codón de inicio ATG en las posiciones de nucleótidos 201 - 203 y un codón de terminación TGA en las posiciones de nucleótidos 2295-2297; el marco de lectura abierto más largo (marco de traducción = 3) codificado por **SEQ ID NO. 8760** tenía la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 8761**. Una versión de corte y empalme alternativo de esta segunda novedosa diana génica de miRMON18 es la **SEQ ID NO. 8762** ("SPX_MFS_117961287_2"), que incluye un codón de inicio ATG en las posiciones de nucleótidos 145 - 147 y un codón de terminación TGA en las posiciones de nucleótidos 1189 - 1191; el marco de lectura abierto más largo (marco de traducción = 1) codificado por **SEQ ID NO. 8762** tenía la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO. 8763**.

Una tercera diana de miRMON18 novedosa incluyó secuencias de ADNc reunidas procedentes de datos EST y que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8764** (derivada de BAC en Gl: 126116193) e incluyó dos posibles codones de inicio ATG en las posiciones de nucleótidos 217 - 219 y 1034 - 1036 y un codón de terminación TGA en las posiciones de nucleótidos 2093 - 2095. Se predijeron dos proteínas para los dos posibles marcos de lectura abiertos por homología; la primera proteína (prevista con un desplazamiento de marco de 1) contenía 625 aminoácidos y tenía la secuencia de la **SEQ ID NO. 8765**, y la segunda proteína contenía 353 aminoácidos y tenía la secuencia de la **SEQ ID NO. 8766**.

Los péptidos codificados por estos novedosos genes diana de miRMON18 del maíz se alinearon usando ClustalW (versión 1.82); la alineación resultante de los múltiples alineamientos de secuencia se representa gráficamente en la **Figura 11**, y muestra el dominio SPX del maíz (indicado por la secuencia subrayada), cuando está presente) y el

dominio MFS de maíz (indicado por una secuencia en texto en negrita).

5 El trabajo de clonación adicional derivado de BAC115312385 confirmó la secuencia de la primera diana de miRMON18 ("SPX_MFS_117961287", **SEQ ID NO. 8756**) y proporcionó la secuencia genómica SPX_MFS2 **SEQ ID NO. 8767** en la que se identificó adicionalmente una secuencia líder (indicada por el texto en cursiva), intrones en 5' (indicados por el texto subrayado), exones (indicados por el texto en mayúsculas), y el sitio de reconocimiento de miRMON18 (situado en los nucleótidos 2628 - 2648 de la **SEQ ID NO. 8767** en indicados por el texto en mayúsculas y negrita):

gttacaaggcaatatttttglagaataaaatcftaaaggaaactcaactccacgaattggcacttgcattaaatcatattgtgggtctcttttagtt
gcattcftaagatggcggcaacaagatttcaagcactttttatctagtaccgcaatgcactggagataaataagaatccaaatatttttgata
accttgacactattttaaactcttctataagtacgaagtagttgatcaacaataaaaacgtatagatttcaacatttttgcgattgtaggatatatg
ttagcaaatattttaagcaaaaataatattttatctataatctctatatggattattctagattttggggaccctatataaaattagctatgagtattaac
acttgataaacttgcctagaalgtctcgatttctggggtctaccactacacctaactgagtttaacctgcaataaataattatctctgaaatcat
ttggagattttgactcaatttaaataggttagctactgtgtagtttaggtgaaccaggacaccaggtgaacacgagtcacatatgcatgcatgtg
tattgactcaateggccggcgacgctatgatggtgctagaaaatgtttatacggctgtgaaagggtgaacctgtgctgtgtcgcaacaata
tattgtttaactttgtttggcctgaactcctgggggcaacataagatataaaagatcgatatgcctttcatgattccgtcataalctcgaccgta
attaaggcccgtctatataaaacctttaagcaaatgttagtcatataataattattagttggattgatgaacaaataacaactatttatttaaga
ttaactaacttctcagttaaatttagtcaactatttagtttagagggttgaacatgttataagaacctaaccgggtctctcaacgttacaaaagc
tatcatatttgaacccccgtcatcggagcgcacacgttttattttgtctgttcatgtctatgctgagatactaaaattttgtgcacaagactacaag
gacgagagcacctaataaggtattaatcgggtatttcaaatccgtaagagttgggggtattggaagagattattagaatttttgacctgttaagat
ttaaacccacttaatttcttgcaacacatactgcaggtcctcagatagcaggcgcagtcgcgcagaccgcagagcggcgaatcgtgagaa
ggatcagaagtgttgttacttccgtacgggttagagcatctccaacaacgtgacctataaaaatgccctataatttgaaaatgagtattttat
agaatttagggcaccaacaaaacaccccgtccaacagtaaaagccccaaatctagattatagggcagcccactacgggtgtagtattttgag
tcacttgagagggtgccctatagtttttgacaaaattttatgaaatggagcactgttggagtagttttcctgtgtagagccctatatttcaattga
ggcactagtttgaggcattgttggagatgctcttacaatacacggaacatatttgggttcagcaacaggggacggacggacggcgcgccgt

gtctacagacttgcgcgtgcttctgcatctgttcgaaaaccgtaacccccgtgcaccgctggcagtagctgctgnttctgttctgttctgtt
 cgtcgcggcgatctcgaaccgatgaagcgtggcacttggctggltggltggltgacccgggcccagaaggtgacctgctcgaaccgaa
 taccatgcacgacgtgcctgttctcttctactccgattaccgatagtccgggcccgggaaaaagagcgcgaagccagatctga
 ccactaggggtctgttgggtgttctctcgcgaacctggctgtgtgagccaggatcactggagcctggcctgaaagatacgaaccaatctgc
 tctgtatctggtgagccgtggcccaaggtgctttaaggatcgtgcgagctgtgattcaaatctacatgcagacaaccaaacacagagctcgcac
 gcgcatagcttggctcatagcaaccaaacagcagctaccgcacccgcgacgcaagcacgcgcagatgcaggcaaccaaacagacc
 cagggtgacccaggtcgtgaatgtccacgcgaaccgcagccgcgagtgccgtctccggctccgccacaggtagagctcagagcagaaa
 atgctccagccacctgtctcttcttctctctctgcccgtgcacgcggctataagtaccaccgccatctcactttgccagcagcagggca
 gtagctgcgccattgcacgcctccggccggcggtgcttgtctgtcttctgcccacacccgtgatccgtacgtctcacctcaccactc
 acgcacaagcacaaagagcgttaatttctgtgagattctattctattctatggcgtgtccctgacgaatctaaatctaaacctctgtgg
 tgcactgcagggcagaaggtgcttctgttcgttcagggcctggcgccacgccgtaccgtgcaagcg**CGTTTGCTGATGTTT**
ATCTAAttactgtataataatctcgggcgaaagagctagcaatcgtcggcgggggaggggggctcgattgctgctcaagg
gagttgtaattccttggctctggatttccctatctgttggctgttcatggatcatccaatggatggatggcgtccctgttctctacacctgcgtgc
tcttctccctcgcctcggcggttctgtcagttactgtatccctgttgaattttaaatacgaagaagcaacaacaaaagatgattcaaaaa
aalattcaaaallgaaggaccacaatgcgtgtgctactcgtatgctaccattagagcatgccttactgcattcttcttcttctgttacgagtg
cttaatctcatggctcgtcccttaattctgctaccattagagcatcttcaatactttctaaaaaaaccacttgacaaactaatgaaatcagttg
gtaaactaataagtttcacgagtgactaaaaaaagataggagctagcttctagtcctagataatgctcttatgagcttcttctgtccagttgtcc
caactccaacgaacaaaaaaaggtgaagaaaacacatttggccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
aaaaagagagcttgaattgcgagcgagataccaccgttacagggaaaaaaaagacaagttgttcaagttcttactagcttcttagcgcttc
cgtgtcgttctagatgagcttctctagcaaaaggacaataatttgggtgccacgtcagatgtcgactcagtgctatttctaccagctggcttatca
acttgggagattattgtctcgcacctggaccgggtgtccagtcatttattaatgatgttgatccatcttctgtatttttcttggcaagaaactgttag
tattaaagtactgtcaccttggaaagctgaatctccctcgaagatacagtalggcatatagccatccgttcttatacacagctatttacgtcta
ttttacaattttatattcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
accgtccagtgataatgctttagctgactaagaagtagcgtctccgggttctttaaataatttattgtctaatatttatttttaaaataaaacatgataa
ataaaaaagaacggagtgagtagaatacattgtgagctgttgttgggttgttgcacattcttacttgttttttttacgaacatttgttgaagc
agcaaaagccgtataaaccttgcagctctagatagcgaatttttaacaaaaaccttaataattagatttggagcattgatttagaaagctgagca
actccaatgggagaggtgttattttctcgtccatccacatccgccgttggcccggttgttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
ggtaaccgaccagcgttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
ccggacctgacgcgcgcgtgctcggcgcaaggaatggggccttcggcttacccttgcacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ctgtgtgttctcgcgttgccttcagccgtagccggcgccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
ccgccccacactggattgggaaggccgctgacccacgcacctgcccgtgcccagtggttgaagggttgggaaatgagatgttgaatt
taagctgactttttaggggtttagcttacagctttttaaataatcttcgaccaacgggttgaattccgtgtttagaggtgaattactcgattcagaa
gtttaaagtttcttaattlaagctaaagggaagagatggagcgccgtggttgaattggccgcacgcagctgggaagaagatctgaaaa
cactgtcgtccatgtattgattcacttaaacatttgcctgtatctattattttaaatttttataatctacggtcacagaatgtccgtgttgttgtgaa

tagaaaacactgaacaatgattgtgagtcacagctatcattatgtgttttggtgtgcgagggfataactaatgtctaagattggctaaacctt
 agtcttacatcgctgtcttcccttgcgctgtagggcaaggcaaccaccaattgggtaaaagcatataagcaggcctaccgatcaataataataa
 aaaagggtagctttcaagaagtctgcttatgtaataccattatcttcttttttacctcgaaggagtataatcaccaaaatagcattatattgtca
 tcatcggctgcactatcttttctctgtaacatgccgtctaattatattcttcagtttcagactcagttatttgaacatcaagATGGTTA
 ATTCGGAAAGAAATTGATGGCTGATCAAGTGGACGAATGGAAAGGGtatgactttcttttgg
 tacttatgaaatcatctatctttatctatcagggcaaatgtctttatcttcatatatgccactccactagtcactaggatacattagaacaccata
 ccgtagtatcaccatatcacagtccttactatcattatctggttaattttataaataaacaataatctagcagttatcgaattgatagggtgca
 ctacaataatgaagtcacttcccgtaatgcaagctaattgacactttgtttaacggttatcagaaatcttatcagctttttggctttccatttctaga
 tactacatcaattacaagaatcttatcagctttttggctttccatttctAGATACTACATCAATTACAAGCTGATGA
 AGAAAATGTTAAAGCAATATGTCCAACAAACCCAACATGATGAGAAAGATCGCGAA
 CAAGTTCTTAAAGACTTTTCAAGGTTTCTTGATGAccaggtatacaaaagaagatttcccttgaaatgatca
 taatatatgattttgagcatcatctatctctgtcagtagtcacttgtatcttctgtaaggaaacagaacagtgatgcgacaagcttaataatgcttagt
 gaattgggatcattttcttagttgtgagctaaaatacacatgtatttcttctgtCCAGATTGAAAGGATTGTGCTTTTTTC
 TGCTACAACAACAAGGCCATCTTGCCAGTAGGATTGAGAAATTGGCAGAAAAACGC
 ACTGCTCTTCTGGAAGAGTATGACATATCACAAGTTTATCAGCTGCATGATGCATAC
 AGGGAAGTCGGGCTTGATCTCATAAAGCTTCTCCGCTTTGTTGATGTGAATGCTACT
 GGTATACGCAAGATACTAAAGAAATTTGATAAACGCTTTGGCTACAAGTTCACTGAT
 TATTATGTCACCACTCGTGCAAATCATCCTTATTCTCAGCTTCAGCAAGTATTTAAGC
 AAGTGGtaattttcatgcattttgcattttcttcttctgatgtgtgaagtaattcccagttacattattatcatggactcatcaggtgcagg
 GAATTGTAGCTGTTGTAGGTGCATTATCGCGCAACCTTGAATATCTGCAGCATCATG
 AAGGAAGCTTTGTATCCATCTATGATCGTCCAGCAGTTACCTTGAaggtattctattttcactattcc
 attctcatttcagaaattctgctattgaatttataaalgaaaaccttgaaaggtgcttttcttacctcggaaactgcataattatattccacatgaa
 gtaggggtgtgacatgacactttttgtgttatattcAGGACCCTATTATAGACCAAGTAAACCATGCAGTAC
 AGAAACTCACGCATGCCACGAATTTTATGCAATTCTTGGGACAGCACGCGCTTATTG
 TCCAGGAAGATGCAGAAAGCGAGTCGGAGGATCTTGTGGTGATCAGAGCTACCAT
 TTCATGTCCCTGGTGCTTAATCTAGTGAACACATTCTTTACATGGTGAATACATATA
 TCATTGTGCCGACTGCAGATGACTATGCAGTAAGCCTTGGGGCTCCTGCAACTGTAT
 GTGGTATAATTATTGGATCGATGGCAGTCGCCCAAGTATTCTCCTCAGTCTACTTCA
 GTGCCTGGTCAAATAAGTCCTACTTCAAACCTCTTGTGTTTCACTAGCATTATGCTGTT
 TCTTGGAACCTACTGTATGCATTGGCATATGATCTGAATTCATAATAGTTCTCCTG
 ACTGGACGACTGCTATGTGGGTatgcaattttctcaattcactctatctcacttgatttacgttccacttttgatgctagcatt
 gatctgggtgaaaattactagtagtagcaaatgcaggttgaggatccctaagctgagggcaatattctagaatatttatattgctgaatagaaaac
 aaaatggaaactgtatatcttacaaggagataaaggattttaaalctcgagactggcattaaaalatalgcttttctatttctttatagaacttaact
 agttatccctacctccctttgggctagtaatttgcctatattgtttaagggtcttgattttctgacgggtgcatctgtgatcgagctgccagcatgtaat

gtgcaggT TAGGTTCTGCAAGAGCAGTGAACCGTCGCTATATCAGTGACTGTGTGCCTCT
CAAGATGAGGCTACAAGCCTCTGCCGGGTTCTGTTAGTGCTAGCGCTCTTGGCATGGC
ATGTGGCCCTGCTCTTGCTGGTTTTCTCCAGATTAAATTCAAGATATACTCGCTCAGT
TTTAATCAGAGCACATTGCCTGGATGGGTTCATGTGCATTTCTTGGCTTATTTACTTAT
TGTGGTTGTGGCTTACATTCAAGGAACCAGAACACTTCACTAAAACCTCTGGTCAATG
AACAGCCGTCAGAATCTGGTaaagtaacaatacactgaaatggcaacatgtttgtttgaattcatgaatatgctcgaatcaa
acctattgtacaatcaggatgtgtatgcttalcattcttaggaactttctgagatgtttatttcttattatgaaaataggCCGCCAAGGA
AATTCTAACTTGGAGGCAGGTCTAGCTGAACCATTTGCTTCAAGGTATAGAACGAAG
GCAGGATGAGAACTCAGAAGTTAATGATGATACTGAAGTAGAGTCAGAAAGCTCTC
ATGAACCAGCAACATCAATTGCTTCAGCATAACAGATTGCTAACTCCATCTGTGAAGG
tttcttccccctcccttcccaattatcgattttcttctgtcttcttggttcaaacgttgaaagaaagaagctcacaatctacataggggtcttttg
taataaagttagataaattaactatataataataaaactgcatctttaaataagtaatgggtaaatacattccagttactagtaggtacatctgca
tgtcatacaagcaaacataacggacacgccatgtaaagaaactaggccaacctaggagaaactaggttgcatttattattatattattattaag
atgaaaataggcaccacaaatttaccttgacaaggactgaaacctagggtgtctgggtttacgagcacaccttgaccaagttagcttagctca
gttcccttgacacaccagccagatgaaaagttgcatgtgcagctaccccttttccacgcccttttcatcttccaatcttgttgagctaccttct
catgtattcatactttaaataaagttgttgcAGGCCCAGCTACTGATATACTTCATGCTCAAGTACGC
AATGGAAATACTACTATCAGAATCGAGCGTTGTCACCACATACTATTTTAGCTGGTC
TACAAGTGCTGTGGCTATCTTTCTAGCGATTCTTGGATTAAACGGTTCTTCCAGTAAAT
GCCATTGTTGGAAGCTACGTTACAAATTTATTCGAGGATAGGtaagctttgtactcttcaaaaacata
ctacatgaaacttttatattctctagacattgttttctcttaaactgagacatgctttcacaataaagaacttgcctctatcttgcaggCAAA
TTTTGTTGGCATCTGAAGTCATGGTTCTCATCGGTATAATCATGAGCTTTTGTTCAC
ACCTCACTACTCCATCCCGCAATATGTTCTTTTCAGCTTTTCATCACATTTGTATTTGCT
GAGGTGCTTGAaggtatgtatgtttatatacatlaaatgglttgagacagcgaaacctaaatcaatcatacgtgctgatttatcagcca
ctcaacttctaacctcgagctatgcAGGAGTGAATCTGTCTTGTCTCTCACGAGTAATGTCATCGAG
GCTTTCCCGAGGGACCTACAATGGTGGACTCCTTTTCGACAGAGGCCGGGACGTTGG
CCCGTGTAGTTGCAGATGCCACGATTACTGCAGCCGGTTATCTCGGCACGGACCTCC
TTCTGAATGTCACTCTTCTCCCATCCCTTGTGATTTGCATAGTCTCCATCGCAGCAGC
ACTCTACACTTACAACAATCTCTATTGAagctattgttgcgtgacaagtgacaacaatgttctaagctaaaatgtt
cctgcccacaacgggttgglatatctgttcaagcatggttggtaaacattttgatcaagttgtatgcaaaatttctgtatttagtcatttatgtaa
gattcatcctgtaagaattataaactatgagacgctattgccatttatgatcatttatgtttatcttttagccttatgttattgaattgtctaatcaat
gccatcttccatcacgagcacatcattgacatattactgatggatagaccttttgggacgtgagatgctaaaggcacacacatatactgtaa
aatttcaacatattatcaataataccaagatgcccttgggtttatcaattgcacattattcaacgtaaatgcaatttggtaaatatgicalgggtg
cgagcctactgcttaccacagcatgttgaaattgctgccttaagcagaacatcgaaaaacctgcgtagattccacgatccaacaatcctctcc
gttcatttttttagttccatgaaaggaccgattacgtctgaaagaagagtttcattagacaatctatttcttttaactaatgcctctagttttcaaa

acctatgcaataaataggtgtaactatagttttgactaaggggtgtaatctctttgtaaaatatttatgcaatctcgatttcaaatctatccactagcc
taacaactaataagataaaacatacaaccaagatacataatataaatacgggagcttaaatacgatatacataaactcttattgatgactcca
ttgtttttatcgagataccaagaaagacgcaagtttctccctagtcctcattggagcccagtcgogcgagtagccaagctctcggtcaggtaac
attgtggatagcctaggttttttggccacacacaagtgggtcttttagttagcctcttctaaatgctctctatcaaaggtgggtccaggaaaagattc
aaaatggggccctagcagtagtagtattactactaacaacaataatgataaataagtaaatgctcaatgtgcataaaattgatctaagaagtagt
tgtaaaactcatgtaattgtgtaaaacttattgtcttattctttatgtttcttttctcacatccgaacagattccttctagaggacatgattgtaagttaa
aaataaaatagaacactaattaaalcaaagctatcgctacttgcctgagttacaaaattattaaatctatttataaaatactaccaattatgctgactt
ccaaattatcaacaattgaatagattacaaaataatatttaataatagattacaaaatactactacaaaattcacaaaacaatttgtctagtttag
taattattcaaaactatagttgtacatagtaatttaatttggctttggtttagaccctcgcccttgggtgaacgacgaacaacgaggtatcctatgtgta
gtcatgtatgatgcgtctaggatgtagatgcagtgccagtgccaatcctcagtccttcacgaatcaggatgaacatatggagggtggggccct
cgcggaataggggggactagggla (SEQ ID NO. 8767).

