



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 256**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

A23L 1/0522 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03789405 .2**

96 Fecha de presentación : **19.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1578973**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.09.2005**

54

Título: **Células de plantas y plantas que sintetizan un almidón con una viscosidad final incrementada.**

30

Prioridad: **19.12.2002 EP 02028530**
29.08.2003 EP 03090275

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2009

73

Titular/es: **Bayer CropScience AG.**
Alfred-Nobel-Strasse 50
40789 Monheim, DE

72

Inventor/es: **Hoehne, Michaela;**
Frohberg, Claus y
Landschuetze, Volker

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 310 256 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).

ES 2 310 256 T3

DESCRIPCIÓN

Células de plantas y plantas que sintetizan un almidón con una viscosidad final incrementada.

5 La presente invención se refiere a células de plantas y plantas que están modificadas genéticamente, conduciendo la modificación genética a la reducción de la actividad de las proteínas SSIII y BEI y BEII en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje que no han sido modificadas genéticamente. Adicionalmente, la presente invención se refiere a medios y métodos para la generación de tales células de plantas y plantas. Dichas células de plantas y plantas sintetizan un almidón modificado que se caracteriza porque tiene un contenido de amilosa de al menos 30% y un contenido de fosfato que está incrementado en comparación con el almidón de plantas correspondientes de tipo salvaje que no han sido modificadas genéticamente y que tienen una viscosidad final en el análisis RVA que está incrementada respecto a la técnica anterior y/o una distribución modificada de cadenas laterales y/o una fuerza de gel incrementada en el Analizador de Textura y/o una morfología modificada del gránulo y/o un tamaño medio modificado del gránulo. La presente invención se refiere también por tanto al almidón sintetizado por las células de plantas y plantas de acuerdo con la invención, y a métodos para producir este almidón.

20 Teniendo en cuenta la importancia creciente que se asigna actualmente a los constituyentes de plantas como materias primas renovables, una de las tareas de la investigación biotecnológica es intentar una adaptación de estas materias primas vegetales a los requerimientos de la industria transformadora. Con objeto de hacer posible el uso de materias primas renovables en tantos campos de aplicación como sea posible, es adicionalmente necesario llegar a sustancias muy diversas.

25 El polisacárido almidón es un polímero de unidades químicamente uniformes, las moléculas de glucosa. Sin embargo, el mismo adquiere la forma de una mezcla muy compleja de formas diferentes de moléculas que difieren con respecto a su grado de polimerización y a la existencia de ramificaciones de las cadenas de glucosa. El almidón no es por consiguiente una materia prima uniforme. Se distingue entre dos componentes químicamente diferentes del almidón, amilosa y amilopectina. En las plantas típicas utilizadas para producción de almidón, tales como, por ejemplo, maíz, trigo o patata, el almidón de amilosa da cuenta de aproximadamente el 20%-30% y el almidón de amilopectina de aproximadamente 70%-80% del almidón sintetizado. La amilosa se ha considerado desde hace mucho tiempo como un polímero lineal constituido por monómeros de α -D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos α -1,4. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la presencia de puntos de ramificación glicosídicos α -1,6 (aprox. 0,1%) (Hizukuri y Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda *et al.*, Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

35 Están disponibles diversos métodos para determinar el contenido de amilosa. Algunos de estos métodos están basados en la capacidad de fijación de yodo de la amilosa, que puede determinarse potenciométricamente (Banks & Greenwood, en W. Banks & C.T. Greenwood, Starch and its components (pp. 51-66), Edimburgo, Edimburgh University Press), amperométricamente (Larson *et al.*, Analytical Chemistry 25(5), (1953), 802-804) o espectrofotométricamente (Morrison & Laignelet, J. Cereal Sc. 1, (1983), 9-20). El contenido de amilosa puede determinarse también calorimétricamente por medio de medidas DSC (calorimetría de barrido diferencial) (Kugimiya & Donovan, Journal of Food Science 46, (1981), 765-770; Sievert & Holm, Starch/Stärke 45(4), 1993, 136-139). Adicionalmente, es posible determinar el contenido de amilosa mediante el uso de cromatografía SEC (cromatografía de exclusión de tamaños) del almidón nativo o desramificado. Éste método ha sido recomendado en particular para determinar el contenido de amilosa de almidones modificados genéticamente (Gérard *et al.*, Carbohydrate Polymers 44, (2001), 19-27).