Se realizó una búsqueda en las bases de datos de transcritos TIGR para el dominio SPX:MFS que codifica las
secuencias de los genes SPX. La identificación de dichos genes respalda la existencia de una ruta de regulación
conservada en las plantas superiores. Se descubrieron presuntos sitios diana de miRMON18 mediante la búsqueda
de una secuencia conservada complementaria de miRMON18 en la región 5' no traducida del codón de inicio. Se
identificó una presunta diana de miRMON18 (TGA40434_29760) en uvas (*Vitis vinifera*) con la secuencia de la **SEQ**
ID NO. 8768, con el sitio de reconocimiento de miRMON18 situado en los nucleótidos 323 - 343 de la **SEQ ID NO.**
8768. De manera similar, se identificó una diana de miRMON18 (TA5852_4236) en lechugas (*Lactuca sativa*) con la
secuencia, **SEQ ID NO. 8769**, con el sitio de reconocimiento de miRMON18 situado en los nucleótidos 64 - 84 de la
SEQ ID NO. 8769.

Los genes ortólogos que contienen el dominio SPX que incluyen genes análogos a NLA se identificaron e diversas
especies entre las que se incluyen maíz, arroz, y soja. Donde la secuencia está disponible, se identificaron las
secuencias diana presuntas de miRMON18 o miR827 (sitios de reconocimiento) en la 5'UTR. La **Figura 12**
representa gráficamente el árbol filogenético construido para identificar los genes SPX identificados usando las
secuencias de aminoácidos alineadas mediante ClustalW, donde los valores de arranque se determinaron usando
10000 iteraciones; los genes que contienen un sitio de reconocimiento de miRMON18 previsto (en genes de
especies diferentes de *Arabidopsis thaliana*) o un sitio de reconocimiento de miR827 previsto (en genes de
Arabidopsis thaliana) que se ha validado experimentalmente se indican en texto en negrita. Además del AtNLA del
gen NLA de *Arabidopsis thaliana* que contiene los dominios SPX y RING (MRT3702_101115C, At1g02860, **SEQ ID**
NO. 8770, que incluye un sitio de reconocimiento de miR827 en los nucleótidos 135 - 155, y que codifica la proteína
con la secuencia de la **SEQ ID NO. 8771**), los genes incluidos en el árbol filogenético son el gen análogo a NLA del
maíz ZmNLA (**SEQ ID NO. 8772**, que codifica la proteína que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8773**), el gen
análogo a NLA de la soja GmNLA (**SEQ ID NO. 8774**, que codifica la proteína que tiene la secuencia de la **SEQ ID**
NO. 8775), el gen análogo a NLA del arroz OsNLA (**SEQ ID NO. 8776**, que codifica la proteína que tiene la
secuencia de la **SEQ ID NO. 8777**); las secuencias de *Arabidopsis* At1g63010 (**SEQ ID NO. 8778**, que incluye un
sitio de reconocimiento de miR827 en los nucleótidos 153 - 173, y que codifica la proteína con la secuencia de la
SEQ ID NO. 8779), AT2g26660 (**SEQ ID NO. 8780**, que codifica la proteína que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO.**
8781), y AT5g20150 (**SEQ ID NO. 8782**, que codifica la proteína que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8783**); las
secuencias de arroz Os02g45520 (**SEQ ID NO. 8784**, que incluye un sitio de reconocimiento de miRMON18 en los
nucleótidos 395 - 415, y que codifica la proteína con la secuencia de la **SEQ ID NO. 8785**) y Os04g48390 (**SEQ ID**
NO. 8786, que incluye un sitio de reconocimiento de miRMON18 en los nucleótidos 334 - 354, y que codifica la
proteína con la secuencia de la **SEQ ID NO. 8787**); y las secuencias de maíz MRT4577_36529C (**SEQ ID NO. 8788**,
que incluye un sitio de reconocimiento de miRMON18 en los nucleótidos 1660 - 1680, y que codifica la proteína con
la secuencia de la **SEQ ID NO. 8789**), MRT4577_51705C (**SEQ ID NO. 8790**, que codifica la proteína que tiene la
secuencia de la **SEQ ID NO. 8791**), MRT4577_375264C (**SEQ ID NO. 8792**, que codifica la proteína que tiene la
secuencia de la **SEQ ID NO. 8793**), MRT4577_46983C (**SEQ ID NO. 8794**, que codifica la proteína que tiene la
secuencia de la **SEQ ID NO. 8795**), MRT4577_340665C (**SEQ ID NO. 8796**, que codifica la proteína que tiene la
secuencia de la **SEQ ID NO. 8797**), y MRT4577_319995C (**SEQ ID NO. 8798**, que codifica la proteína que tiene la
secuencia de la **SEQ ID NO. 8799**).

Varias kilobases de secuencia estaban disponibles en dirección 3' de la secuencia de codificación análogas a NLA
del maíz y arroz, en las cuales no se identificó un sitio diana de miRMON18 en un trabajo de secuenciación
preliminar. Basándose en los datos de perfil de expresión, parece que el nivel de ARN de ZmNLA (**SEQ ID NO.**
8772) no responde a la disponibilidad de nitrógeno. Por el contrario, el clado del dominio SPX-MFS (**SEQ ID NO.**

8788, SEQ ID NO. 8786, SEQ ID NO. 8784, y la SEQ ID NO. 8778) mostrados en la Figura 12 está suprimido en condiciones de nitrógeno suficientes en maíz y en *Arabidopsis* y se predice que está regulado por miRMON18; las secuencias de este clado contienen un sitio de reconocimiento de miRMON18 (o miR827) validado experimentalmente. El clado SPX mostrado en la parte superior del árbol (SEQ ID NO. 8798, SEQ ID NO. 8796, SEQ ID NO. 8794, SEQ ID NO. 8782, SEQ ID NO. 8780, SEQ ID NO. 8792, y la SEQ ID NO. 8790) (Figura 12) contiene solamente un dominio SPX identificable, está suprimido por una limitación de nitrógeno, y también se prevé que esté regulado por miRMON18. En el maíz, los datos TxP que corresponden a los genes del clado 1 (SEQ ID NO. 8798, SEQ ID NO. 8796, SEQ ID NO. 8794, SEQ ID NO. 8792, y la SEQ ID NO. 8780) se correlacionaron con la expresión del miRMON18 precursor; la expresión tanto del miRMON18 precursor como de los genes del clado 1 estuvo regulada en exceso en condiciones de nitrógeno suficientes. Los genes del clado 2 de SPX-MFS (SEQ ID NO. 8788, SEQ ID NO. 8786, SEQ ID NO. 8784, y la SEQ ID NO. 8778) quedaron suprimidos directamente por miRMON18, mientras que los genes del clado 1 carecen de diana directa, lo que sugiere que miRMON18 puede regular indirectamente la expresión de los genes del clado 1 mediante la supresión de los genes del clado 2.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe la identificación de un miARN de plantas de cultivo (miRMON18) que tiene un patrón de expresión caracterizado por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o una fuerte expresión en condiciones de fosfato suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de fosfato.

La caracterización adicional del gen miRMON18 del maíz implicó el emparejamiento BLAST de un miRMON18 precursor (SEQ ID NO. 3936) con bibliotecas de ADNc y elementos de micromatriz, y la clonación mediante PCR inversa de una secuencia genómica de miRMON18 (SEQ ID NO. 8800) del maíz (*Zea mays* var. LH244) usando los cebadores de PCR inversa basados en una secuencia de ADNc (SEQ ID NO. 8801) del clon LIB5025-018-A1-XP1-B6. Esta secuencia genómica de miRMON18 (SEQ ID NO. 8800) tiene la secuencia anotada representada gráficamente en la Figura 13, donde el transcrito de miRMON18 se proporciona en mayúsculas en los nucleótidos 2173 - 2788 de la SEQ ID NO. 8800. Esta secuencia genómica también incluyó un elemento promotor de miRMON18 en minúsculas en los nucleótidos 211 - 2172 de la SEQ ID NO. 8800, un elemento líder en minúscula en los nucleótidos 2173 - 2308 de la SEQ ID NO. 8800, una secuencia TATA convencional (que finaliza en los 25 nucleótidos en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción) en minúscula subrayada en los nucleótidos 2144 - 2147 de la SEQ ID NO. 8800, el miRMON18 maduro como texto en mayúscula subrayado en los nucleótidos en los nucleótidos 2419 - 2439 de la SEQ ID NO. 8800, y el miRMON18* como texto en mayúscula subrayado en los nucleótidos 2322 - 2341 de la SEQ ID NO. 8800.

Para comprobar el patrón de expresión del promotor de miRMON18, dos construcciones de ADN recombinante (SEQ ID NO. 8802 y SEQ ID NO. 8803) se construyeron en un vector binario que incluyó 1 promotor de actina del arroz que impulsa la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) como marcador seleccionable. La construcción (SEQ ID NO. 8802) en el plásmido pMON111971 incluyó un promotor de miRMON18 (SEQ ID NO. 8804) y una secuencia líder de miRMON18 (SEQ ID NO. 8805) que impulsa la expresión de un gen GUS (SEQ ID NO. 8806) seguido por una secuencia de terminación NOS (SEQ ID NO. 8807). La construcción (SEQ ID NO. 8803) en el plásmido pMON111967 contenía un intrón DnaK (SEQ ID NO. 8808) y también incluyó un promotor de miRMON18 (SEQ ID NO. 8804), una secuencia líder de miRMON18 (SEQ ID NO. 8805), un gen GUS (SEQ ID NO. 8806) seguido por una secuencia de terminación NOS (SEQ ID NO. 8807). Los vectores se transformaron en maíz usando transformación mediada por *Agrobacterium* y selección con antibióticos usando técnicas convencionales, como las que se describen en el encabezado "Preparación y Utilización de células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales". Se observó una fuerte expresión de GUS impulsada por el promotor de miRMON18 en las hojas de maíz transformada en condiciones de nitrógeno suficientes y de fosfato suficientes. La expresión de GUS se suprimió en las hojas de maíz transformadas en condiciones de deficiencia de nitrógeno o de deficiencia de fosfato.

Una secuencia alternativa del promotor de miRMON18 de utilidad para impulsar la expresión de un transgén con el patrón de expresión del gen miRMON18 natural (es decir, fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficientes y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o fuerte expresión en condiciones de fosfato suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de fosfato) incluye el promotor que tiene la secuencia de nucleótidos 211 - 2172 de la SEQ ID NO. 8800; un fragmento de al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, o al menos 500 nucleótidos contiguos que tienen al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 98% de identidad con los nucleótidos 211 - 2172 de SEQ ID NO. 8800, en la que el fragmento tiene actividad del promotor en al menos un tejido vegetal que se caracteriza por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o la fuerte expresión en condiciones de fosfato suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de fosfato; y un fragmento de al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, o al menos 500 nucleótidos contiguos que tienen al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, o al menos un 98% de identidad con la SEQ ID NO. 8804, en la que el fragmento tiene actividad del promotor en al menos un tejido vegetal que se caracteriza por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o la

fuerte expresión en condiciones de fosfato suficiente y supresión en condiciones de deficiencia de fosfato. La identificación de las secuencias de promotor alternativas se confirmó por técnicas rutinarias, tales como la comprobación de una secuencia TATA dentro de la secuencia del promotor y la validación de la actividad del promotor en al menos un tejido vegetal (por ejemplo, analizando una construcción de ADN recombinante que incluye el promotor que impulsa la expresión de un gen indicador tal como GUS o luciferasa tanto en experimentos de expresión transitoria como en plantas transformadas de manera estable).

Ejemplo 9

Este ejemplo describe la identificación de sitios de reconocimiento de un miARN de plantas de cultivo (miRMON18) que tiene un patrón de expresión caracterizado por una fuerte expresión en condiciones de nitrógeno suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, o una fuerte expresión en condiciones de fosfato suficientes y de supresión en condiciones de deficiencia de fosfato. También se desvelan procedimientos para usar el miARN, el promotor de miARN, y un sitio de reconocimiento de miARN. Los ejemplos no limitantes incluyen un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénica no natural que tiene un rendimiento mejorado en condiciones de deficiencia de nitrógeno o fosfato, mediante la expresión en la planta de cultivo transgénica de una construcción de ADN recombinante que incluye un transgén insensible a miRMON18, y un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénica no natural que tiene un rendimiento mejorado en condiciones de deficiencia de nitrógeno o fosfato, mediante la expresión, en la planta de cultivo transgénica, de una construcción de ADN recombinante que incluye un sitio de reconocimiento de miRMON18 que se ha añadido a la secuencia de un gen que normalmente es insensible a miRMON18.

La predicción de un sitio de reconocimiento se logra usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como reglas de complementariedad de secuencia, tal como se describen por Zhang (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:W701-704 y por Rhoades y col. (2002) *Cell*, 110:513-520. Un procedimiento no limitante para validar de manera experimental sitios de reconocimiento de miARN previstos es la técnica conocida como amplificación rápida mediada por ARN ligasa de extremos 5' del ADNc ("5' RLM-RACE" o "5' RACE"), que identifica patrones de escisión de miARN; véanse, por ejemplo, Kasschau y col. (2003) *Dev. Cell*, 4:205-217, y Llave y col. (2002) *Science*, 297:2053-2056. Esta estrategia se basa en la ligadura de una molécula adaptadora de ARN al extremo 5' del sitio de escisión y es dependiente del fosfato 5' dejado por enzimas RNasa III, incluyendo Agol. Los productos resultantes de la PCR se secuencian, y el número relativo de clones que se alinean con el sitio de escisión previsto del miARN entre los nucleótidos 10 y 11 en relación al extremo 5' de miARN proporciona una estimación de la actividad de miARN. La Figura 14 representa gráficamente la escisión prevista por miRMON18 de las secuencias del arroz Os02g45520 (SEQ ID NO. 8784) y Os04g48390 (SEQ ID NO. 8786) y la secuencia del maíz MRT4577_36529C (SEQ ID NO. 8788). Los resultados de los ensayos 5' RLM-RACE se usaron para confirmar la escisión de los sitios de reconocimiento previstos para miRMON18 (sitios diana) en las secuencias de arroz Os02g45520 (SEQ ID NO. 8784) y Os04g48390 (SEQ ID NO. 8786), para las cuales 3 de 24 clones, y 13 de 16 clones, respectivamente, se habían secuenciado, y para las que se ha descubierto que tienen el patrón de escisión previsto (entre los nucleótidos 10 y 11 con respecto al extremo 5' de miRMON18). Los experimentos 5'-RACE también validaron parcialmente el sitio de reconocimiento de miRMON18 en la secuencia SPX_MFS2 del maíz SEQ ID NO. 8767 (no se muestran los datos).

Otro procedimiento no limitante para validar experimentalmente los sitios de reconocimiento de miARN previstos es examinar los niveles de expresión de la diana presunta, por ejemplo, mediante experimentos de perfil de transcripción. Se predice que el nivel de expresión de una diana auténtica de un miARN sería elevado cuando el miARN no se expresa, y bajo cuando el miARN se expresa. De este modo, se predice que una diana de miRMON18 tendría una expresión más alta cuando miRMON18 no se expresa (es decir, en condiciones de deficiencia de nitrógeno o de deficiencia de fosfato), y una baja expresión cuando miRMON18 se expresa (es decir, en condiciones de nitrógeno suficientes y de fosfato suficientes). La Figura 15B representa gráficamente los perfiles de expresión de la secuencia MRT4577_36529C del maíz (SEQ ID NO. 8788), que contiene un sitio de reconocimiento de miRMON18 previsto. MRT4577_36529C (SEQ ID NO. 8788) no se ve afectado por la disponibilidad de agua o la temperatura (sin diferencias importantes en los niveles del transcrito observados entre condiciones de agua suficiente o sequía o entre temperatura frías o normales; no se muestran los datos), pero mostró mayores niveles de expresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno que en condiciones suficientes de nitrógeno, es decir, un patrón de expresión opuesto al de miRMON18 como se muestra en la Figura 15A (véanse también la Figura 9 y la Figura 10), lo que indica que MRT4577_36529C (SEQ ID NO. 8788) está regulada ciertamente por miRMON18.

Estos datos verifican que miRMON18 regula los genes que contienen el dominio SPX conservado. La expresión de RMON18 se suprime durante la deficiencia de nitrógeno o la deficiencia de fosfato, permitiendo que los genes regulados por miRMON18 endógeno se expresen en estas condiciones. La manipulación de la expresión bien del miARN miRMON18 maduro o de las dianas de miRMON18 (genes que incluyen al menos un sitio de reconocimiento de miRMON18) es útil para alterar la respuesta de una planta a la deficiencia de nitrógeno o la deficiencia de fosfato.

Un aspecto de la presente invención incluye un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénica no natural que tiene un rendimiento mejorado en condiciones de deficiencia de nitrógeno o fosfato, mediante la expresión en la planta de cultivo transgénica de un gen insensible a miRMON18. Una realización es expresar en una planta de cultivo transgénica no natural una construcción de ADN recombinante que comprende una secuencia de un transgén sintético que no responde a miRMON18, en la que la secuencia de un transgén sintético que no

responde a miRMON18: (i) se deriva de una secuencia sensible a miRMON18 natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN miRMON18 comprendidos en la secuencia sensible a miRMON18 natural (es decir, eliminación o alteración de los nucleótidos de la secuencia natural sensible a miRMON18 que se reconoce por un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742** o mediante un miARN miRMON18 derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la **SEQ ID NO. 1763**, **SEQ ID NO. 3936**, y la **SEQ ID NO. 8800**), y (b) no se reconoce por un miARN miRMON18 maduro. En un ejemplo no limitante, el sitio de reconocimiento de miRMON18 en cualquiera de los genes que contienen el dominio SPX conservado representado gráficamente en la **Figura 12** se elimina o modifica de forma que el gen SPX modificado ya no reconoce ni se une a un miRMON18 maduro endógeno (**SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**) y, por tanto, queda desacoplado de la regulación de miRMON18 y, por tanto, de la influencia de la deficiencia de nitrógeno o de fósforo. En un ejemplo específico no limitante, el gen MRT4577_36529C del maíz (**SEQ ID NO. 8788**) se puede desacoplar de la regulación por miRMON18 y, por tanto, de la influencia de la deficiencia de nitrógeno o fósforo mediante la expresión de un gen MRT4577_36529C modificado cuyo sitio de reconocimiento de miRMON18 en su región no traducida 5' (nucleótidos 1660 - 1680 de la **SEQ ID NO. 8788**) se ha eliminado o modificado de tal forma que el gen MRT4577_36529C modificado ya no reconoce ni se une a un miRMON18 maduro (**SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**). El MRT4577_36529C modificado insensible a miRMON18 se expresa usando promotores constitutivos o específicos de tejido en el maíz, aumentando la captación de nutrientes y el uso en condiciones de nitrógeno suficientes y de fósforo suficientes y dando como resultado un rendimiento mejorado en condiciones normales y, preferentemente, también en condiciones de deficiencia de nitrógeno o de deficiencia de fósforo.

Como alternativa, el sitio de reconocimiento de miRMON18 se diseña mediante ingeniería genética dentro de los genes normalmente insensibles a miRMON18 que se deben suprimir en condiciones de nitrógeno suficientes y expresar durante las condiciones de deficiencia de nitrógeno; esto es un enfoque útil, por ejemplo, con un gen transportador de nitrógeno que proporciona un comportamiento o rendimiento mejorado cuando se expresa en condiciones de limitación de nitrógeno o fósforo, pero no proporciona beneficios cuando se expresa en condiciones no limitantes.

Ejemplo 10

Se describen a continuación ejemplos no limitantes adicionales de procedimientos y construcciones de ADN recombinante de utilidad en la mejora del uso del nitrógeno o fósforo basándose en la manipulación de la expresión génica de miRMON18 o el gen SPX.

(A) Modulación de la expresión del gen SPX para mejorar el uso de nitrógeno en condiciones limitantes. En esta realización, un gen diseñado mediante ingeniería genética que contenía el dominio SPX para que careciera de un sitio de reconocimiento de miRMON18 (o en *Arabidopsis thaliana*, un sitio de reconocimiento de miR827site) en la UTR en 5' UTR se expresó en plantas. El desacoplamiento del gen SPX del miRMON18 endógeno (o en *Arabidopsis thaliana*, miR827) en lo que respecta a la regulación, proporciona adaptación a la disponibilidad de nutrientes en condiciones de suficiente nitrógeno o fósforo, y da como resultado un aumento del rendimiento. Un resultado deseable para aumentar la expresión del clado SPX-MFS (**SEQ ID NO. 8788**, **SEQ ID NO. 8786**, **SEQ ID NO. 8784**, y la **SEQ ID NO. 8778**) (**Figura 12**) es el aumento del contenido de proteínas en al menos un tejido vegetal (tal como hojas, tallo, raíz, o semillas en condiciones de suficiente nitrógeno o fósforo mediante el aumento de la disponibilidad de nutrientes en los tejidos sumidero. Varios vectores (véase la **Tabla 7**) se evaluaron en *Arabidopsis thaliana* para modelar la función de los genes SPX.

El fenotipo previsto de la regulación en exceso de AtNLA (At1g02860, que contiene un dominio SPX-RING, **SEQ ID NO. 8745**) en una planta es una adaptación constitutiva a condiciones de bajo contenido en nitrógeno o bajo contenido en fósforo y mejora el transporte global y el uso de los nutrientes por la planta; se predice un fenotipo similar para la regulación en exceso de los genes relacionados del clado SPX-RING (**SEQ ID NO. 8772**, **SEQ ID NO. 8770**, **SEQ ID NO. 8774**, y la **SEQ ID NO. 8776**) (**Figura 12**). Los vectores con números del 1 al 5 son transcritos quiméricos que incluyen regiones no traducidas no dirigidas 5' y 3' y la región de codificación de AtNLA (**SEQ ID NO. 8745**); el vector número 6 incluye un fragmento genómico AtNLA (**SEQ ID NO. 8745**) que incluye la secuencia procedente del promotor endógeno AtNLA a través de la secuencia de terminación (para prevenir la expresión ectópica) pero donde el sitio de reconocimiento del miR827 natural se han eliminado o modificado para prevenir el reconocimiento por un miR827 maduro.

El fenotipo previsto de la regulación en exceso de los genes del clado SPX-MFS (**SEQ ID NO. 8788**, **SEQ ID NO. 8786**, **SEQ ID NO. 8784**, y la **SEQ ID NO. 8778**) (**Figura 12**) es un aumento en el transporte de nutrientes (especialmente nitrógeno y/o fósforo), especialmente de los tejidos fuente a los tejidos sumidero, dando como resultado un aumento del rendimiento. Los vectores números 7, 9, y 10 son transcritos quiméricos que incluyen regiones no traducidas no dirigidas 5' y 3' y la región de codificación de At1g63010 (**SEQ ID NO. 8778**); el vector número 8 incluye un fragmento genómico At1g63010 (**SEQ ID NO. 8778**) que incluye la secuencia procedente del promotor endógeno At1g63010 a través de la secuencia de terminación (para prevenir la expresión ectópica) pero donde el sitio de reconocimiento del miR827 natural se han eliminado o modificado para prevenir el reconocimiento por un miR827 maduro; el vector número 11 es un transcrito quimérico que incluye regiones no traducidas no dirigidas 5' y 3' y la región de codificación de Os04g48390 (**SEQ ID NO. 8786**); el vector número 12 incluye un

fragmento genómico Os04g48390 (**SEQ ID NO. 8786**) que incluye la secuencia procedente del promotor endógeno Os04g48390 a través de la secuencia de terminación (para prevenir la expresión ectópica) pero donde el sitio de reconocimiento del miRMON18 natural se han eliminado o modificado para prevenir el reconocimiento por un miRMON18 maduro (o, en *Arabidopsis thaliana*, por un miR827 maduro).

- 5 Los efectos de regular en exceso los genes del clado SPX de función no clasificada, pero cuya represión se predice en casos de baja disponibilidad de nitrógeno se evaluaron mediante la expresión de MRT4577_319995C (**SEQ ID NO. 8798**) con los vectores 13 - 15 (**Tabla 7**).

- 10 Se realizaron experimentos de expresión similares en el maíz. Los vectores (**Tabla 7**) que incluyen genes con un dominio SPX conservado (véase la **Figura 12**) se construyen y transforman en maíz. Las variantes de vectores incluyen un vector que incluye la secuencia genómica del gen SPX y los vectores que incluyen el ADNc clonado del gen SPX impulsado por el promotor natural. En ejemplos no limitantes, los vectores 16 -18 usan la secuencia de codificación derivada de MRT4577_36529C (**SEQ ID NO. 8788**), y tienen un sitio de reconocimiento miRMON18 perturbado, que permite la expresión del transgén solamente en condiciones de suficiente nitrógeno cuando se expresa el promotor natural. Una tercera construcción para expresar solamente el dominio MFS de MRT4577_36529C (**SEQ ID NO. 8788**), que representa una isoforma natural procedente de corte y empalme alternativo que carece de SPX, también se preparó y sometió a ensayo para determinar la asimilación de nitrógeno en el maíz.

Tabla 7

Vector n.º	Construcción*	Patrón de expresión previsto
1	35S:AtNLA	constitutivo
2	35S:AtNLA que carece del dominio SPX	constitutivo
3	35S:AtNLA que carece del dominio RING	constitutivo
4	FDA/PPDK:AtNLA	específico de hojas
5	RCc3:AtNLA	específico de raíz
6	promotor AtNLA:AtNLA con el sitio de reconocimiento de miR827 perturbado	expresión de AtNLA natural
7	35S:At1g63010	constitutivo
8	promotor At1g63010:At1g63010 con el sitio de reconocimiento de miR827 perturbado	expresión de At1g63010 natural
9	35S:At1g63010 que carece del dominio SPX	constitutivo
10	35S:At1g63010 que carece del dominio MFS	constitutivo
11	35S:Os04g48390	constitutivo
12	promotor Os04g48390:Os04g48390 con el sitio de reconocimiento de miRMON18 perturbado	
13	35S:MRT4577_319995C	constitutivo
14	FDA/PPDK: MRT4577_319995C	específico de hojas
15	RCc3: MRT4577_319995C	específico de raíz
16	ADNc del promotor ZmSPXMFS:ZmSPXMFS: Terminador ZmSPXMFS	
17	ADNg del promotor ZmSPXMFS:ZmSPXMFS: Terminador ZmSPXMFS	
18	ADNc del promotor ZmSPXMFS:ZmMFS: Terminador ZmSPXMFS	
*35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de 35S; FDA, promotor de la fructosa bifosfato aldolasa (promotor de la vaina del haz); PPDK, promotor de la piruvato orotofosfato diquinasa (promotor de células mesófilas); RCc3, promotor del gen RCc3 del arroz (promotor específico de la raíz)		

- 20 (B) Expresión génica bajo suficiente cantidad de nitrógeno usando un promotor de MIRMION18. En esta realización, se utiliza un promotor de miRMON18 para eliminar los fenotipos indeseables (tipos fuera de rango) resultantes de la expresión de transgenes en condiciones de limitación de nitrógeno. Por ejemplo, cuando el nitrógeno no limita la

expresión de la asparagina sintetasa, proporciona un fenotipo deseable con alto contenido en proteínas. EN condiciones limitadas de nitrógeno, la expresión en exceso de la asparagina sintetasa ocasiona una reducción del rendimiento. La expresión de la asparagina sintetasa impulsada por el promotor miRMON18 proporciona un fenotipo de alta producción de proteínas con suficiente disponibilidad de nitrógeno, pero en condiciones limitadas de nitrógeno, el transgén se desactiva evitando la penalización del rendimiento. Se construyeron vectores incluyendo el promotor de miRMON18 del maíz (**SEQ ID NO. 8804**), la secuencia líder de miRMON18 del maíz (**SEQ ID NO. 8805**), y una estructura replegada de miRMON18 fusionada con un gen de la asparagina sintetasa. Los ejemplos no limitantes de un gen de la asparagina sintetasa incluyen una asparagina sintetasa de soja (*Glycine max*) (**SEQ ID NO. 8809**), una asparagina sintetasa de *Galdieria sulphuraria* (**SEQ ID NO. 8810**), y una asparagina sintetasa de maíz (*Zea mays*) (**SEQ ID NO. 8811**). Estos vectores se transformaron en maíz, y el rendimiento y la calidad de las proteínas se evaluaron en las plantas de maíz transgénico resultante en condiciones de limitación de nitrógeno y nitrógeno suficiente.

(C) Supresión génica en condiciones de limitación de nitrógeno utilizando una secuencia del sitio de reconocimiento de miRMON18. Un ejemplo no limitante de esta realización es una construcción de ADN recombinante que incluye una unidad de transcripción de un transgén y un sitio de reconocimiento exógeno de miRMON18, en la que la expresión de la construcción de ADN recombinante en una planta da como resultado la expresión del transgén cuando el miARN miRMON18 maduro no se expresa. La 5'UTR de los genes que contienen el dominio SPX de las plantas superiores confiere la supresión de ARNm en condiciones de nitrógeno suficiente a través de la regulación realizada mediante un miRMON18 o miR827 maduro endógeno. En una realización no limitativa de la presente invención, la 5'UTR de un gen SPX regulado por miRMON18 o miR827, tales como, aunque no de forma limitativa, AtNLA (**SEQ ID NO. 8770**), At1g63010 (**SEQ ID NO. 8778**), Os02g45520 (**SEQ ID NO. 8784**), Os04g48390 (**SEQ ID NO. 8786**), y MRT4577_36529C (**SEQ ID NO. 8788**), se incorporan a la secuencia líder de una casete de expresión de un transgén. Esto da como resultado la supresión del transgén en condiciones de suficiente nitrógeno, independientemente de la secuencia promotora utilizada, para eliminar los tipos fuera de rango asociados con una expresión del transgén no regulada. En una realización preferida, la secuencia de 4 nucleótidos conservada AUG(G/U) presente en el sitio de escisión del sitio de reconocimiento de miRMON18 o miR827 se cambia a GUGG para prevenir el inicio no intencionado, a la vez que preserva el emparejamiento de bases en el ARNm maduro. Como alternativa, se incorporan sitios de reconocimiento miRMON18 o miR827 sintéticos a las regiones no traducidas, o dentro de la región codificante sin alterar la función de las proteínas, para conferir supresión en condiciones de suficiente nitrógeno.

En otro ejemplo, la 5' UTR de Os04g48390 (**SEQ ID NO. 8786**) se fusiona a GUS impulsada por un promotor constitutivo; conteniendo una versión la secuencia endógena del arroz que tiene AUG en el sitio de escisión de miRMON18, y se construye otra versión en la que el AUG del sitio de escisión de miRMON18 se ha modificado a GUG. Una tercera construcción, con sitios de reconocimiento en tándem (dos o más) sintéticos de miRMON18 introducidos en la 3' UTR también se sometió a evaluación. Estos vectores se evaluaron en plantas de maíz transformadas crecidas en condiciones de nutrientes (nitrógeno o fosfato) variables, y se analizaron varios tejidos para determinar la expresión de GUS.

(D) Expresión ectópica de MIRMION18 para limitar la expresión génica de SPX. En esta realización, la expresión de miRMON18 (o, en *Arabidopsis*, miR827) está impulsada por un promotor constitutivo o específico de tejido, que da como resultado la supresión de todos los genes regulados por miRMON18 (o regulados por miR827) tales como los genes SPX conservados. Un ejemplo no limitante incluye el vector pMON107261 (**Figura 16**), que incluye un promotor CaMV 35S que impulsa la expresión del transcrito miRMON18 de maíz (por ejemplo, los nucleótidos 2173 - 2788 de la **SEQ ID NO. 8800**). Se evaluaron los fenotipos de plantas de maíz transgénico y *Arabidopsis* transformadas con este vector, y las plantas mostraron rasgos mejorados, tales como un rendimiento aumentado en condiciones de limitación de nitrógeno o fosfato.

Ejemplo 11

Este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que incluye al menos una secuencia señuelo miARN que reconoce y se une a un miARN maduro endógeno pero que no se escinde. En una realización preferida de la presente invención, el miARN maduro endógeno es uno que es sensible al estrés por nutrientes, por ejemplo, un miARN maduro cuya expresión está bien regulada en exceso o regulada por defecto en condiciones de deficiencia de nutrientes, con respecto a la expresión con suficiencia de nutrientes. Más específicamente, este ejemplo describe secuencias señuelo de miARN para los miARN maduros (miR827, miRMON18, y miR399) que son sensibles al estrés por nutrientes.

Los **Ejemplos 6 - 10** describen dos miARN, miR827 (**SEQ ID NO. 8744**) y miRMON18 (**SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**) que presentan un patrón de expresión caracterizado por la regulación del miARN mediante el estrés por nutrientes (por ejemplo, supresión del miARN en condiciones de deficiencia de nitrógeno, deficiencia de fosfato, o deficiencia tanto de nitrógeno como de fosfato). Otro miARN, miR399, identificado en *Arabidopsis thaliana*, tiene la secuencia UGCCAAGGAGAGUUGCCUG (**SEQ ID NO. 8812**); se identificó un miARN idéntico mediante secuenciación de ARN pequeño en el maíz (**SEQ ID NO. 8813**) arroz (**SEQ ID NO. 8814**), y soja (**SEQ ID NO. 8815**).

Se descubrió que el gen miR399 del maíz era sensible a la disponibilidad de nitrógeno. Se identificaron los precursores de miR399 en bases de datos de ADNc patentadas, e incluyen la secuencia de ADNc Zm-miR399 ADNc (MRT4577_22484C.8) que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8816**, que contiene un precursor de Zm-miR399 (**SEQ ID NO. 8817**) en los nucleótidos 71- 175 de la **SEQ ID NO. 8816**, y otra secuencia de ADNc de Zm-miR399 (MRT4577_22487C.6) que tiene la secuencia de la **SEQ ID NO. 8818**, que contiene un precursor de Zm-miR399 (**SEQ ID NO. 8819**) en los nucleótidos 136 - 330 de la **SEQ ID NO. 8818**. Las estructuras replegadas de los precursores miR399 de maíz se representan gráficamente en la **Figura 17A**; la **Figura 17B** representa gráficamente los resultados de los experimentos de perfil de la transcripción con la sonda AlZM033468_at correspondiente al MRT4577_22487C.6 (**SEQ ID NO. 8818**), que demuestran que el Zm-miR399 pri-miARN (**SEQ ID NO. 8817**) está suprimido en condiciones deficientes de nitrógeno (barras negras) y se expresa en condiciones suficientes de nitrógeno (barras blancas).

En *Arabidopsis thaliana*, se ha notificado que miR399 es sensible a la disponibilidad de fosfato inorgánico y a la supresión de un clado de genes entre los que se incluyen el gen PHO2 de *Arabidopsis thaliana* (At2g33770, que codifica una E2 conjugasa) y presuntos ortólogos de PHO2 de varias plantas. La privación de fosfato inorgánico induce la expresión de miR399; la expresión en exceso de miR399 en condiciones de agotamiento de fosfato reprime la expresión de PHO2 y conduce a elevadas concentraciones de fosfato en las hojas. Véanse Fujii y col. (2005) Curr. Biol., 15: 2038-2043; Chiou y col. (2006) Plant Cell, 18:412-421; Aung y col. (2006) Plant Physiol. 141:1000-1011; y Bari y col. (2006) Plant Physiol., 141:988-999.

Se notificó que un motivo de 23 nucleótidos conservados descubierto en el transcrito IPS1 de *Arabidopsis thaliana* y en otros miembros de la familia de genes Mt4-TPSI tenía una secuencia complementaria de miR399 salvo por un bucle incorrectamente emparejado correspondiente a las posiciones 10 y 11 del miR399 maduro, que evita la escisión del dúplete miR399:IPS1; véase Franco-Zorrilla y col. (2007) Nature Genetics, 39:1033-1037. Una secuencia similar no escindible que también contiene emparejamientos incorrectos correspondientes a las posiciones 10 y 11 del miARN maduro se ha notificado para miR390; véase Axtell y col. (2006) Cell, 127:565-577.

Se desarrollaron reglas para predecir una "secuencia señuelo de microARN", es decir, una secuencia que puede reconocerse y unirse a un miARN maduro endógeno que da como resultado un emparejamiento de bases entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno, formando de este modo un dúplete de ARN resistente a la escisión que no se escinde debido a la presencia de emparejamientos incorrectos entre las secuencias señuelo de miARN y el miARN maduro. En general, estas reglas definen (1) los emparejamientos incorrectos necesarios, y (2) los emparejamientos incorrectos que se permiten pero que no son necesarios. Los emparejamientos incorrectos incluyen los emparejamientos incorrectos habituales (por ejemplo, G-A, C-U, C-A) así como el par oscilante G:U y los indeles (inserciones o deleciones de nucleótidos).

Los emparejamientos incorrectos necesarios incluyen: (a) al menos 1 emparejamiento incorrecto entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 del miARN maduro endógeno, o como alternativa, (b) 1, 2, 3, 4, o 5 inserciones (es decir, nucleótidos adicionales) en una posición de la secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 9, 10, u 11 del miARN maduro endógeno. En realizaciones preferidas, existe bien (a) al menos 1 emparejamiento incorrecto entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones 10 y/u 11 del miARN maduro endógeno, o (b) al menos 1 inserción en una posición de la secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 10 y/u 11 del miARN maduro endógeno.

Los emparejamientos incorrectos que se permiten, pero que no son necesarios, incluyen: (a) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 del miARN maduro endógeno, y (b) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre la secuencia señuelo de miARN y el miARN maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del miARN maduro endógeno (es decir, en la posición 21 de un miARN maduro de 21 nucleótidos), en el que cada uno de los emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del microARN maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario (es decir, de forma que no hay más de dos emparejamientos incorrectos contiguos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición del microARN maduro endógeno). En realizaciones preferidas, no existen emparejamientos incorrectos (es decir, todos los pares de bases son complementarios) en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 del miARN maduro endógeno.

Estas reglas se emplearon para identificar, a partir de bases de datos de ADNc patentadas, secuencias de maíz o soja que contienen secuencias señuelo de miARN endógeno. La **Tabla 8** proporciona secuencias señuelo de miARN endógeno del maíz (*Zea mays*) para miRMON18 (**SEQ ID NO. 393**, **SEQ ID NO. 3227**, o la **SEQ ID NO. 8742**); los emparejamientos incorrectos en la secuencia señuelo de miARN están indicados mediante un texto subrayado en la alineación entre el miARN y la secuencia señuelo de miARN.