45 En contraste con la amilosa, la amilopectina exhibe un grado mayor de ramificación y tiene aproximadamente 4% de puntos de ramificación producidos por la existencia de enlaces glicosídicos α -1,6 adicionales. La amilopectina constituye una mezcla compleja de cadenas de glucosa con patrones de ramificación diferentes. Otra diferencia importante entre amilosa y amilopectina es su peso molecular. Mientras que la amilosa, dependiendo del origen del almidón, tiene un peso molecular de 5×10^5 - 10^6 Da, el peso molecular de la amilopectina está comprendido entre 10^7 y 10^8 Da. Las dos macromoléculas pueden distinguirse sobre la base de su peso molecular y sus diferentes propiedades físico-químicas, y la forma más simple de visualizar esto es por sus diferentes propiedades de fijación de yodo.

55 Además de la relación amilosa/amilopectina y el contenido de fosfato, las propiedades funcionales del almidón se ven afectadas notablemente por el peso molecular, el patrón de distribución de cadenas laterales, el contenido iónico, el contenido de lípidos y proteínas, el tamaño medio del gránulo y la morfología del gránulo y análogos. Propiedades funcionales importantes que pueden mencionarse en este contexto son solubilidad, el comportamiento de retrogradación, la capacidad de fijación de agua, las propiedades de formación de película, la viscosidad, las propiedades de gelatinización, la estabilidad congelación-descongelación, la estabilidad a los ácidos, la fuerza de gel y análogos. El tamaño del gránulo puede ser también importante para diversas aplicaciones.

65 Los técnicos expertos recurren frecuentemente a diferentes métodos para determinar las propiedades de gelatinización, uno de los cuales es la viscosidad final. Dependiendo del método utilizado, en particular los valores absolutos, pero también los valores relativos, pueden diferir entre una y la misma muestra de almidón. Un método rápido y eficaz para analizar las propiedades de gelatinización es el análisis RVA. Dependiendo de la elección de los parámetros y el perfil de temperatura en el análisis RVA, se obtienen diferentes perfiles de RVA para una y la misma muestra. Debe mencionarse que en algunos casos se utilizaron perfiles diferentes en la técnica anterior mencionada más adelante en esta memoria cuando se determinaron las propiedades de gelatinización.

ES 2 310 256 T3

Una revisión acerca de especies de plantas diferentes con una reducción de las enzimas participantes en la biosíntesis del almidón puede encontrarse en Kossmann y Lloyd (2000, *Critical Reviews in Plant Sciences* 19(3), 171-126).

5 Hasta la fecha, se han descrito plantas en las cuales se ha reducido la actividad de una proteína SSIII (Abel *et al.*, 1996, *The Plant Journal* 10(6), 9891-991; Lloyd *et al.*, 1999, *Biochemical Journal* 338, 515-521) o la actividad de una proteína BEI (Kossmann *et al.*, 1991, *Mol. Gen Genet.* 230, 39-44); Safford *et al.*, 1998, *Carbohydrate Polymers* 35, 155-168, o la actividad de una proteína BEII (Jobling *et al.*, 1999, *The Plant Journal* 18, o la actividad de una proteína BEI y una proteína BEII (Schwall *et al.*, 2000, *Nature Biotechnology* 18, 551-554; WO 96/34968), o la actividad
10 de una proteína BEI y una proteína SSIII (WO 00/08184). En las plantas en las que se ha reducido la actividad de una proteína SSIII, se observa un cambio relativo de las cadenas laterales de amilopectina desde cadenas más largas a cadenas más cortas (Lloyd *et al.*, 1999, *Biochemical Journal* 338, 515-521), un contenido 70% mayor de fosfato, ausencia de cambios en el contenido de amilosa (Abel *et al.*, 1996, *The Plant Journal* 10(6), 9891-991) y una viscosidad final reducida en el análisis RVA (Abel, 1995, PhD Thesis at the Freie Universität, Berlín) en comparación con plantas correspondientes de tipo salvaje. En tales plantas, que se describen también en WO 00/08184, puede observarse en el
15 almidón aislado un aumento de 197% en el contenido de fosfato, un aumento de 123% en el contenido de amilosa y una viscosidad final en el análisis RVA que disminuye hasta el 76% de la viscosidad del tipo salvaje, en comparación con las plantas de tipo salvaje no transformadas. Además, la fuerza de gel del almidón en cuestión disminuye hasta el 84% del tipo salvaje.

20 El análisis espectrofotométrico por el método de Morrison & Laignelet (1983, *J. Cereal Sc.* 1, 9-20) revela un contenido de amilosa de hasta un máximo de 89,14% (correspondiente a 344% del tipo salvaje) y un contenido de fosfato de almidón que corresponde a hasta un máximo de 522% del contenido de fosfato del almidón aislado a partir de plantas de tipo salvaje correspondientes en plantas con una actividad reducida tanto de una proteína BEI como de
25 una proteína BEII. El análisis RVA revela un valor de viscosidad final en estos almidones que se incrementa hasta un máximo de 237%. Además, la morfología modificada del gránulo en los gránulos de almidón aislados de dichas plantas se distingue por el hecho de que los gránulos tienen grandes hendiduras en el centro del gránulo en cuestión cuando se examinan al microscopio bajo luz polarizada.