Tabla 8

SEQ ID NO.	Secuencia señuelo de miRMON18	ADNc identificador del maíz y SEQ ID NO. (posición de nucleótidos de la secuencia señuelo de miARN codificada en el ADNc)	Alineación entre miRMON18 proporcionada en dirección 3' a 5' (anterior) y la secuencia señuelo de miARN proporcionada en dirección 5' a 3' (posterior)
8820	AGGUUGCUGAUGAAGUCAUCUAA	MRT4577_321885C.1 (SEQ ID NO. 8821) (182-204)	ACAAACGACUAC--CAGUAGAUU <u>AGGUUGCUGAUGA</u> <u>A</u> GUCAUCUAA
8822	UCUUUGCAGAGUGUCAUCUAA	MRT4577_531852C.2 (SEQ ID NO. 8823) (198-218)	ACAAACGACUACCAGUAGAUU <u>UCUUUGC</u> <u>A</u> <u>GAGU</u> GUCAUCUAA
8824	UGUUUGAUAGAGAUCAUCUAA	MRT4577_606578C.1 (SEQ ID NO. 8825) (65-85)	ACAAACGACUACCAGUAGAUU <u>UGUUUGA</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>GAG</u> AUCAUCUAA

La **Tabla 9** proporciona secuencias señuelo de miARN endógeno del maíz (*Zea mays*) para miR399 (**SEQ ID NO. 8812**, **SEQ ID NO. 8813**, **SEQ ID NO. 8814**, o la **SEQ ID NO. 8815**); los emparejamientos incorrectos en la secuencia señuelo de miARN están indicados mediante un texto subrayado en la alineación entre el miARN y la secuencia señuelo de miARN.

Tabla 9

SEQ ID NO.	Secuencia señuelo de miR399	ADNc identificador del maíz y SEQ ID NO. (posición de nucleótidos de la secuencia señuelo de miARN codificada en el ADNc)	Alineación entre miR399 proporcionada en dirección 3' a 5' (anterior) y la secuencia señuelo de miARN proporcionada en dirección 5' a 3' (posterior)
8826	UAGGGCAACUUGUAUCCUUUGGCA	MRT4577_47862C.7 (SEQ ID NO. 8827) (699-722)	GUCCCCGUUGAG---AGGAAACCGU UAGGGCAACUUGUAUCCUUUGGCA
8828	CAGGGCAAGUUGAAUCCUUUGGCA	MRT4577_36567C.8 (SEQ ID NO. 8829) (746-769)	GUCCCCGUUGAG---AGGAAACCGU CAGGGCAAGUUGAAUCCUUUGGCA
8830	UAGGGCAACUUGUAUCCUUUGGCA	MRT4577_52178C.1 (SEQ ID NO. 8831) (156-179)	GUCCCCGUUGAG---AGGAAACCGU UAGGGCAACUUGUAUCCUUUGGCA
8832	UAGGGCACCUUGUCUCCUUUGGCA	MRT4577_135578C.1 (SEQ ID NO. 8833) (185-208)	GUCCCCGUUGU---GAGGAAACCGU UAGGGCACCUUGUCUCCUUUGGCA

Se identificaron las secuencias señuelo miR399 del microARN en la hebra negativa de dos secuencias de ADNc (**SEQ ID NO. 8831** y **SEQ ID NO. 8833**). Un análisis de traducción en seis marcos de las secuencias de ADNc proporcionadas en la **Tabla 9** no revelaron ningún marco de lectura abierto largo, y las búsquedas BLAST de estas mismas secuencias no identificaron ninguna proteína en bases de datos públicas, lo que indica que es probable que estos genes sean secuencias no codificantes. La alineación de las secuencias de ADNc de maíz en las secuencias señuelo de miR399 se representa gráficamente en la **Figura 18**, con la secuencia de consenso proporcionada como la **SEQ ID NO. 8834**, y revela al menos dos grupos de genes que contienen las secuencias señuelo de miR399: el primer grupo contiene los genes estrechamente relacionados MRT4577_47862C.7 (**SEQ ID NO. 8827**), MRT4577_521786C.1 (**SEQ ID NO. 8831**), y MRT4577_135578C.1 (**SEQ ID NO. 8833**), y el segundo grupo contiene MRT4577_36567C.8 (**SEQ ID NO. 8829**). Solamente había una diferencia de 1 nucleótido entre la secuencia señuelo de miARN del primer grupo de genes del maíz que contienen la secuencia señuelo miR399 (**SEQ ID NO. 8827**, **SEQ ID NO. 8831**, y la **SEQ ID NO. 8833**) y el sitio "mimético" de IPS1 de miR399 de *Arabidopsis thaliana* (AT3G09922.1) notificado por Franco-Zorrilla y col. (2007) Nature Genetics, 39:1033-1037; la G conservada en la posición 12 de la **SEQ ID NO. 8826**, **SEQ ID NO. 8830**, y la **SEQ ID NO. 8832** está sustituida por una C en el sitio "mimético" de miR399 de *Arabidopsis*". Sin embargo, la homología entre los genes del maíz (**SEQ ID NO. 8827**, **SEQ ID NO. 8831**, y la **SEQ ID NO. 8833**) y el gen IPS1 de *Arabidopsis thaliana* (AT3G09922.1) se limitó a la secuencia señuelo del sitio miARN.

La **Tabla 10** proporciona secuencias señuelo de miARN endógeno de soja (*Glycine max*) para miR399 (**SEQ ID NO. 8812**, **SEQ ID NO. 8813**, **SEQ ID NO. 8814**, o la **SEQ ID NO. 8815**); los emparejamientos incorrectos en la secuencia señuelo de miARN están indicados mediante un texto subrayado en la alineación entre el miARN y la secuencia señuelo de miARN. Se usaron los datos del perfil de transcripción para comparar la expresión de las secuencias de ADNc señuelo del miARN endógeno y los correspondiente miARN precursores; el probese incluyó A1GM035741_at (correspondiente a la **SEQ ID NO. 8836**), A1GM069937_at (correspondiente a la **SEQ ID NO. 8838**), A1GM074873_at (correspondiente a la **SEQ ID NO. 8840**), A1GM031412_at (correspondiente a la **SEQ ID NO. 8842**), y A1GM053788_at (correspondiente a la **SEQ ID NO. 8844**).

Tabla 10

SEQ ID NO.	Secuencia señuelo de miR399	ADNc identificador del maíz y SEQ ID NO. (posición de nucleótidos de la secuencia señuelo de miARN codificada en el ADNc)	Alineación entre miR399 proporcionada en dirección 3' a 5' (anterior) y la secuencia señuelo de miARN proporcionada en dirección 5' a 3' (posterior)
8835	UAGGGCAACUUCGAUCCUUUGGCA	MRT3847_238967C.1 (SEQ ID NO. 8836) (390-413)	GUCCCGUUAAG---AGGAAACCGU uagggcaac <u>uucga</u> u <u>ccuu</u> uggca
8837	UAGGGCAACUUCUAUCCUUUGGCA	MRT3847_241832C.1 (SEQ ID NO. 8838) (393-416)	GUCCCGUUAAG---AGGAAACCGU uagggcaac <u>uucua</u> u <u>ccuu</u> uggca
8839	AAGGGCAACUUCAAUCCUUUGGCA	MRT3847_336885C.1 (SEQ ID NO. 8840) (96-119)	GUCCCGUUAAG---AGGAAACCGU aagggcaac <u>uucua</u> u <u>ccuu</u> uggca
8841	AAGGGCAACUUCGAUCCUUUGGCA	MRT3847_217257C.2 (SEQ ID NO. 8842) (179-202)	GUCCCGUUAAG---AGGAAACCGU aagggcaac <u>uucga</u> u <u>ccuu</u> uggca
8843	AAGGGCAACUUCGAUCCUUUGGCA	MRT3847_236871C.3 (SEQ ID NO. 8844) (238-261)	GUCCCGUUAAG---AGGAAACCGU aagggcaac <u>uucga</u> u <u>ccuu</u> uggca

Se usaron los perfiles de transcripción para comparar la expresión de las secuencias de ADNc señuelo del miR399 endógeno de maíz y los correspondientes miR399 precursores del maíz en diferentes condiciones de nitrógeno. El gen señuelo de miR399 del grupo 1 MRT4577_47862C.7 (**SEQ ID NO. 8827**) mostró una regulación por defecto de aproximadamente dos veces en condiciones de deficiencia de nitrógeno en hojas de maíz (**Figura 19A**); El gen señuelo de miR399 del grupo 2 MRT4577_36567C.8 (**SEQ ID NO. 8829**) mostró una regulación por defecto aún más intensa de al menos diez veces o mayor en condiciones de deficiencia de nitrógeno en hojas de maíz (**Figura 19B**). Estos resultados se verificaron mediante transferencias Northern que medían la expresión de miR399 maduro (**Figura 19C**) y de la secuencia señuelo de miR399 MRT4577_47862C.7 (**SEQ ID NO. 8827**) (**Figura 19D**). Se realizaron transferencias Northern con 5 microgramos por hilera de ARN total de hojas V6 procedentes de maíz crecido en condiciones de bajo (2 milimolar) o alto (20 milimolar) contenido en nitrógeno, y la misma transferencia sondeó el miR399 maduro de 21 nucleótidos (**Figura 19C**) y la secuencia señuelo de miR399 MRT4577_47862C.7 (**SEQ ID NO. 8827**) (**Figura 19D**, con la banda principal a aproximadamente 600 pb). Los elevados niveles de expresión de las secuencias señuelo dl miR399 de maíz en condiciones de suficiente nitrógeno imitan los elevados niveles de expresión de los miR399 precursores durante la suficiencia de nitrógeno (**Figura 17B**).

Se usaron experimentos de perfiles de transcripción similares para comparar la expresión de las secuencias de ADNc señuelo del miR399 endógeno de maíz y los correspondientes miR399 precursores del maíz en diferentes condiciones de temperatura. El gen señuelo de miR399 del grupo 2 MRT4577_36567C.8 (**SEQ ID NO. 8829**) presentó al menos una expresión de diez veces o más mayor en condiciones de nitrógeno suficiente en hoja de maíz, especialmente durante las horas diarias de luz (**Figura 20A**). Este mismo gen presentó al menos una infrarregulación de dos veces en la raíz (**Figura 20B**) y en los brotes (**Figura 20C**) tras una exposición prolongada al frío.

La expresión de las secuencias de ADNc señuelo de miR399 endógeno también se comparó en diferentes tejidos, tanto del maíz como de la soja. La Figura 21A representa gráficamente los niveles de expresión en la secuencia señuelo de miR399 de maíz del grupo 1 **SEQ ID NO. 8827** (MRT4577_47862C, representado por las sondas A1ZM005814_at y A1ZM005813_s_at), y la secuencia señuelo de miR399 de maíz del grupo 2 **SEQ ID NO. 8829** (MRT4577_36567C, representada por la sonda A1ZM048024_at), así como la secuencia de pri-miR399 de maíz **SEQ ID NO. 8818** (MRT4577_22487C.6 representada por la sonda A1ZM033468_at). La **Figura 21B** representa gráficamente los niveles de expresión de las secuencias señuelo de miR399 de soja **SEQ ID NO. 8842** (MRT3847_217257C.2, representada por la sonda A1GM031412_at), **SEQ ID NO. 8844** (MRT3847_236871C.2, representada por la sonda A1GM053788_at), **SEQ ID NO. 8836** (MRT3847_238967C.1, representada por la sonda A1GM035741_at), y la **SEQ ID NO. 8838** (MRT3847_241832C.1, representada por la sonda A1GM069937_at).

Estos datos confirman un novedoso patrón de expresión de sensibilidad al nitrógeno en plantas de cultivo incluidos el maíz y la soja tanto para el miR399 maduro (y los miR399 precursores) así como para las secuencias señuelo de miR399 endógeno. Entre las diferentes utilidades del miR399 se incluyen la expresión en exceso del miR399 maduro (por ejemplo, mediante la expresión en exceso de una secuencia pri-miR399), la expresión de un miR399 diseñado mediante ingeniería genética para suprimir un gen distinto del originalmente considerado como diana por un miR399 maduro natural, expresión de un transgén (secuencia codificante o no codificante o ambas) bajo el control del promotor miR399, expresión de un transgén en el que se ha añadido o eliminado un sitio de reconocimiento del miR399, expresión en exceso de una secuencia señuelo de miR399, y supresión de una secuencia señuelo de miR399 endógeno.

La **Tabla 11** proporciona secuencias señuelo de miARN endógeno de la soja (*Glycine max*) y maíz (*Zea mays*) para miR319, UUGGACUGAAAGGAGCUCCU (**SEQ ID NO. 8845**), que se ha identificado en numerosas especies vegetales incluidas *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, y *Glycine max* (véanse los ejemplos públicamente disponibles en la miRBase, microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/query.pl?terms=miR319); los emparejamientos incorrectos en la secuencia señuelo de miARN están indicados mediante un texto subrayado en la alineación entre el miARN y la secuencia señuelo de miARN. La **Figura 22A** representa gráficamente los datos del perfil de transcripción en diversos tejidos de soja del miR319 señuelo endógeno de soja **SEQ ID NO. 8847** (MRT3847_41831C.6, representada por la sonda A1 GM001017_at); La Figura 22B representa gráficamente los datos del perfil de transcripción en diversos tejidos de maíz del miR319 señuelo endógeno de maíz **SEQ ID NO. 8849** (MRT4577_577703C.1, representada por la sonda A1ZM012886_s_at).

Tabla 11

SEQ ID NO.	Secuencia señuelo de miR319	ADNc identificador y SEQ ID NO. (posición de nucleótidos de la secuencia señuelo de miARN codificada en el ADNc)	Alineación entre miR319 proporcionada en dirección 3' a 5' (anterior) y la secuencia señuelo de miARN proporcionada en dirección 5' a 3' (posterior)
8846	GGGAGUUUUCUACCUCCAGUCCAA	MRT3847_41831C.6 (SEQ ID NO. 8847) (545-567)	<u>UCCUCGAGGA</u> ----AAGUCAGGUU gggag <u>uuu</u> cu <u>accu</u> cc <u>ag</u> uccaa
8848	GGGAGCGCCAAUCAGUCCAA	MRT4577_577703C.1 (SEQ ID NO. 8849) (751-770)	UCCUCGAGGAAAGUCAGGUU gggag <u>cg</u> cc <u>aa</u> u <u>cag</u> uccaa

Entre los genes diana regulados por miR319 se encuentran los genes TCP implicados en el desarrollo de las hojas y los genes MYB implicados en el desarrollo de las flores. Una realización de la presente invención es la alteración de la arquitectura foliar o floral de una planta, o de un modelo de desarrollo, mediante la supresión de la transcripción de un miR319 maduro endógeno en una planta transgénica, o la alteración de la actividad del miR319 endógeno mediante la expresión en exceso de una secuencia señuelo de miR319 en una planta transgénica.

En otro ejemplo más, miR398b (SEQ ID NO. **8850**) ha demostrado regular la expresión de CSD1 y CSD2 (cobre/cinc superóxido dismutasa); véase Sunkar y col. (2006) Plant Cell, 18:2051-2065. La superóxido dismutasa ayuda a la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) convirtiendo el O₂ en H₂O₂ y minimiza el daño potencial producido por el superóxido o por los ROS derivados de superóxido. miR398 está algo regulada defectivamente por el estrés oxidativo y fuertemente regulada defectivamente por la disponibilidad de Cu; véase Yamasaki y col. (2007) J. Biol. Chem., 282:16369-16378. Una realización de la presente invención incluye la expresión de un transcrito quimérico que incluye secuencias señuelo de miR398b (por ejemplo, **SEQ ID NOS. 8851 - 8852**) bajo el control de un promotor inducible por estrés oxidativo, dando como resultado la supresión adicional de la actividad de miR398b y una acumulación mayor de CSD1 y CSD2 y protección frente al estrés en condiciones de estrés.

Se desvela una construcción de ADN recombinante que comprende: (a) una secuencia de un transgén sintético que no responde a miRMON18, en la que dicha secuencia de un transgén sintético que no responde a miRMON18: (i) se deriva de una secuencia sensible a miRMON18 natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN miRMON18 comprendidos en dicha secuencia sensible a miRMON18 natural, y (ii) no se reconoce por un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742; o (b) una secuencia de un transgén sintético que no responde a miARN, en la que dicha secuencia de un transgén sintético que no responde a miARN: (i) se deriva de una secuencia sensible a miARN natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN natural reconocidos por al menos un miARN maduro específico seleccionado entre las SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730-3921, SEQ ID NOS. 5498-6683, SEQ ID NOS. 8409-8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812-8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850 dentro de dicha secuencia sensible a miARN natural, y (ii) no se reconoce por dicho al menos un miARN maduro específico; o (c) una secuencia de un transgén sintético que no responde a miR399, en la que dicha secuencia de un transgén sintético que no responde a miR399: (i) se deriva de una secuencia sensible a miR399 natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN miR399 comprendidos en dicha secuencia sensible a miR399 natural, y (ii) no se reconoce por un miARN miR399 maduro; o (d) una secuencia de un transgén sintético que no responde a miR319, en la que dicha secuencia de un transgén sintético que no responde a miR399: (i) se deriva de una secuencia sensible a miR399 natural por delección o modificación de todos los sitios de reconocimiento del miARN miR319 comprendidos en dicha secuencia sensible a miR319 natural, y (ii) no se reconoce por un miARN miR319 maduro. Una construcción de ADN recombinante que comprende al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana, en el que dicho al menos un elemento de ADN transcribible se selecciona entre el grupo que consiste en:

(a) (i) un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819**, en el que dicho miARN precursor comprende un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos de dicha secuencia precursora de miARN vegetal, y dicha construcción de ADN recombinante comprende opcionalmente además un promotor diferente al promotor natural de dicha secuencia precursora de miARN natural; o (ii) un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819**, en el que dicho precursor de miARN comprende un segmento contiguo de al menos 90% de los nucleótidos de dicha secuencia precursora de miARN vegetal, y dicho al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y dicha construcción de ADN recombinante comprende opcionalmente además un promotor diferente al promotor natural de dicha secuencia precursora de miARN natural, y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta da como resultado la supresión de dicho al menos un gen diana;

(b) (i) un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia precursora de miRMON18 y que se procesa para obtener un miARN miRMON18 maduro, y dicha construcción de ADN recombinante comprende opcionalmente además un promotor diferente al promotor natural de dicha secuencia precursora de miRMON18 natural; o (ii) un elemento de ADN que se transcribe a un precursor de miARN con la estructura replegada de una secuencia precursora de miRMON18 y que se procesa para obtener un miARN miRMON18 maduro, y dicho al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y dicha construcción de ADN recombinante comprende opcionalmente además un promotor diferente al promotor natural de dicha secuencia precursora de miRMON18 natural, y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta da como resultado la supresión de dicho al menos un gen diana;

(c) (i) un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia de un miARN precursor seleccionado entre una secuencia precursora de miARN vegetal seleccionada entre las **SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819**,

en el que dicho miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética comprende un miARN maduro modificado; o (ii) un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia de un miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819, en el que dicho miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética comprende un miARN maduro modificado, en la que dicho al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta o un gen endógeno de una plaga o patógeno de dicha planta y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta da como resultado la supresión de dicho al menos un gen diana;

(d) (i) un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia precursora de un miRMON18, en el que dicho miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética comprende un miARN miRMON18 maduro modificado; o (ii) un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética derivado de la estructura replegada de una secuencia precursora de un miRMON18, en el que dicho miARN precursor diseñado mediante ingeniería genética comprende un miARN miRMON18 maduro modificado, en la que dicho al menos un gen diana sea un gen endógeno de una planta o un gen endógeno de una plaga o patógeno de dicha planta y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta da como resultado la supresión de dicho al menos un gen diana;

(e) (i) un elemento de ADN que se localiza o es adyacente a una unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN que comprende un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro seleccionado entre las SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730-3921, SEQ ID NOS. 5498-6683, SEQ ID NOS. 8409-8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812-8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850 o por un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819; o (ii) un elemento de ADN que se localiza o es adyacente a una unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN que comprende un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN maduro seleccionado entre las SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730-3921, SEQ ID NOS. 5498-6683, SEQ ID NOS. 8409-8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812-8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850, o por un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819, y dicho al menos un gen diana comprende el transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén, y en el que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en una planta da como resultado la expresión dicho transgén en células de la planta en las que dicho miARN maduro no se expresa naturalmente;

(f) (i) un elemento de ADN que se localiza o es adyacente a una unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN que comprende un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN miRMON18 maduro o por un miARN maduro procedente de una secuencia precursora de miRMON18; o (ii) un elemento de ADN que se localiza o es adyacente a una unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN que comprende un sitio de reconocimiento del miARN reconocido por un miARN miRMON18 maduro o por un miARN maduro procedente de una secuencia precursora de miRMON18, y dicho al menos un gen diana comprende el transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén, y en el que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en una planta da como resultado la expresión dicho transgén en células de la planta en las que dicho miARN miRMON18 maduro no se expresa naturalmente

(g) (i) un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN endógeno derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819; o (ii) un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN endógeno derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819, en el que dicho al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y la expresión de dicho gen endógeno esté suprimida en células de dicha planta cuando se produce la expresión natural de dicho miARN endógeno, y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión de dicho gen endógeno en dichas células; y

(h) (i) un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN miRMON18 maduro endógeno derivada de una secuencia precursora de miRMON18, dicho al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y la expresión de dicho gen endógeno esté suprimida en células de dicha planta cuando se produce la expresión natural de dicho miARN miRMON18 maduro endógeno, y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión de dicho gen endógeno en dichas células; o (ii) un elemento de ADN para suprimir la expresión de un miARN miRMON18 maduro endógeno derivada de una secuencia precursora de miRMON18, en el que dicho al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y la expresión de dicho gen endógeno esté suprimida en células de dicha planta cuando se produce la expresión natural de dicho miARN miRMON18 maduro endógeno, y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en las células da como resultado la expresión de dicho gen endógeno en dichas células.

Una construcción de ADN recombinante que comprende un promotor seleccionado entre el grupo que consiste en:

- (a) un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación mediante estrés abiótico;
- (b) un promotor de un miARN que presenta un patrón de expresión caracterizado por la regulación mediante estrés por nutrientes, en el que dicho estrés por nutrientes comprende al menos una deficiencia de nutrientes seleccionada entre el grupo que consiste en deficiencia de nitrógeno y deficiencia de fosfato;
- (c) el promotor del miARN del maíz que presenta en el tejido foliar una expresión intensa en condiciones de suficiente nitrógeno y supresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno;
- (d) el promotor del miARN del maíz que presenta en el tejido foliar una expresión intensa en condiciones de suficiente fosfato y supresión en condiciones de deficiencia de fosfato;
- (e) un promotor de miRMON18 que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8804; y
- (f) un fragmento de al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos que tienen al menos una identidad del 85% con un segmento de la SEQ ID NO. 8804;

en el que dicho promotor está unido operativamente con al menos un elemento de supresión génica y un elemento de expresión génica.

La construcción de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, en la que dicho promotor está unido operativamente con al menos la región codificante de un gen de la asparagina sintetasa.

Una construcción de ADN recombinante que se transcribe a un transcrito de ARN que comprende al menos una secuencia señuelo miARN que reconoce y se une a un miARN maduro endógeno pero que no se escinde, en el que dicho miARN endógeno es al menos un miARN seleccionado entre

- (a) un miARN maduro seleccionado entre miARN maduros seleccionados entre la SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730-3921, SEQ ID NOS. 5498-6683, SEQ ID NOS. 8409-8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812-8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850 o
 - (b) un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561-8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819; y
- dicha secuencia señuelo de miARN comprende una secuencia ARN de entre aproximadamente 19 y aproximadamente 36 nucleótidos contiguos de ARN, en el que
- dicha secuencia señuelo de miARN reconoce y se une a dicho miARN maduro endógeno, dando como resultado el emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno, formando de esta manera un duplete de ARN resistente a la escisión que comprende: (a) al menos un emparejamiento incorrecto entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 9, 10, u 11 de dicho miARN maduro endógeno, o al menos una inserción en una posición de dicha secuencia señuelo de miARN correspondiente a las posiciones 10-11 de dicho miARN maduro endógeno, (b) 0, 1, o 2 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 de dicho miARN maduro endógeno, y (c) 0, 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN y dicho miARN maduro endógeno en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho miARN maduro endógeno, en el que cada uno de dichos emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho microARN maduro endógeno es adyacente a al menos un par de bases complementario.

La construcción de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, en la que dicha al menos una secuencia señuelo de miARN comprende (a) una secuencia señuelo de miARN de origen natural, o (b) una secuencia señuelo de miARN sintética, o (c) tanto una secuencia señuelo de miARN de origen natural como una secuencia señuelo de miARN sintética.

La construcción de ADN recombinante que se ha definido anteriormente, en la que dicha al menos una secuencia señuelo de miARN reconoce y se une pero no se escinde por al menos un microARN seleccionado entre el grupo que consiste en: (a) un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742 o un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la SEQ ID NO. 1763, SEQ ID NO. 3936, y la SEQ ID NO. 8800; (a) un miR399 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8815, SEQ ID NO. 8816, SEQ ID NO. 8817, o la SEQ ID NO. 8818 o un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miR399 seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 8819, SEQ ID NO. 8820, SEQ ID NO. 8821, y la SEQ ID NO. 8822; y (c) un miR319 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8845.

Una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante como se ha definido anteriormente. Una planta transgénica no natural que comprende una planta regenerada preparada a partir de la célula de planta transgénica no natural que se ha definido anteriormente, o una descendencia vegetal de una planta regenerada preparada a partir de la célula de planta transgénica no natural que se ha definido anteriormente, en el que dicha planta transgénica no natural tiene al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta que

carece de dicha construcción de ADN recombinante, en relación a una planta que carece de la construcción de ADN recombinante, seleccionada entre el grupo de rasgos que consisten en: tolerancia al estrés abiótico mejorada; tolerancia al estrés biótico mejorada; resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta; composición de metabolitos primarios modificada; composición de metabolitos secundarios modificada; elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas; rendimiento mejorado; capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas; características de crecimiento o reproductivas modificadas; y una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

Un procedimiento para realizar la supresión génica, que comprende:

- 10 (a) proporcionar una planta transgénica no natural que comprende una planta regenerada preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 2, o una descendencia vegetal de una planta regenerada preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante como se ha definido anteriormente; y
- (b) transcribir dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta transgénica no natural;
- 15 en la que dicha transcripción produce un ARN que es capaz de suprimir dicho al menos un gen diana de dicha planta transgénica no natural, mediante lo cual, dicho al menos un gen diana se suprime con respecto a su expresión en ausencia de transcripción de dicha construcción de ADN recombinante. El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que dicho al menos un gen diana es al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en un gen natural para dicha planta transgénica, un transgén de dicha planta transgénica no natural, y un gen natural de una plaga o patógeno vírico, bacteriano, fúngico o de invertebrado de la planta transgénica.
- 20

El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que dicho al menos un gen diana son varios genes diana.

El procedimiento que se ha definido anteriormente, en el que dicha supresión génica una supresión espacialmente específica, temporalmente específica, específica del desarrollo, o la supresión génica inducible.

- 25 Un procedimiento para realizar en paralelo la supresión génica de al menos un gen diana y de la expresión génica de al menos un gen de interés, que comprende:

- (a) proporcionar una planta transgénica no natural que comprende una planta regenerada preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 2, o una descendencia vegetal de una planta regenerada preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante de la reivindicación 2, en la que dicha construcción de ADN recombinante comprende además un elemento de expresión génica para expresar dicho al menos un gen de interés; y
- 30 (b) transcribir dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta transgénica no natural, en el que, cuando dicha construcción de ADN recombinante se transcribe en dicha planta transgénica no natural, se produce un ARN transcrito que es capaz de suprimir dicho al menos un gen diana y un ARN transcrito que codifica dicho al menos un gen de interés, mediante lo cual, dicho al menos un gen diana se suprime con respecto a su expresión en ausencia de transcripción de la construcción de ADN recombinante y se expresa en paralelo dicho al menos un gen de interés.
- 35

- Un planta transgénica no natural preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante como se ha definido anteriormente, en la que dicho al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana comprende un elemento de ADN que se transcribe a un miARN precursor con la estructura replegada de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la SEQ ID NO. 1763, SEQ ID NO. 3936, y la SEQ ID NO. 8800, en la que dicho miARN precursor comprende un segmento contiguo de al menos el 90% de los nucleótidos de dicha secuencia precursora de miRMON18 y se procesa para obtener un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742 y dicho al menos un gen diana es un gen endógeno de una planta, y, en la que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en dicha planta da como resultado la supresión de dicho al menos un gen diana, en la que dicho al menos un gen diana comprende un dominio SPX.
- 40
- 45

- Un planta transgénica no natural preparada a partir de una célula de planta transgénica no natural que comprende una construcción de ADN recombinante como se ha definido anteriormente, comprendiendo dicha construcción de ADN recombinante además una unidad de transcripción del transgén, en el que dicho al menos un elemento de ADN transcribible para modular la expresión de al menos un gen diana comprende un elemento de ADN que está situado en o adyacente a dicha unidad de transcripción del transgén y que se transcribe a ARN que comprende un sitio de reconocimiento de miARN reconocido por un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742 o mediante un miARN miRMON18 derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la SEQ ID NO. 1763, SEQ ID NO. 3936, y la SEQ ID NO. 8800, y dicho al menos un gen diana comprende el transgén codificado por la unidad de transcripción del transgén, y en el que la expresión de dicha construcción de ADN recombinante en una planta da como resultado la expresión dicho transgén en células de la planta en las que dicho miARN miRMON18 maduro no se expresa naturalmente, en la que
- 50
- 55

dicho al menos un gen diana comprende un dominio SPX.

5 Un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénico no natural que tiene al menos un rasgo alterado, que comprende suprimir en dicha planta de cultivo transgénica no natural al menos una secuencia señuelo de miARN endógena, dando como resultado por tanto la mencionada planta de cultivo transgénico no natural que
10 presenta al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta de cultivo que no expresa dicha construcción de ADN recombinante, seleccionada entre el grupo de rasgos que consisten en: tolerancia al estrés abiótico mejorada; tolerancia al estrés biótico mejorada; resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta; composición de metabolitos primarios modificada; composición de metabolitos secundarios modificada; elemento traza modificado, carotenoides, o composición de vitaminas; rendimiento mejorado; capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas; características de crecimiento o reproductivas modificadas; y una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

Un procedimiento para proporcionar una planta de cultivo transgénica no natural que tiene un rendimiento mejorado en condiciones de deficiencia de nitrógeno o fosfato, que comprende expresar en dicha planta de cultivo transgénico no natural la construcción de ADN recombinante que se ha definido anteriormente.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para disminuir la actividad del miARN en una célula vegetal que comprende expresar en una célula vegetal una construcción de ADN recombinante que comprende un promotor heterólogo unido operativamente a un ADN que codifica al menos una secuencia señuelo de un miARN sintético que consiste en 19 a 36 nucleótidos de ARN contiguos, en el que la secuencia señuelo de dicho miARN sintético se reconoce y une, pero no se escinde, por un miARN expresado en dicha célula vegetal, dando como resultado un emparejamiento de bases entre dicha secuencia señuelo de miARN sintético y dicho miARN maduro, formando por tanto un duplete de ARN resistente a la escisión que comprende al menos un emparejamiento incorrecto entre dicha secuencia señuelo de miARN sintético y dicho miARN maduro en las posiciones 9, 10, u 11 de dicho miARN vegetal maduro, o al menos una inserción en una posición de dicha secuencia señuelo de miARN sintético correspondiente a las posiciones 10-11 de dicho miARN maduro, por lo cual disminuye la actividad de dicho miARN maduro en la mencionada célula vegetal, con respecto a aquella en la que dicha construcción de ADN recombinante no se expresa en dicha célula vegetal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho duplete de ARN resistente a la escisión además comprende (a) 1 o 2 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN sintético y dicho miARN maduro en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 de dicho miARN maduro, (b) 1, 2, o 3 emparejamientos incorrectos entre dicha secuencia señuelo de miARN sintético y dicho miARN maduro en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho miARN maduro, en el que cada uno de dichos emparejamientos incorrectos en las posiciones desde la 12 hasta la última posición de dicho microARN maduro es adyacente a al menos un par de bases complementarias, o (c) una combinación de (a) y (b).
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho miARN maduro es al menos un miARN maduro seleccionado entre (a) un miARN maduro seleccionado entre las SEQ ID NOS. 1-1035, SEQ ID NOS. 2730-3921, SEQ ID NOS. 5498-6683, SEQ ID NOS. 8409-8560, SEQ ID NO. 8742, SEQ ID NO. 8744, SEQ ID NOS. 8812-8815, SEQ ID NO. 8845, y la SEQ ID NO. 8850, o (b) un miARN maduro derivado de una secuencia de miARN precursor de planta seleccionada entre las SEQ ID NOS. 1036-2690, SEQ ID NOS. 3922-5497, SEQ ID NOS. 6684-8408, SEQ ID NOS. 8561- 8417, SEQ ID NO. 8743, SEQ ID NO. 8800, y SEQ ID NOS. 8816-8819.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha al menos una secuencia señuelo de miARN sintético se reconoce y se une, pero no se escinde, mediante al menos un miARN maduro seleccionado entre: (a) un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742 o un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la SEQ ID NO. 1763, SEQ ID NO. 3936, y la SEQ ID NO. 8800; (b) un miR399 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8815, SEQ ID NO. 8816, SEQ ID NO. 8817, o la SEQ ID NO. 8818 o un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miR399 seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 8819, SEQ ID NO. 8820, SEQ ID NO. 8821, y la SEQ ID NO. 8822; y (c) un miR319 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8845.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho promotor se selecciona entre promotores espacialmente específicos, promotores temporalmente específicos, y promotores inducibles.
6. Una célula vegetal transgénica no natural en la que la actividad de dicho miARN maduro se ha disminuido por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una planta transgénica no natural regenerada a partir de célula vegetal transgénica no natural de la reivindicación 6, o una descendencia vegetal de una planta regenerada preparada a partir de la célula vegetal transgénica no natural de la reivindicación 6, en la que dicha planta transgénica no natural comprende y expresa la construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, y en la que dicha planta transgénica no natural tiene al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta que carece de dicha construcción de ADN recombinante, seleccionado entre los rasgos; tolerancia al estrés abiótico mejorada; tolerancia al estrés biótico mejorada; resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta; composición de metabolitos primarios modificada; composición de metabolitos secundarios modificada; composición de oligoelementos, carotenoides, o vitaminas modificada; rendimiento mejorado; capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas; características de crecimiento o reproductivas modificadas; y una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.
8. Una planta de cultivo transgénica no natural que tiene al menos un rasgo alterado, en la que dicha planta de cultivo transgénica no natural comprende y expresa la construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, dando como resultado por tanto la mencionada planta de cultivo transgénica no natural que presenta al menos un rasgo alterado, con respecto a una planta de cultivo que no expresa dicha construcción de ADN recombinante, seleccionado entre los rasgos; tolerancia al estrés abiótico mejorada; tolerancia al estrés biótico mejorada; resistencia mejorada a una plaga o un patógeno de dicha planta; composición de metabolitos primarios modificada; composición de metabolitos secundarios modificada; composición de oligoelementos, carotenoides, o vitaminas modificada; rendimiento mejorado; capacidad mejorada de usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas; características de crecimiento o reproductivas modificadas; y una cosecha, almacenamiento, o calidad del procesamiento mejorados.

- 5 9. La planta de cultivo transgénica no natural de la reivindicación 8 que tiene un rendimiento mejorado en condiciones de deficiencia de nitrógeno o de fosfato, en la que dicha al menos una secuencia señuelo de miARN sintético se reconoce y se une, pero no se escinde, mediante al menos un miARN maduro seleccionado entre: (a) un miARN miRMON18 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 393, SEQ ID NO. 3227, o la SEQ ID NO. 8742 o un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miRMON18 seleccionada entre la SEQ ID NO. 1763, SEQ ID NO. 3936, y la SEQ ID NO. 8800; (b) un miR399 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8815, SEQ ID NO. 8816, SEQ ID NO. 8817, o la SEQ ID NO. 8818 o un miARN maduro derivado de una secuencia precursora de miR399 seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 8819, SEQ ID NO. 8820, SEQ ID NO. 8821, y la SEQ ID NO. 8822; y (c) un miR319 maduro que tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 8845.

10

FIGURA 1

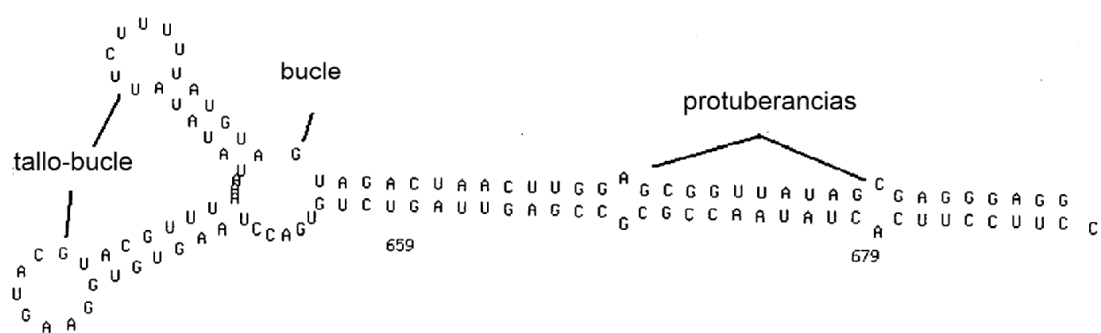
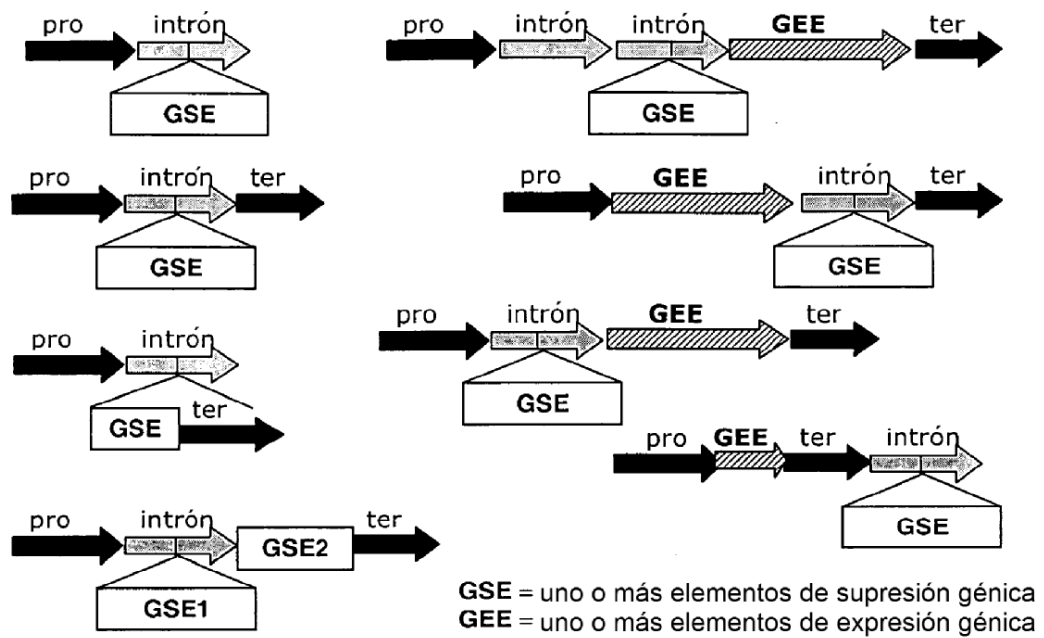
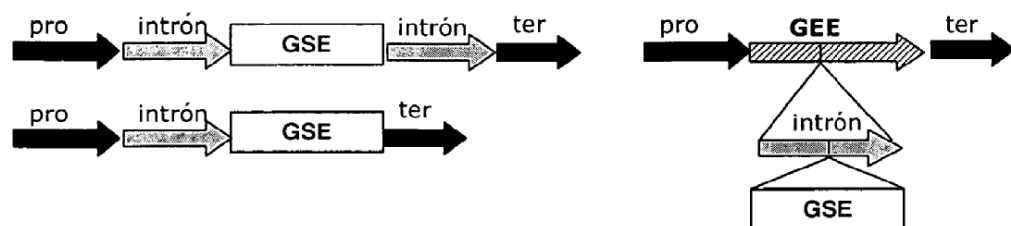