30 Como resultado, el técnico experto está familiarizado con células de plantas y plantas y almidones sintetizados por las mismas que tienen un contenido incrementado de amilosa y fosfato pero cuya viscosidad final en el análisis RVA está incrementada en no más que hasta un máximo de 256% en comparación con las plantas de tipo salvaje que no se han modificado genéticamente. Hasta la fecha no se han alcanzado viscosidades finales mayores en el análisis RVA. Sin embargo, esto sería deseable, dado que tienen que emplearse menos sólidos de almidón, por ejemplo cuando se utiliza
35 un almidón de este tipo como espesante, agente gelificante o aglomerante, con objeto de alcanzar el efecto deseado. Esto permite por ejemplo la reducción de la cantidad de aditivos en alimentos humanos y piensos para animales, en productos para cuidado de la salud y en cosméticos. Sería posible también emplear cantidades menores de almidón cuando se utiliza un almidón de este tipo en colas, conduciendo a costes reducidos por ejemplo en la fabricación, verbigracia, de papel, cartulina y cartón aislante.

40 La presente invención está basada por tanto en el objeto de proporcionar células de plantas, plantas y almidón a partir de células de plantas o plantas adecuadas con un contenido incrementado de amilosa y un contenido incrementado de fosfato y, en el análisis RVA, una viscosidad final que está incrementada al menos en un 270% y/o una fuerza de gel incrementada del almidón gelatinizado y/o una morfología modificada del gránulo.

45 Este objeto se consigue proporcionando las realizaciones especificadas en las reivindicaciones de patente.

50 Un primer aspecto de la presente invención se refiere por tanto a una célula de planta que está modificada genéticamente, conduciendo la modificación genética a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEII que existen endógenamente en la célula de la planta en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente, mientras que las células de las plantas modificadas genéticamente sintetizan un almidón modificado, que después de gelatinización de una suspensión al 6% en agua,
55 forma un gel con una fuerza de gel que está incrementada al menos en un 300% en comparación con la fuerza de gel del almidón extraído de células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no se han modificado genéticamente.

60 En este contexto, la modificación genética puede ser cualquier modificación genética que conduzca a una reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y a una reducción de la actividad de una o más proteínas BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEII que existen endógenamente en la célula de la planta en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no se han modificado genéticamente.

65 Para los propósitos de la invención, la modificación genética puede abarcar por ejemplo la generación de células de plantas de acuerdo con la invención sometiendo uno o más genes a mutagénesis. El tipo de mutación es irrelevante con tal que el mismo conduzca a una reducción de la actividad de una proteína SSIII y/o una proteína BEI y/o una proteína BEII. En conexión con la presente invención, el término "mutagénesis" debe entenderse con el significado de

ES 2 310 256 T3

cualquier tipo de mutación, tal como, por ejemplo, deleciones, mutaciones puntuales (sustituciones de nucleótidos), inserciones, inversiones, conversiones de genes o translocación de cromosomas.

En este contexto, la mutación puede generarse utilizando agentes químicos o radiación de alta energía (por ejemplo rayos X, o radiación de neutrones, radiación gamma, o radiación UV). Agentes que pueden emplearse para generar mutaciones inducidas químicamente, y las mutaciones generadas de este modo por la acción de los mutágenos en cuestión, se describen, por ejemplo, por Ehrenberg y Husain, 1981, (*Mutation Research*, 86, 1-113), Müller, 1972 (*Biologisches Zentralblatt* 91(1), 31-48). La generación de mutantes de arroz utilizando rayos gamma, metanosulfonato de etilo (EMS), N-metil-N-nitrosourea o azida de sodio (NaN₃) se describe, por ejemplo, en Jauhar y Siddiq (1999), *Indian Journal of Genetics*, 59 (1), 23-28), en Rao (1977, *Cytologica* 42, 443-450), Gupta y Sharma (1990), *Oryza* 27, 217-219) y Satoh y Omura (1981, *Japanese Journal of Breeding* 31(3), 316-326). La generación de mutantes de trigo utilizando NaN₃ o hidrazida maleica se describe en Arora *et al.* (1992, *Anal. of Biology* 8(1), 65-69). Una revisión acerca de la generación de mutantes de trigo utilizando tipos diferentes de radiación de alta energía y agentes químicos se da en Scaraszia-Mugnozza *et al.* (1993, *Mutation Breeding Review* 10, 1-28). Svec *et al.* (1998, *Cereal Research Communications* 26(4), 391-396) describe el uso de N-etil-N-nitrosourea para generación de mutantes en trigo híbrido. El uso de MMS y radiación gamma para generación de mutantes de trigo se describe en Shashidhara *et al.* (1990, *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* 15(1), 20-23).