FIGURA 2



A



B

FIGURA 3

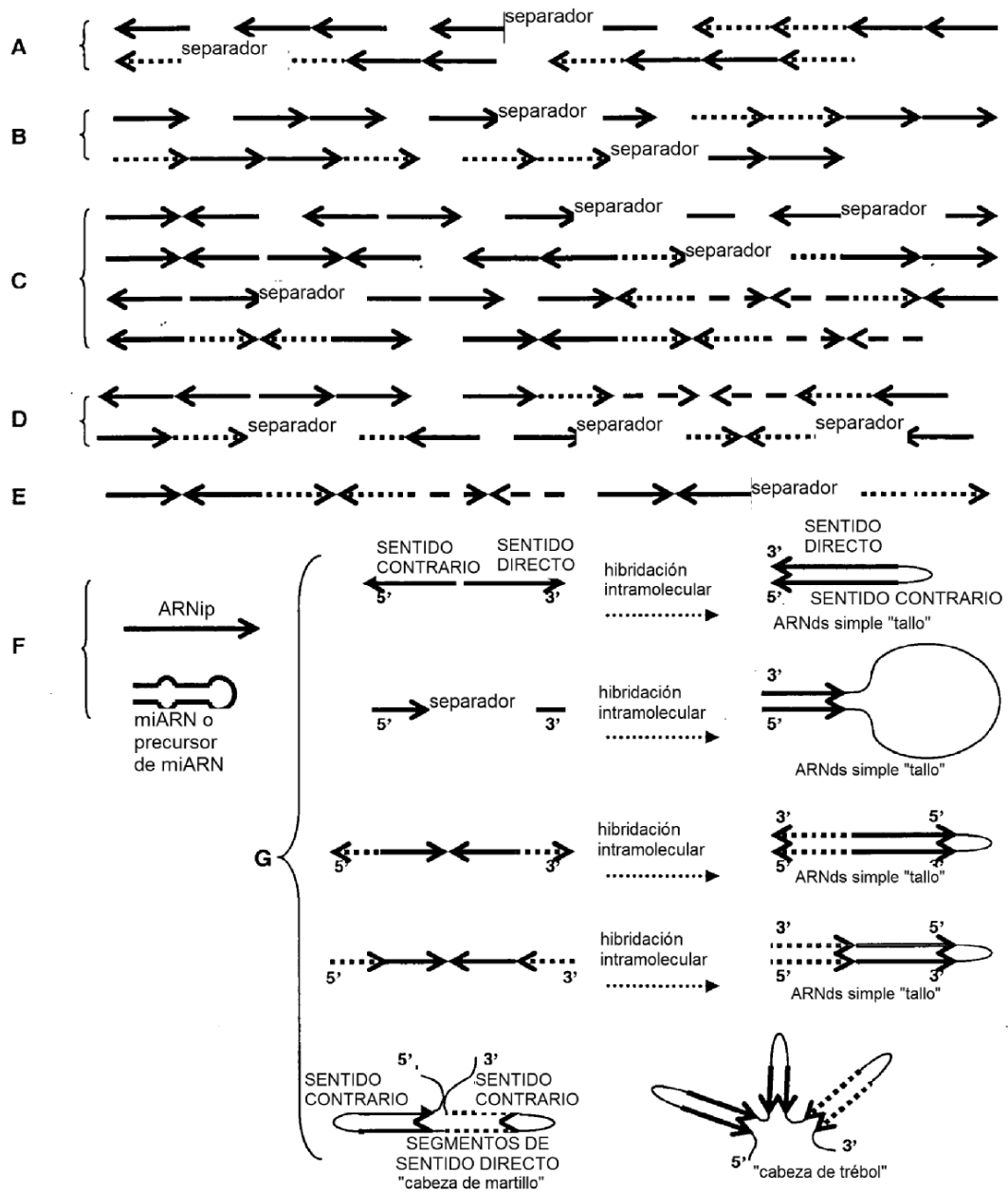


FIGURA 4

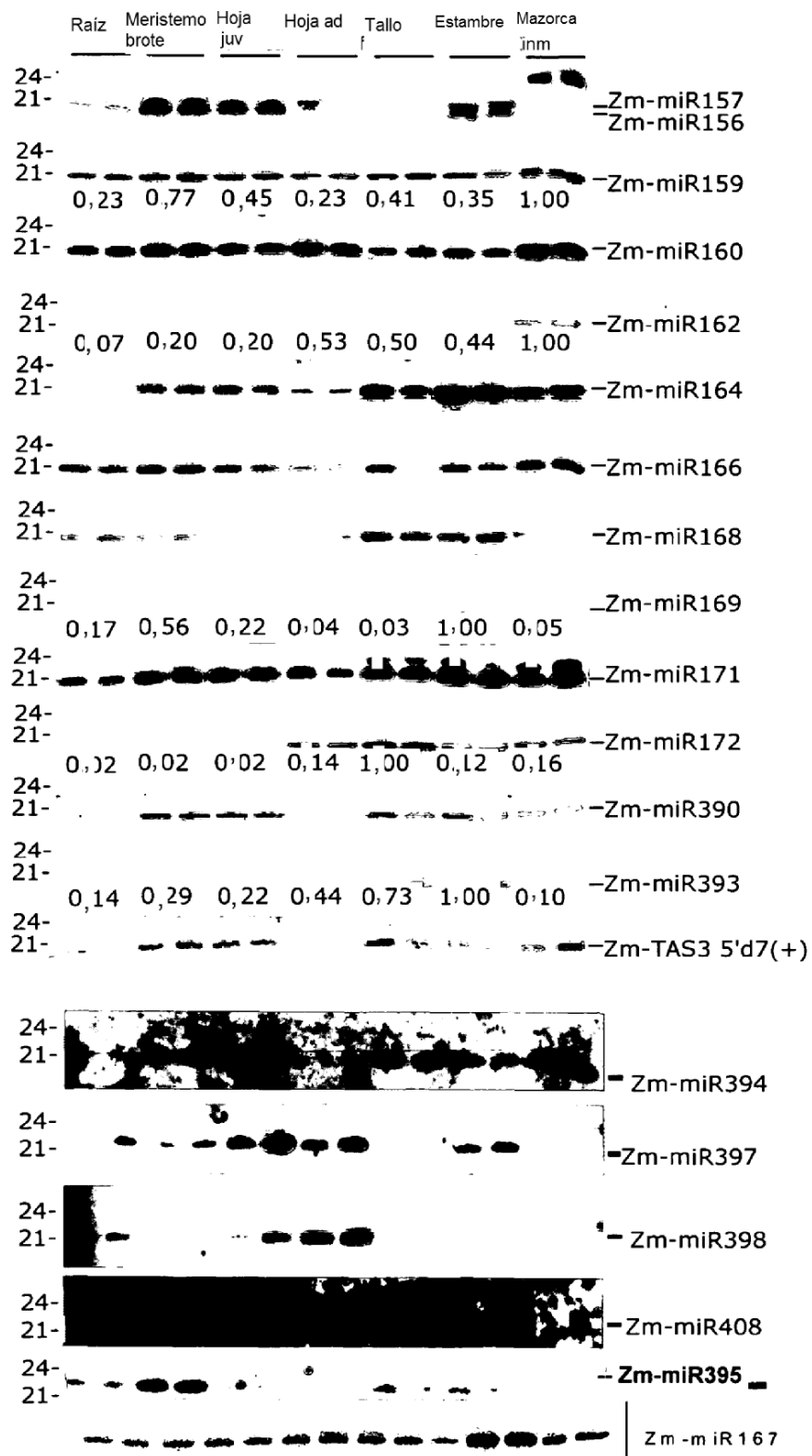


FIGURA 5

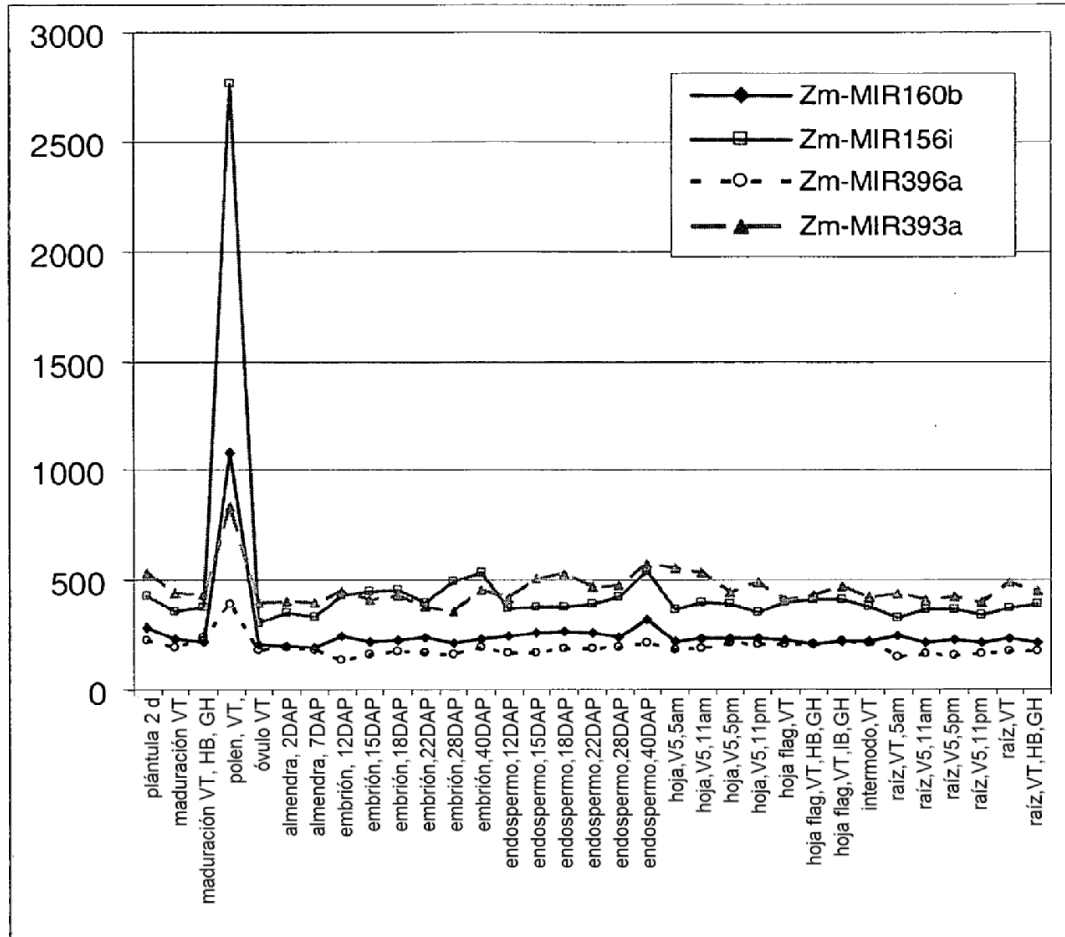


FIGURA 6

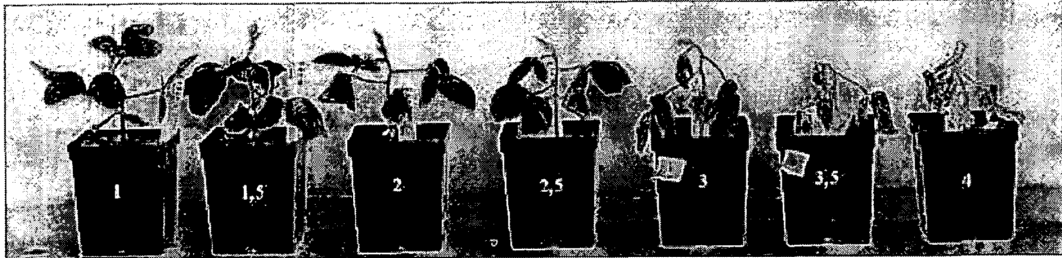


FIGURA 7

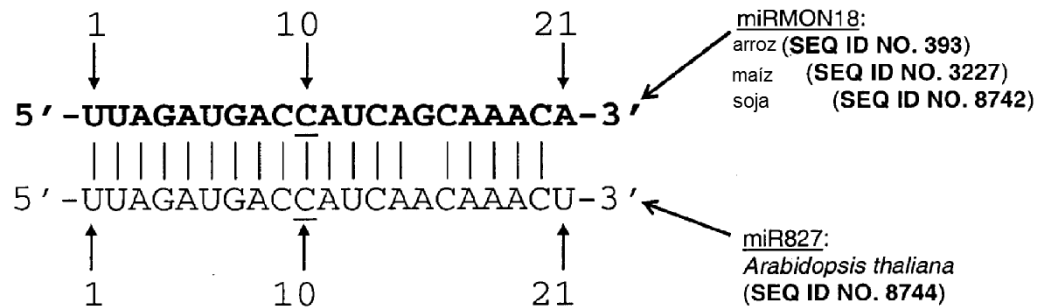
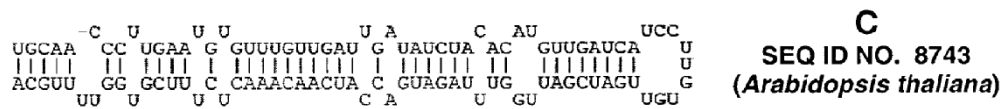
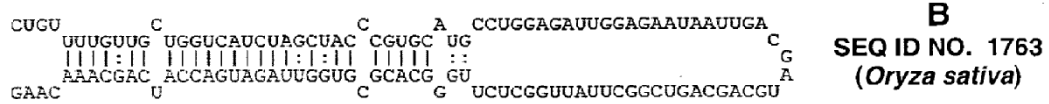
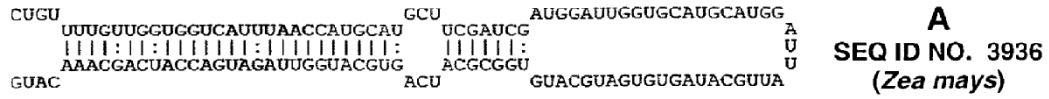
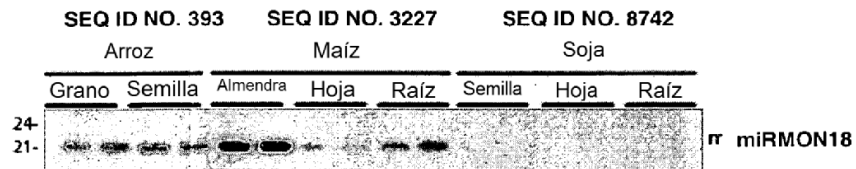
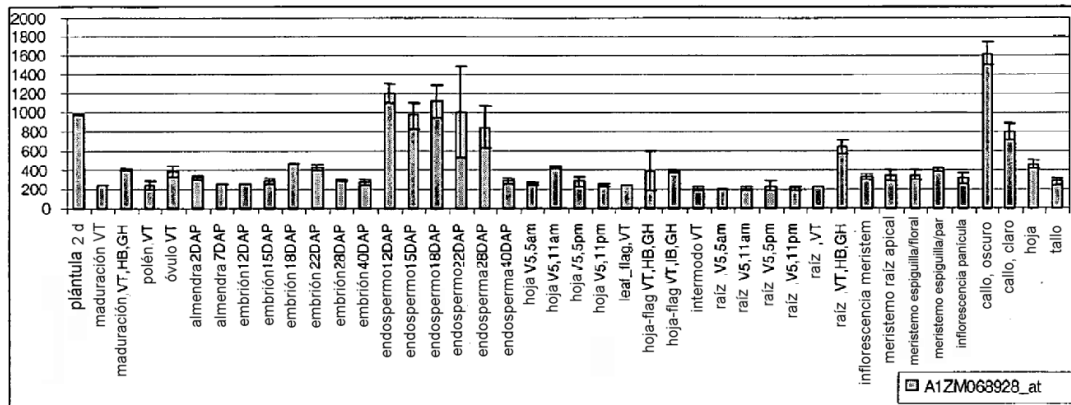


FIGURE 8



A



B

FIGURA 9

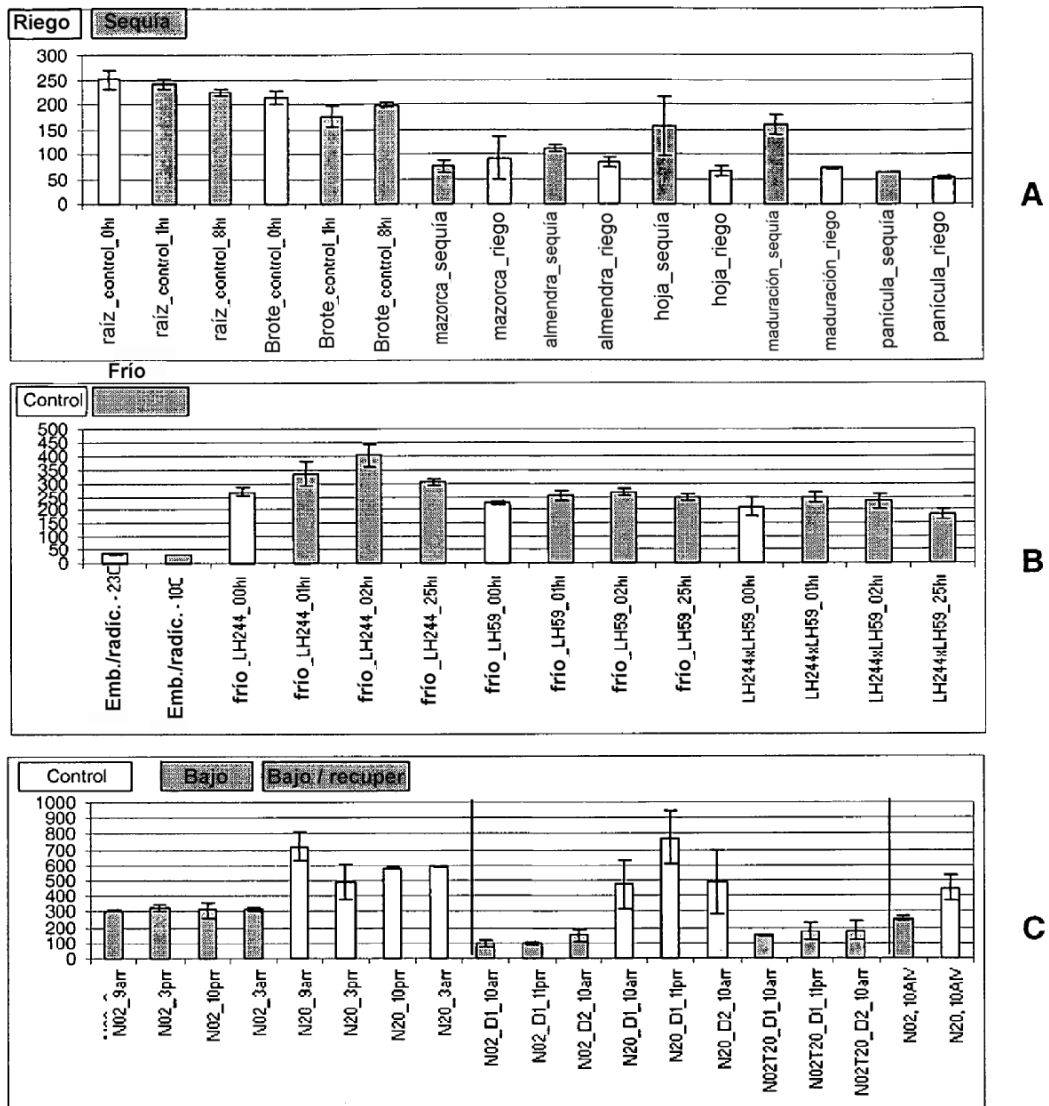


FIGURA 10

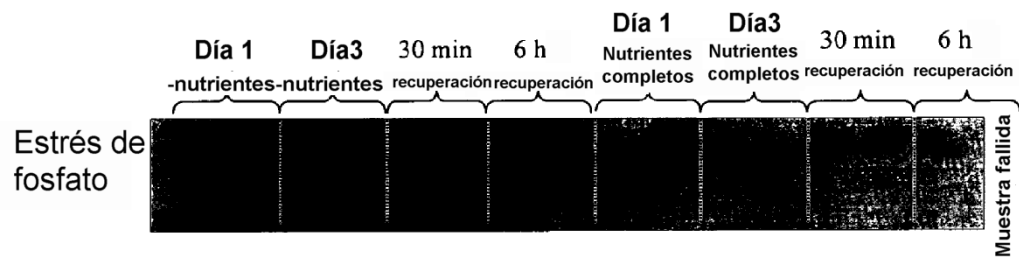
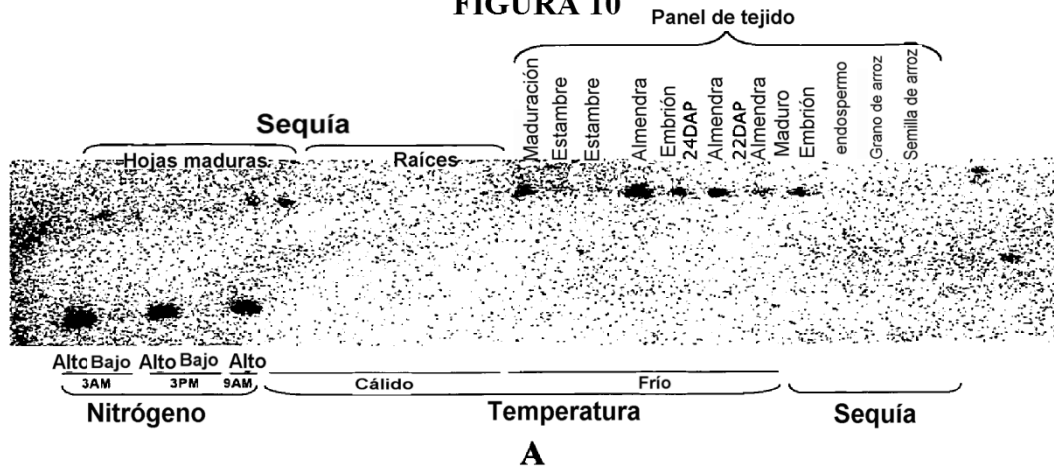


FIGURA 11

SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	----- MVNFGKKLMADQIPWKGVYINYNKLMKKVKQYGGQQLOQGEKDRRRVLKD -----
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	----- MVNFGKKLMADQIPWKGVYINYNKLMKKVKQYGGQQLOQGEKDRRRVLKD -----
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	----- MVNFGKKLMADQIPWKGVYINYNKLMKKVKQYGGQQLOQGEKDRRRVLKD -----
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	----- MVNFGKKLMADQIPWKGVYINYNKLMKKVKQYGGQQLOQGEKDRRRVLKD -----
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	----- MVNFGKKLMADQIPWKGVYINYNKLMKKVKQYGGQQLOQGEKDRRRVLKD -----
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	----- MVNFGKKLMADQIPWKGVYINYNKLMKKVKQYGGQQLOQGEKDRRRVLKD -----
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	----- FSKMLDDQIEKIALFLLEQQGLASRIEELGKQRAILQDQPDISGIAELR -----
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	----- FSKMLDDQIEKIALFLLEQQGLASRIEELGKQRAILQDQPDISGIAELR -----
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	----- FSKMLDDQIEKIALFLLEQQGLASRIEELGKQRAILQDQPDISGIAELR -----
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	----- FSKMLDDQIEKIALFLLEQQGLASRIEELGKQRAILQDQPDISGIAELR -----
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	----- FSRFLDDQIERIVLFLLEQQGLASRIEELGKQRAILQDQPDISGIAELR -----
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	----- FSRFLDDQIERIVLFLLEQQGLASRIEELGKQRAILQDQPDISGIAELR -----
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	----- EAYREVGLDLIKLLKFVDNATGIRKILKKFKDKRFGYRFTDYVVTSRNH -----
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	----- EAYREVGLDLIKLLKFVDNATGIRKILKKFKDKRFGYRFTDYVVTSRNH -----
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	----- EAYREVGLDLIKLLKFVDNATGIRKILKKFKDKRFGYRFTDYVVTSRNH -----
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	----- EAYREVGLDLIKLLKFVDNATGIRKILKKFKDKRFGYRFTDYVVTSRNH -----
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	----- DAYREVGLDLIKLLKFVDNATGIRKILKKFKDKRFGYRFTDYVVTSRNH -----
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	----- DAYREVGLDLIKLLKFVDNATGIRKILKKFKDKRFGYRFTDYVVTSRNH -----
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	----- PYSQLQQVFKHVGVAVVGVGALSRNLAELOERQGSYLSIYDQPSSALKDPI -----
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	----- PYSQLQQVFKHVGVAVVGVGALSRNLAELOERQGSYLSIYDQPSSALKDPI -----
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	----- PYSQLQQVFKHVGVAVVGVGALSRNLAELOERQGSYLSIYDQPSSALKDPI -----
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	----- PYSQLQQVFKHVGVAVVGVGALSRNLAELOERQGSYLSIYDQPSSALKDPI -----
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	----- PYSQLQQVFKHVGVAVVGVGALSRNLAELOERQGSYLSIYDQPSSALKDPI -----
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	----- PYSQLQQVFKHVGVAVVGVGALSRNLAELOERQGSYLSIYDQPSSALKDPI -----
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	----- IDMINSFVDKLTSTNFTNFRFLGQHALIVDEESPTAGEEIEDQKYHFMS -----
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	----- IDMINSFVDKLTSTNFTNFRFLGQHALIVDEESPTAGEEIEDQKYHFMS -----
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	----- IDMINSFVDKLTSTNFTNFRFLGQHALIVDEESPTAGEEIEDQKYHFMS -----
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	----- IDMINSFVDKLTSTNFTNFRFLGQHALIVDEESPTAGEEIEDQKYHFMS -----
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	----- IDQVNHAVQKLTHATNFMQFLGQHALIVQEDAES-ESEDLVGDQSYHFMS -----
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	----- IDQVNHAVQKLTHATNFMQFLGQHALIVQEDAES-ESEDLVGDQSYHFMS -----

SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	GSAYRLTPSVKQQLLYFMLKYAMEILLSESSVITNHYFWSWNTSAVAIF
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	GSAYRLTPSVKQQLLYFMLKYAMEILLSESSVITNHYFWSWNTSAVAIF
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	GSAYRLTPSVKQQLLYFMLKYAMEILLSESSVITNHYFWSWNTSAVAIF
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	GSAYRLTPSVKQQLLYFMLKYAMEILLSESSVITNHYFWSWNTSAVAIF
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	ASAYRLTPSVKAQQLLYFMLKYAMEILLSESSVITTYFWSWNTSAVAIF
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	ASAYRLTPSVKAQQLLYFMLKYAMEILLSESSVITTYFWSWNTSAVAIF
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	LAILGLTVLPVNAVVGTYISNMFEDRQLLMVSIQITLLVGLIIFSFVKVTSTY
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	LAILGLTVLPVNAVVGTYISNMFEDRQLLMVSIQITLLVGLIIFSFVKVTSTY
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	LAILGLTVLPVNAVVGTYISNMFEDRQLLMVSIQITLLVGLIIFSFVKVTSTY
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	LAILGLTVLPVNAVVGTYISNMFEDRQLLMVSIQITLLVGLIIFSFVKVTSTY
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	LAILGLTVLPVNAVVGTYISNMFEDRQLLMVSIQITLLVGLIIFSFVKVTSTY
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	LAILGLTVLPVNAVVGTYISNMFEDRQLLMVSIQITLLVGLIIFSFVKVTSTY
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	SVVQYVVSALVTFVSAEVLGVNLILLSSVMSSRLSRGTNGCLLSTEAG
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	SVVQYVVSALVTFVSAEVLGVNLILLSSVMSSRLSRGTNGCLLSTEAG
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	YVQYVVSALVTFVSAEVLGVNLILLSSVMSSRLSRGTNGCLLSTEAG
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	YVQYVVSALVTFVSAEVLGVNLILLSSVMSSRLSRGTNGCLLSTEAG
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	SIPQYVLSAFITTFVFAEVLGVNLILLSRVMSRLSRGTNGCLLSTEAG
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	SIPQYVLSAFITTFVFAEVLGVNLILLSRVMSRLSRGTNGCLLSTEAG
SPX_MFS_126116193_plus_est_sti	(SEQ ID NO. 8766)	TLARVWADCTITAAGYLGVGKLLNVTLPSLVICVASIACFTLTYNLSL
fs_SPX_MFS_126116193_plus_est_	(SEQ ID NO. 8765)	TLARVWADCTITAAGYLGVGKLLNVTLPSLVICVASIACFTLTYNLSL
SPX_MFS_118200525_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8761)	TLARVWADCTITAAGYLGVGKLLNVTLPSLVICVASIACFTLTYNLSL
SPX_MFS_118200525_2_pep	(SEQ ID NO. 8763)	TLARVWADCTITAAGYLGVGKLLNVTLPSLVICVASIACFTLTYNLSL
SPX_MFS_117961287_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8757)	TLARVWADCTITAAGYLGVDLLNVTLPSLVICVASIAAALTYNNLY
SPX_MFS_117961287_2_cdna.pep	(SEQ ID NO. 8759)	TLARVWADCTITAAGYLGVDLLNVTLPSLVICVASIAAALTYNNLY

FIGURA 12

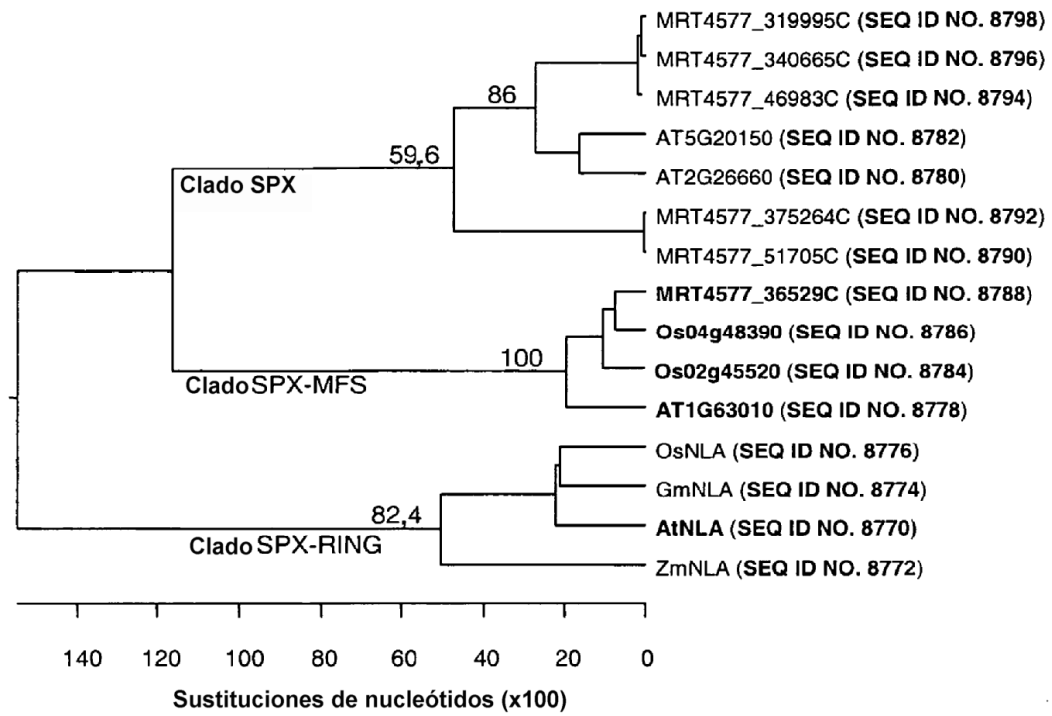


FIGURA 13

ctgcagcccactgctcctccacggggtggatcttctccaacgcggcattcacgttcgcgcgtat
 gcgatggagggggaaactaggcggaagaaggcattgggtggcggcattggatttctggacgggttc
 ggaaaggagtggcgtgggaggtcacctgtggacgaacatgtgggtgggctacgtgggggtggg
 cacggaggtggactagtgggtggaagacagcgagctcgtcggcgaggagggttggaaactgggacg
 cggtagccgataccctgcgcacggccccggtagcaagaaatggcaagggaaggatgcggcacacg
 gtgaagtgatggaccgggtctgcacatttatggccccaggaagcaagggaacgacccccggcaa
 actcctaggcgagagaagcgggtccagccacaaccaccaaggaagaagacccggcctgagcagt
 aaaacaataccggaggaggaacacaagaaggtagagcaccacacccaacttgggtgatgctcgc
 caacaccaccatcgctctcatccaagaaaggtagcatcaagattaatcccttagattagcttag
 gaccctttacttcatcgaggttagattggattggccttctagagtttactaatggcattggag
 ccaacctagaacccctagattccctaataccaagtttagagtcaagaatgtctctcgacccat
 aattaagaaccacatagggatttaaagaggtagaagaagagcagtaggggagcgagtggttagc
 cctaaccacaaacacccagaatttagcagaaaggggttcgagtttaggtaaccctaactaaatcc
 ccaataactcagaggaaggagatggaccgttagagggaactcaagtttagattaaactaacctaat
 tcccaagttaaggaaaagatcactcgggggaggggggttaggggtgttaaactcctaccccaatc
 cccaaatcattagaaagggaacacaacatagaggaccttcagtttaggtaaccctaaccctaatc
 ccaaatcatcaaaagggaactgaggacaaccctaaattccaaccttcagaaccttacaaggggc
 tcaggatggagatccaaagccccaaagcacagggtcctgaacatcgagacaaattaggggtttga
 accctaaatccttccccaaatcatataaagaaatgtaccaaaaggcggcggagagtgcaaatgt
 tttttatagagacaactatccttctacgtgcactgttaactctattaaatctatttgtagagt
 atgttgtaaatccaatcatctcagaaaacatatttatagagagacgtctctcatttctagtc
 cctctataaatctcatttcttaggaacagttacaatgtgtttgggttgagggttaaagtgggatga
 gtcagggggcgacacgtctcctcattttttgggatcatgcgccatcaaaattactacgggggt
 ttatctcgccctacgtgactctcatccaatattattagaactatggctcgtcctattttatcc
 ctccatataatctaaccaaacacacccggccagccacctatacaaatcatttatttacagtaa
 ggacgactggcctacacgagacaaggccgcgctctcttagatcttaggtgctgtttgggttcaca
 tattttataacgcaatgggtaactgataacgttaaatcatgtttgttttagtccaaccgtaataca
 gataccacactaaaaattgataaccagcctattcaaatgtttaccgccagtaatcgagcgtaaa
 ctattaccattaccattttgcgttacatttcttgaaccaaacacaccttagttcgttagcagtg
 atcaaacgcgggttctcatccgattgctattccccaattataataaatctccatcggtggtcaaca
 ttaaaaaaaaaaactccgtcgaccctagtagtctactcgctagaattttattttgtcttctaga
 cgagttactgatgtttgcttgctggcccatctaatecgcaggagaattgaagaagcaagcgctg
 ttgtcctgtcacacagctagctcgggtccctctatcattgttggaatgggtttattccccggggaata
 tgccctcgctcctctggcatcatccgcagcatatatacctcgtctcgtcttccacctcggATCA
 GGTAGGCGCGGCGCGGACCGCAACACGCCAGCTTTCTTGCTCTTGCTCTTAAGCAGCAGCAGCT
 TCCTGTCTCTCCAGCCACCATTCCATTCTCGCTCCTTGCTAATGAGGCTGGCTAGCCAGCTAAT
 GCAGCTCCGAACCTGTTT**TGTTGGTGGTCATTTAACC**ATGCATGCTTCGATCGATGGATTGGTG
 CATGCATGGATTATTGCATAGTGTGATGCATGTGGCGCATCAGTGCATGGT**TAGATGACCATCA**
GCAAACATGTTCTTGAGGCATGCAAGTTCTCTAGCTACACATATCAGAGATCGATCACCCTGC
 GGCGCCATGGCTACTTAATTGAAATGGAGGTTTGCAATTTCTCCGAACCCGGATGTCGTGATTCT
 GCTTCCGTTCTTGATCCAGGATCTTCCGGTCTTGTTCCCACTTACTTTCTTAGGAACTGG
 AATGGTTTCAACCTTAATTTGTTTATGTGTGTGTGCACATGCAGCGTGTGTTTCATATGGAGAT
 CGGTGCACTCACCTTGTAGCTTTAGCTTGATCCCTTCGCTAACAGAGAGTAAGATATCTTAG
 TCCTCTCGCCATCTCTCTCTAAACATATACGTATCA

Zm-miRMON18 (SEQ ID NO. 8800)

FIGURA 14

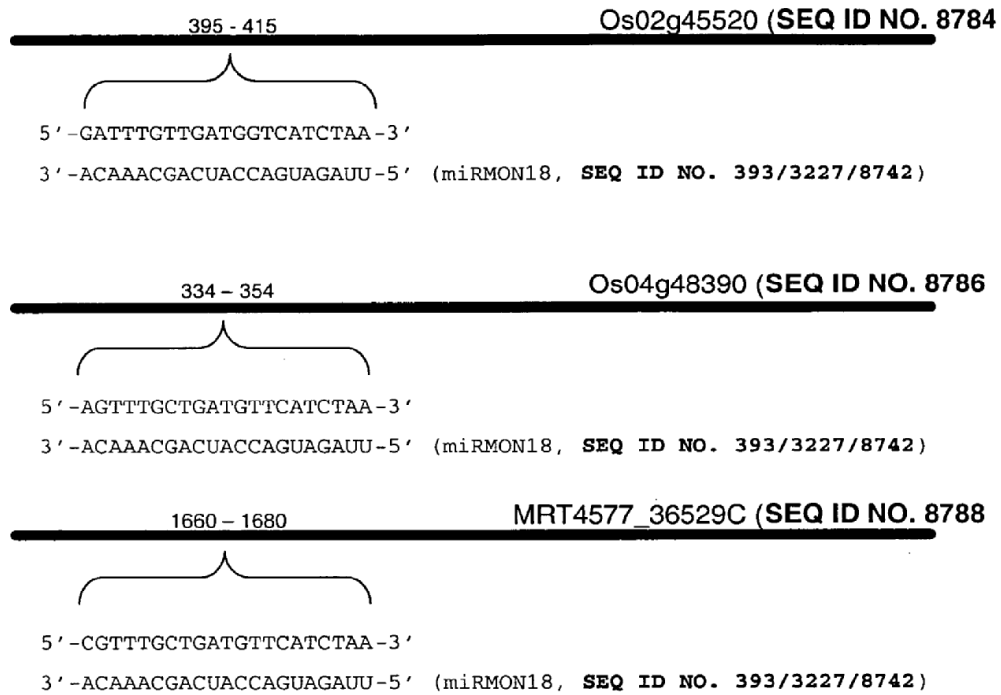
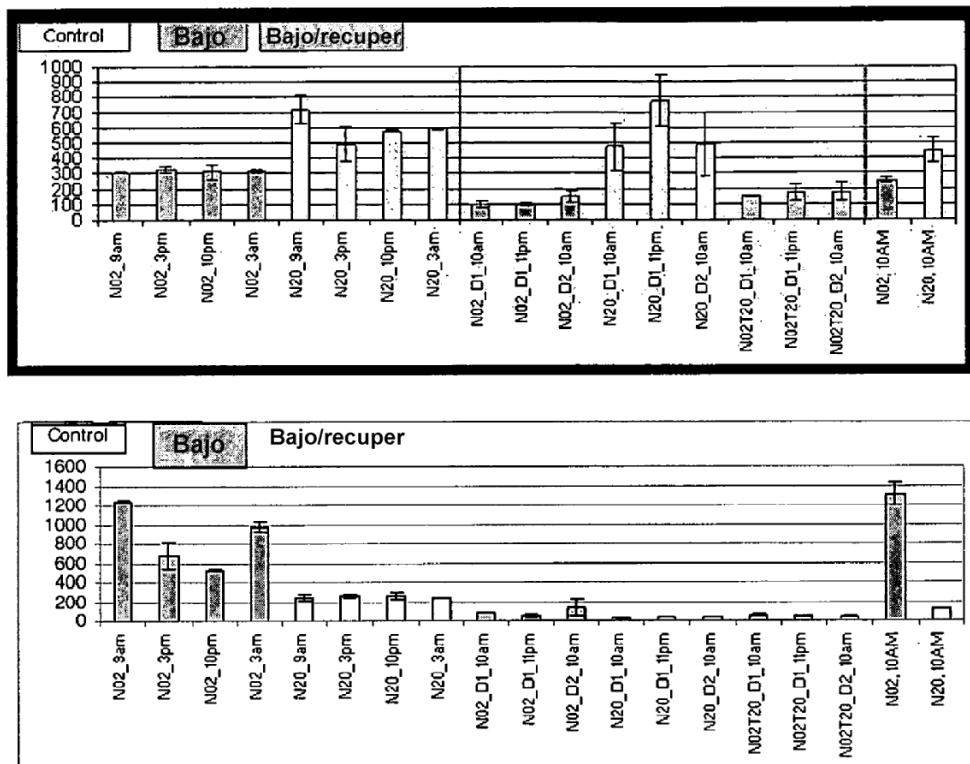