La generación de mutantes en especies de plantas cuya propagación es predominantemente vegetativa fue descrita por ejemplo para patatas que producen un almidón modificado (Hovenkamp-Hermelink *et al.* (1987) *Theoretical and Applied Genetics* 75, 217-221) y para hierbabuena con un rendimiento incrementado de aceite/calidad modificada del aceite (Dwivedi *et al.*, 2000, *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 22, 460-463). Todos estos métodos son adecuados en principio para generación de las células de plantas de acuerdo con la invención y el almidón producido por ellas.

Mutaciones en los genes relevantes, en particular en genes que codifican una proteína BEI y/o una proteína BEII y/o una proteína SSIII, pueden identificarse con ayuda de métodos conocidos por los técnicos expertos. Pueden emplearse en particular análisis basados en hibridaciones con sondas (transferencia Southern), la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación de las secuencias genómicas en cuestión, y la investigación de sustituciones individuales de nucleótidos. Un método de identificación de mutaciones con ayuda de patrones de hibridación es, por ejemplo, la investigación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Nam *et al.*, 1989, *The Plant Cell* 1, 699-705; Leister y Dean, 1993, *The Plant Journal* 4(4), 745-750). Un ejemplo de un método basado en PCR es el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Castiglioni *et al.*, 1998, *Genetics* 199, 2039-2056; Meksem *et al.*, 2001, *Molecular Genetics and Genomics* 265, 207-214; Meyer *et al.*, 1998, *Molecular and General Genetics* 259, 150-160). El uso de fragmentos amplificados escindidos con ayuda de endonucleasas de restricción (secuencias polimórficas escindidas amplificadas, CAPS) puede utilizarse también para identificación de mutaciones (Koniczny y Ausubel, 1993, *The Plant Journal* 4, 403-410; Jarvis *et al.*, 1994, *Plant Molecular Biology* 24, 685-687; Bachem *et al.*, 1996, *The Plant Journal* 9(5), 745-753). Métodos para determinación de SNPs han sido descritos, *inter alia*, por Qi *et al.* (2001, *Nucleic Acids Research* 29(22), e116) Drenkard *et al.* (2000, *Plant Physiology* 124, 1483-1492) y Cho *et al.* (1999, *Nature Genetics* 23, 203-207). Métodos que son particularmente adecuados son aquéllos que permiten analizar un gran número de plantas en un tiempo breve respecto a mutaciones en genes específicos. Un método de este tipo, conocido como TILLING (direccionamiento de lesiones locales inducidas en genomas) ha sido descrito por McCallum *et al.* (2000, *Plant Physiology* 123, 439-442).

El uso de todos estos métodos es adecuado en principio para los propósitos de la presente invención.

Hoogkamp *et al.* (2000, *Potato Research* 43, 179-189) han aislado mutantes estables de patata que contienen un almidón exento de amilosa. Estas plantas ya no sintetizan enzima activa para una almidón-sintasa fijada a los gránulos (GBSS I). Después de someter estas plantas a otra mutagénesis, pueden seleccionarse aquéllas que tienen adicionalmente mutaciones en los genes que están implicados en la biosíntesis del almidón. De este modo podrían generarse plantas que sintetizan almidón con características mejoradas. Utilizando el método adecuado, es también posible identificar y aislar las células de plantas de acuerdo con la invención que producen un almidón de acuerdo con la invención.

Además, las células de plantas de acuerdo con la invención pueden generarse también con ayuda de transposones homólogos, es decir transposones que están presentes naturalmente en las células de las plantas en cuestión. Una descripción detallada de este método se da más adelante en esta memoria.

La totalidad de los métodos arriba mencionados son adecuados en principio para generación de células de plantas de acuerdo con la invención y el almidón modificado sintetizado por ellas. La presente invención se refiere también por tanto a métodos para generación de células de plantas modificadas genéticamente que sintetizan un almidón modificado, caracterizándose este almidón por el hecho de que tiene un contenido de amilosa de al menos 30%, porque tiene un contenido incrementado de fosfato en comparación con el almidón de las células de plantas de tipo salvaje correspondientes que no han sido modificadas genéticamente y porque tiene una viscosidad final incrementada en el análisis RVA en comparación con el almidón de las plantas de tipo salvaje correspondientes que no han sido modificadas genéticamente.

ES 2 310 256 T3

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a métodos para generar una célula de planta que sintetiza un almidón modificado, que comprenden la modificación genética de la célula de la planta, conduciendo la modificación genética a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEII que existen endógenamente en la célula de la planta, en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a métodos para generar una planta modificada genéticamente que sintetiza un almidón modificado, en los cuales

- a) se genera una célula de planta como se ha descrito arriba;
- b) se regenera una planta a partir de, o utilizando, la célula de la planta generada de acuerdo con a); y
- c) en caso apropiado, se generan plantas adicionales a partir de la planta generada de acuerdo con el paso b).

En conexión con la presente invención, el término “modificado genéticamente” significa que la información genética de la célula de planta está alterada.

En este contexto, se observa una reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y una reducción de la actividad de una o más proteínas BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y una reducción de la actividad de una o más proteínas BEII que existen endógenamente en la célula de la planta en las células de las plantas de acuerdo con la invención en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente.

Las modificaciones genéticas para generar las células de plantas de acuerdo con la invención pueden realizarse simultáneamente o en pasos consecutivos. En este contexto, cada modificación genética puede conducir a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII. El material de partida puede ser, o bien plantas de tipo salvaje o células de plantas de tipo salvaje en las cuales no se ha realizado modificación genética previa alguna a fin de reducir la actividad de una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII, o bien células de plantas o plantas modificadas genéticamente en las cuales la actividad de una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII ha sido ya realizada por modificación genética. Si dichas plantas (células de plantas) genéticamente modificadas constituyen el material de partida, las modificaciones genéticas que se llevan a cabo subsiguientemente se refieren preferiblemente sólo en cada caso a la actividad de una o más proteínas cuya actividad no ha sido reducida todavía (SSIII, BEI o BEII).

Por ejemplo, se observa una reducción de la expresión de uno o más genes SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y una reducción de la expresión de uno o más genes BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y una reducción de la expresión de uno o más genes BEII que existen endógenamente en la célula de la planta y/o una reducción en cada caso de la actividad de una o más de las proteínas arriba mencionadas que existen en la célula de la planta en las células de las plantas modificadas genéticamente de acuerdo con la invención en comparación con células de plantas, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente.

Para los propósitos de la presente invención, el término “reducción de la actividad” se refiere a una reducción de la expresión de genes endógenos que codifican proteínas SSIII, BEI y/o BEII, y/o una reducción de la cantidad de proteína SSIII, BEI y/o BEII en las células y/o una reducción de la actividad enzimática de las proteínas SSIII, BEI y/o BEII en las células.

La reducción de la expresión puede determinarse por ejemplo por medida de la cantidad de transcritos que codifican las proteínas SSIII, BEI o BEII, por ejemplo por análisis mediante transferencia Northern o RT-PCR. Una reducción significa preferiblemente, en este contexto, una reducción de la cantidad de transcritos de al menos 50%, en particular al menos 70%, preferiblemente al menos 85%, y de modo especialmente preferible al menos 95% en comparación con células correspondientes que no han sido modificadas genéticamente.

La reducción de la cantidad de proteínas SSIII, BEI y/o BEII que da como resultado una actividad reducida de estas proteínas en las células de las plantas en cuestión puede determinarse por ejemplo por métodos inmunológicos tales como análisis por transferencia Western, ELISA (ensayo de inmunosorbente unido a enzima) o RIA (radio-inmunoensayo). En este contexto, una reducción significa preferiblemente una reducción de la cantidad de proteína SSIII, BEI y/o BEII de al menos 50%, en particular al menos 70%, preferiblemente al menos 85% y de modo especialmente preferible al menos 95% en comparación con células correspondientes que no han sido modificadas genéticamente.

En conexión con la presente invención, la proteína SSIII se entiende con el significado de una clase de almidón-sintasas solubles (ADP-glucosa-1,4-alfa-D-glucano-4-alfa-D-glucosiltransferasa; EC2.4.1.21). Las almidón-sintasas solubles catalizan una reacción de glicosilación, en la cual los residuos glucosa del sustrato ADP-glucosa se transfieren a cadenas de glucano con enlaces alfa-1,4, con formación de un enlace alfa-1,4 (ADP-glucosa + {(1,4)-alfa-D-glucosilo}(N) \rightleftharpoons ADP + {(1,4)-alfa-D-glucosilo}(N+)).