FIGURA 15



A

B

FIGURA 16

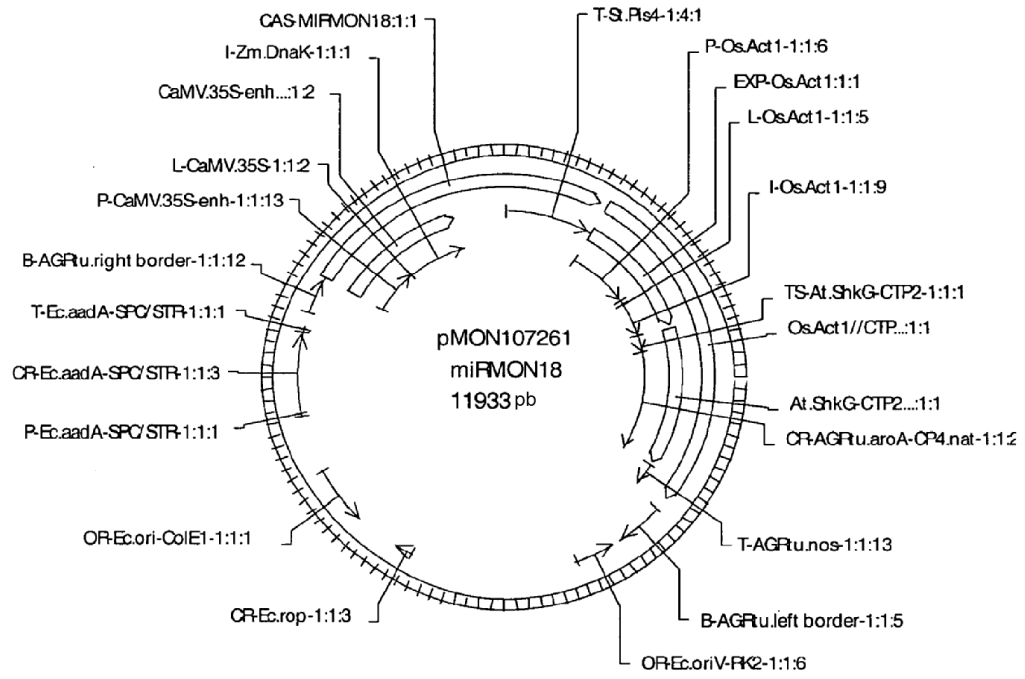
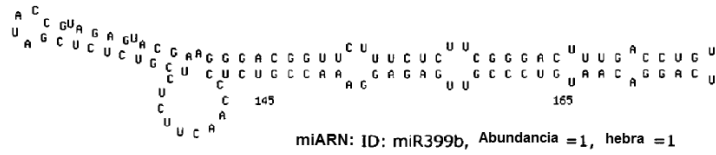
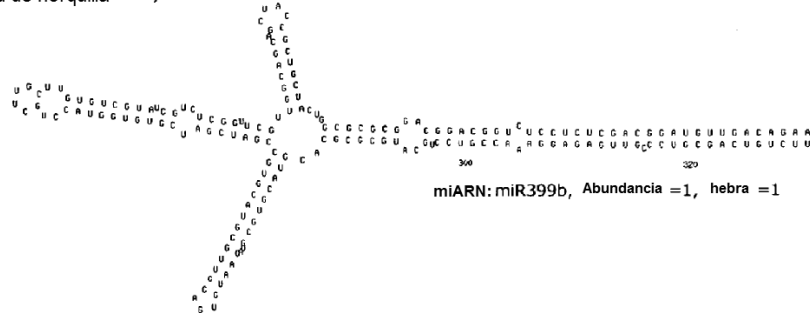


FIGURA 17

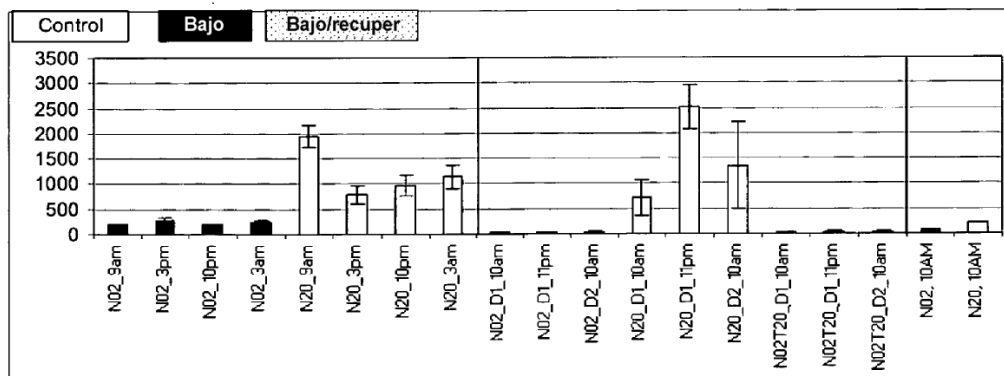
gen miARN: estructura replegada MRT4577_22484C.8 (longitud de horquilla=105) de **SEQ ID NO. 8816**



gen miARN: MRT4577_22487C.6 estructura replegada de: **SEQ ID NO. 8818**
(longitud de horquilla=195)

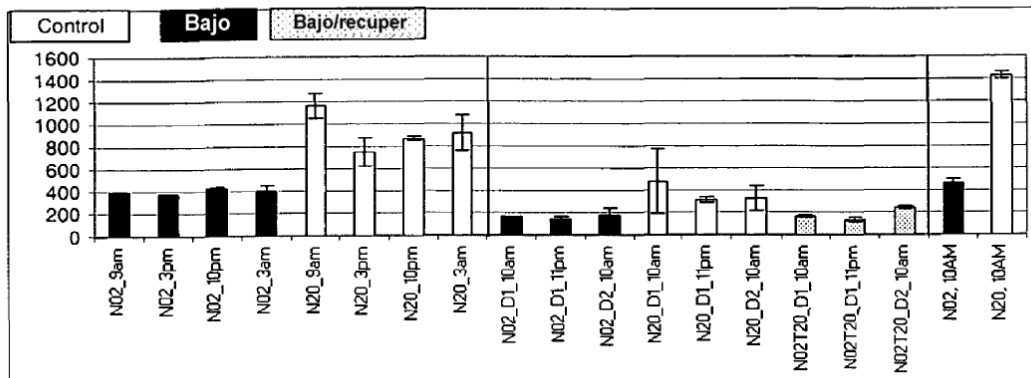


A

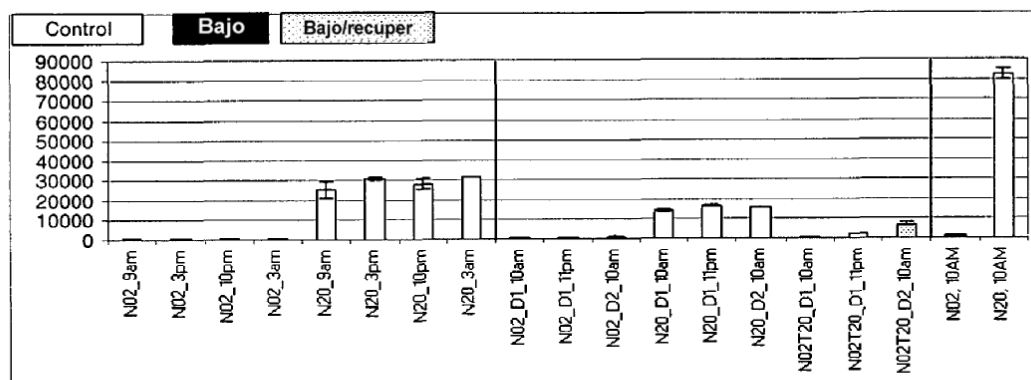
**B**

[illegible]

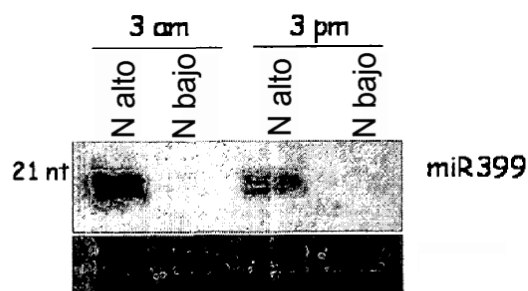
FIGURA 19



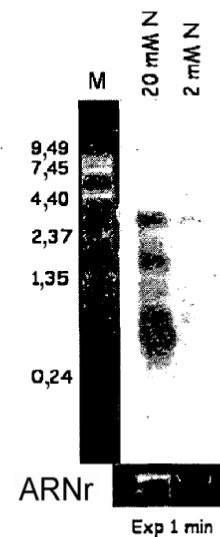
A



B

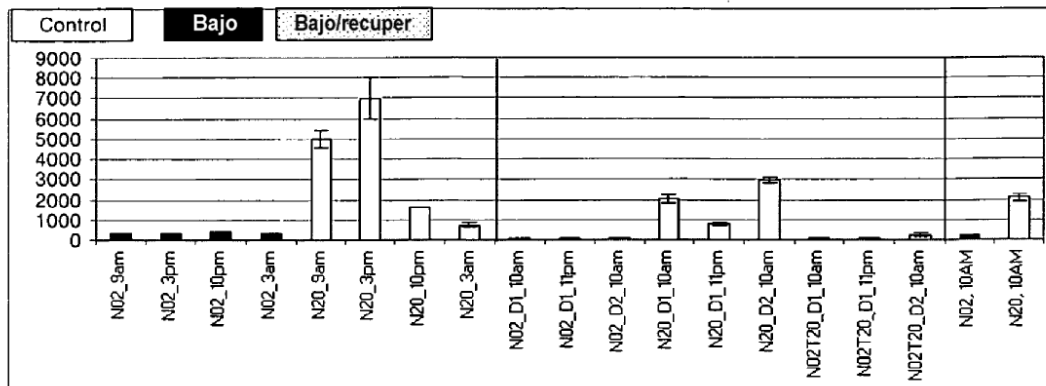


C

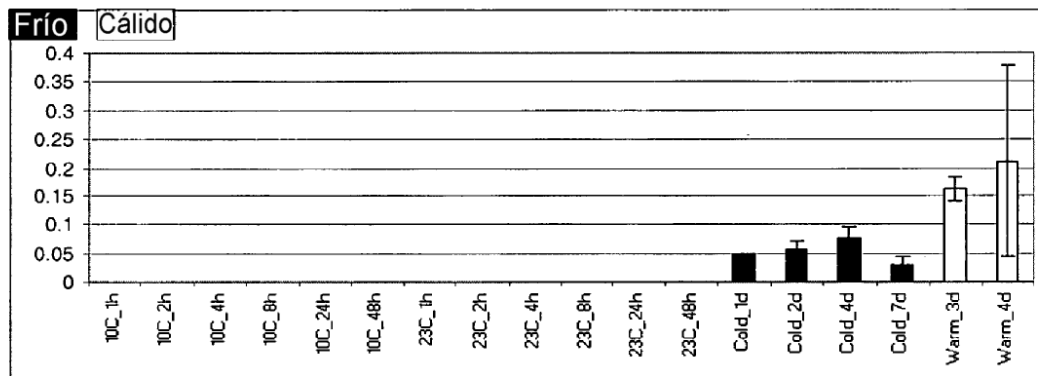


D

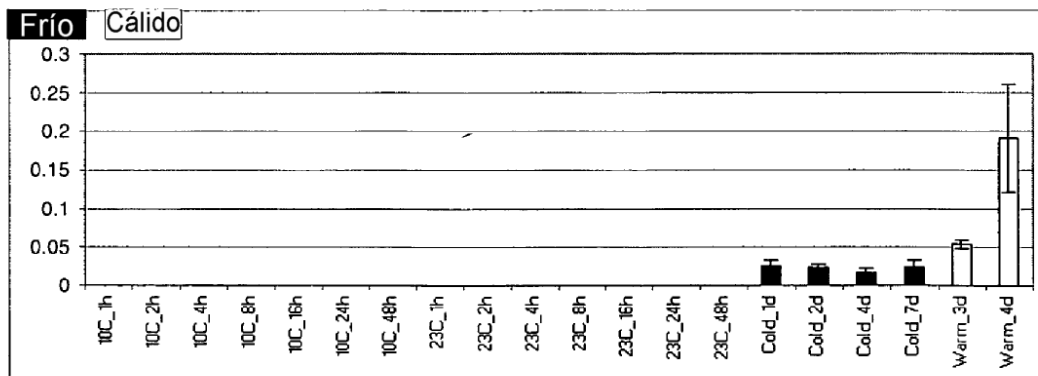
FIGURA 20



A

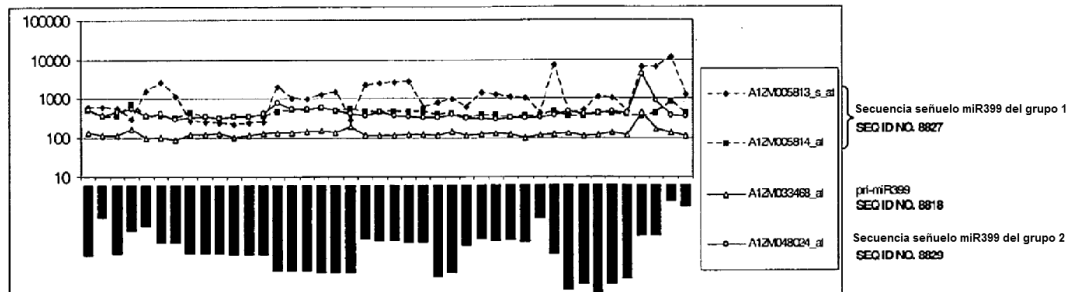


B

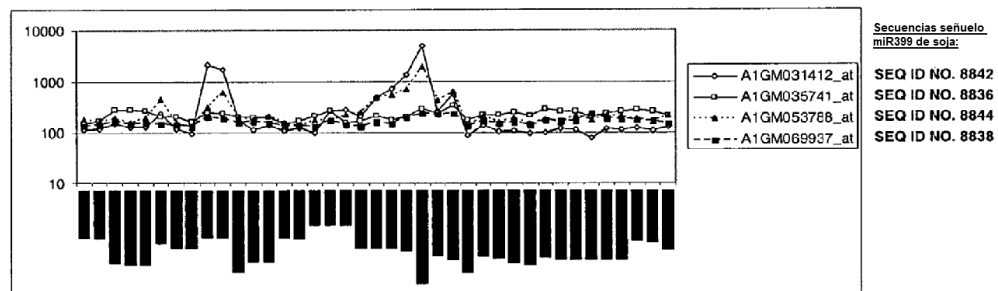


C

FIGURA 21

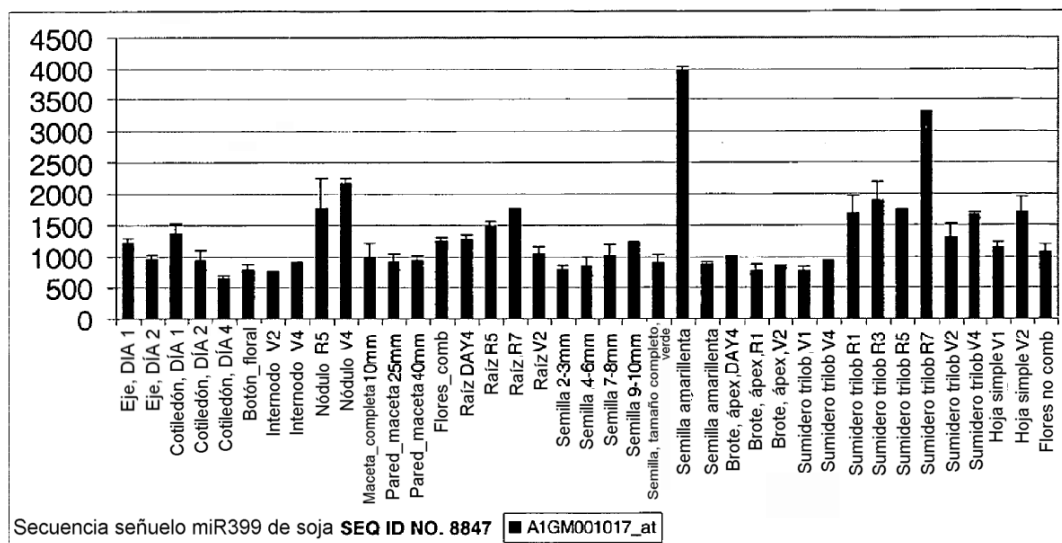


A

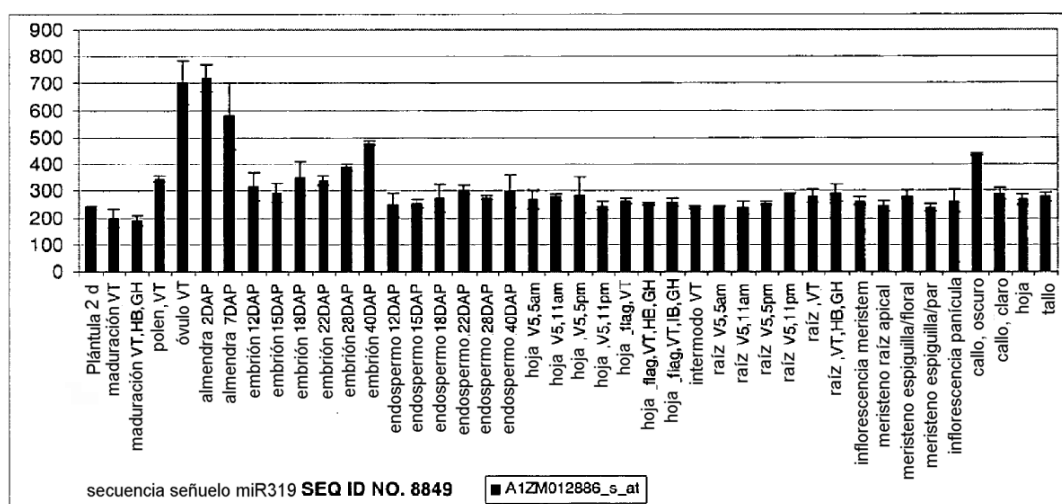


B

FIGURA 22



A



B