ES 2 310 256 T3

Proteínas SSIII han sido descritas, por ejemplo, por Marshall *et al.* (The Plant Cell 8; (1996); 1121-1135), Li *et al.* (2000, Plant Physiology 123, 613-624), Abel *et al.* (The Plant Journal 10(6); (1996); 981-991) y en WO 00/66745. La estructura de las proteínas SSIII muestra frecuentemente una secuencia de dominios. En el término N, las proteínas SSIII tienen un péptido de señal para el transporte a los plástidos. Hacia el término C, esto va seguido por una región N-terminal, una región específica de SSIII y un dominio catalítico (Li *et al.*, 2000, Plant Physiology 123, 613-624). Análisis ulteriores que se basan en alineaciones de secuencia primarias (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), revelaron que la proteína SSIII de patata tiene lo que se conoce como un dominio de fijación de carbohidratos (CBM). Este dominio (motivo Pfam cbm 25) comprende los aminoácidos 377 a 437 de la secuencia de la proteína SSIII de patata que se muestra en SEQ ID No. 2. En conexión con la presente invención, una proteína SSIII debe entenderse por consiguiente con el significado de almidón-sintasas que tienen al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, de modo especialmente preferible al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y en particular al menos 90% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ ID No. 3.

El término homología, o identidad, debe entenderse con el significado del número de aminoácidos coincidentes (identidad) con otras proteínas, expresado en porcentaje. La identidad se determina preferiblemente por comparación de la Seq. ID No. 3 con otras proteínas con ayuda de programas de ordenador. Si las secuencias que se comparan entre sí son de longitud diferente, la identidad debe determinarse de tal manera que el número de aminoácidos que comparte la secuencia más corta con la secuencia más larga determina el porcentaje de identidad. La identidad puede determinarse rutinariamente por medio de programas de ordenador conocidos que están disponibles públicamente tales como, por ejemplo, ClustalW (Thompson *et al.*, Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680). ClustalW ha sido puesto a disposición del público por Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) y Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), Laboratorio Europeo de Biología Molecular, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemania. ClustalW puede descargarse análogamente de diversas páginas de internet, entre otras la IGBMC ((Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, Francia; <ftp://ftpigbmc.u-strasbg.fr/pub/>) y la EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) y todas las páginas reflejadas en internet de la EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1 SD, Reino Unido).

Si se utiliza el programa de ordenador ClustalW, Versión 1.8 para determinar la identidad entre, por ejemplo, la proteína de referencia de la presente solicitud y otras proteínas, deben ajustarse los parámetros siguientes: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAPOPEN=10, GAPEXTEND=0,05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOGAP, NOHGAP.

Una posibilidad de descubrir secuencias similares consiste en realizar búsquedas en bases de datos de secuencias. En este caso, se introducen una o más secuencias como lo que se conoce como una consulta. Esta secuencia de consulta se compara luego con secuencias presentes en las bases de datos seleccionadas utilizando programas estadísticos de ordenador. Tales consultas a las bases de datos (búsquedas por ráfagas) son conocidas por el técnico experto y pueden realizarse en suministradores diferentes. Si, por ejemplo, se realiza una consulta a una base de datos en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), deberían utilizarse los ajustes estándar para la consulta de comparación respectiva. Para comparaciones de secuencias de proteínas (blastp), estos ajustes son: entrada límite = no activada; filtro = activado de baja complejidad; valor esperado = 10; tamaño de palabra = 3; matriz = BLOSUM62; costes de laguna: existencia = 11, extensión = 1. El resultado de una búsqueda de este tipo es, entre otros parámetros, el grado de identidad entre la secuencia consultada y las secuencias similares encontradas en las bases de datos.

Así, una proteína SSIII debe entenderse con el significado, en conexión con la presente invención, de almidón-sintasas que, cuando se utiliza al menos uno de los métodos arriba descritos para determinar la identidad con la secuencia que se muestra en SEQ ID No. 3 tienen al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, de modo especialmente preferible al menos 70%, de modo más preferible al menos 80% y en particular al menos 90% de identidad.

Para los propósitos de la presente invención, el término gen SSIII debe entenderse con el significado de una molécula de ácido nucleico (DNA, cDNA, RNA) que codifica una proteína SSIII, preferiblemente de patata. Moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína SSIII han sido descritas para una diversidad de especies de plantas tales como, por ejemplo, patata (Abel *et al.*, The Plant Journal 10(6); 1996; 981-991), trigo (WO 00/66745, Li *et al.*, 2000, Plant Physiology 123, 613-624; Genbank Acc. No AF258608; Genbank Acc. No AF258609), maíz (Gao *et al.*, 1998, Plant Cell 10 (3), 399-412; Genbank Acc. No AF023159), *Vigna* (Genbank Acc. No AJ225088), arroz (Genbank Acc. No AY100469; Genbank Acc. No AF43291) y *Arabidopsis* (Genbank Acc. No AC007296).

Para los propósitos de la presente invención, el término "enzima ramificadora" o "proteína BE" (α -1,4-glucano: α -1,4-glucano-6-glicosiltransferasa, E.C.2.4.1.18) debe entenderse con el significado de una proteína que cataliza una reacción de transglucosilación en la cual los enlaces α -1,4 de un donante de α -1,4-glucano se hidrolizan y las cadenas de α -1,4-glucano liberadas en este proceso se transfieren a una cadena aceptora de α -1,4-glucano, en donde aquéllas se convierten en enlaces α -1,6.

El término "proteína BEI" debe entenderse, para los propósitos de la presente invención, con el significado de una enzima ramificadora de isoforma I (enzima ramificadora = BE). La proteína BEI se deriva preferiblemente de plantas de patata. En este contexto, la terminología de isoformas está basada en la nomenclatura propuesta por Smith-White y Preiss (Smith-White and Preiss, Plant Mol. Biol. Rep. 12, (1994), 67-71, Larsson *et al.*, Plant Mol. Biol. 37, (1998),

ES 2 310 256 T3

505-511). Esta nomenclatura supone que todas las enzimas que tienen un mayor grado de homología (identidad) al nivel de aminoácidos con la proteína BEI de maíz ((GenBank Acc. No. D11081; Baba *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1), (1991), 87-94; Kim *et al.* Gene 216, (1998), 233-243) que con la proteína BEII del maíz (GenBank Acc. No. AF072725, U65948) se consideran como enzimas ramificadoras de isoforma I, abreviadas como proteínas BEI.

El término “proteína BEII” debe entenderse con el significado, para los propósitos de la presente invención, de una enzima ramificadora de isoforma II (enzima ramificadora = BE). Esta enzima procede preferiblemente de plantas de patata. En conexión con la presente invención, se hará referencia a todas las enzimas que, al nivel de aminoácidos, tienen un mayor grado de homología (identidad) con la proteína BEII del maíz (GenBank Acc. No. AF072725) que con la proteína BEI del maíz (GenBank Acc. No. D11081, AF072724), como proteína BEII.

El término “gen BEI” debe entenderse, para los propósitos de la presente invención, con el significado de una molécula de ácido nucleico (cDNA, DNA), que codifica una “proteína BEI”, preferiblemente una proteína BEI de plantas de patata. Tales moléculas de ácido nucleico han sido descritas para un gran número de plantas, por ejemplo para maíz ((Genbank Acc. No. D 11081, AF 072724), arroz (Genbank Acc. No. D11082), guisante (Genbank Acc. No. X80010) y patata. Diversas formas del gen BEI, o la proteína BEI, de patata han sido descritas, por ejemplo, por Khoshnoodi *et al.*, Eur. J. Biochem. 242 (1), 148-155 (1996), Genbank Acc. No. Y 08786 y por Kossmann *et al.*, Mol. Gen. Genet. 230, (1991), 39-44). En las plantas de patata, el gen BEI se expresa predominantemente en los tubérculos y en un grado mucho menor en las hojas (Larsson *et al.*, Plant. Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

El término “gen BEII” debe entenderse, para los propósitos de la presente invención, con el significado de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo cDNA, DNA) que codifica una “proteína BEII”, preferiblemente una proteína BEII de plantas de patata. Tales moléculas de ácido nucleico han sido descritas para un gran número de plantas, por ejemplo para patata (GenBank Acc. No. AJ000004, AJ011888, AJ011889, AJ011885, AJ011890, EMBL GenBank A58164), maíz (AF 072725, U65948), cebada (AF064561), arroz (D16201) y trigo (AF 286319). En las plantas de patata, el gen BEII se expresa predominantemente en los tubérculos y en un grado mucho menor en las hojas (Larsson *et al.*, Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

El término “transgénico” debe entenderse, en la presente invención, con el significado de que la información genética de las células de plantas de acuerdo con la invención se desvía de las células de plantas correspondientes que no han sido modificadas genéticamente debido a la introducción de una molécula de ácido nucleico extraño o varias moléculas de ácido nucleico extraño en la célula.

En una realización adicional de la presente invención, la modificación genética de la célula de planta transgénica de acuerdo con la invención consiste en la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico extraño cuya presencia y/o expresión conduce a la reducción de la actividad de las proteínas SSIII y BEI y BEII en comparación con las células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente. Específicamente, el término “manipulación genética” debe entenderse con el significado de la introducción de moléculas de ácido nucleico homólogas y/o heterólogas y/o de moléculas de ácido nucleico extraño que se han sometido a mutagénesis en una célula de planta, en donde dicha introducción de estas moléculas conduce a la reducción de la actividad de una proteína SSIII y/o una proteína BEI y/o una proteína BEII.

El término “molécula de ácido nucleico extraño” o “moléculas de ácido nucleico extraño” debe entenderse, para los propósitos de la presente invención, con el significado de una molécula de este tipo que o bien no existe naturalmente en las células de las plantas en cuestión, o que no existe naturalmente en las células de las plantas en la configuración espacial específica, o que está localizada en un sitio en el genoma de la célula de la planta en el cual la misma no se encuentra naturalmente. La molécula de ácido nucleico extraño es preferiblemente una molécula recombinante que se compone de varios elementos cuya combinación, o configuración espacial específica, no existe naturalmente en las células de las plantas.

La o las moléculas de ácido nucleico extraño que se utiliza o se utilizan para la modificación genética pueden tomar la forma de un constructo de ácido nucleico híbrido o de varios constructos de ácido nucleico separados; en particular de lo que se conoce como constructos simples, dobles y triples. Así pues, la molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, lo que se conoce como un “constructo triple”, que se entiende con el significado de un solo vector individual para transformación de plantas que contiene no sólo la información genética para inhibir la expresión de uno o más genes SSIII endógenos, sino también la información genética para inhibir la expresión de uno o más genes BEI y de uno o más genes BEII, o cuya presencia, o expresión, conduce a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII, BEI y BEII.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico extraño puede ser lo que se conoce como un “constructo doble”, que se entiende con el significado de un vector para transformación de plantas que contiene la información genética para inhibir la expresión de dos de los tres genes diana (gen SSIII, BEI, BEII) o cuya presencia, o expresión, conduce a la solución de la actividad de dos de las tres proteínas diana (proteínas SSIII, BEI, BEII). La inhibición de la expresión del tercer gen diana y/o la reducción de la actividad de la tercera proteína diana se efectúa, en esta realización de la invención, con ayuda de una molécula de ácido nucleico extraño separada que contiene la información genética relevante para inhibir este tercer gen diana.

ES 2 310 256 T3

En una realización adicional de la invención, no es un constructo triple lo que se introduce en el genoma de la célula de la planta, sino que se introducen varias moléculas de ácido nucleico extraño diferentes, siendo una de estas moléculas de ácido nucleico extraño, por ejemplo, una molécula de DNA que constituye, por ejemplo, un constructo de cosupresión que efectúa una reducción de la expresión de uno o más genes SSIII endógenos, y siendo una molécula de ácido nucleico extraño adicional una molécula de DNA que codifica, por ejemplo, un RNA antisentido que efectúa una reducción de la expresión de uno o más genes BEI y/o BEII endógenos. Cuando se construyen las moléculas de ácido nucleico extraño, sin embargo, el uso de cualquier combinación de constructos antisentido, de cosupresión, de ribozima y de RNA bicatenario o mutagénesis *in vivo* que conduce a una reducción simultánea de la expresión génica de genes endógenos que codifican una o más proteínas SSIII, BEI y BEII o que conduce a una reducción simultánea de la actividad de una o más proteínas SSIII, BEI y BEII, es también adecuado en principio.

Las moléculas de ácido nucleico extraño pueden introducirse en el genoma de la célula de la planta sea simultáneamente (“cotransformación”) o bien una tras otra, es decir sucesivamente en momentos diferentes (“supertransformación”).

Las moléculas de ácido nucleico extraño pueden introducirse también en plantas individuales diferentes de una misma especie. Esto puede dar lugar a plantas en las cuales se reduce la actividad de una proteína diana, o dos proteínas diana, (BEI, BEII, SSIII). La hibridación subsiguiente puede dar lugar luego a plantas en las cuales se ha reducido la actividad de la totalidad de las tres proteínas diana.

En lugar de una célula de planta o planta de tipo salvaje, un mutante que se distingue por exhibir ya una actividad reducida de una o más proteínas diana (BEI, BEII, SSIII) puede utilizarse ulteriormente para introducir una molécula de ácido nucleico extraño o para generar las células de plantas o plantas de acuerdo con la invención. Los mutantes pueden tomar la forma de mutantes existentes espontáneamente o bien de mutantes que han sido generados por la aplicación específica de mutágenos. Posibilidades de generación de tales mutantes han sido descritas anteriormente con mayor detalle.

Las células de plantas de acuerdo con la invención y su almidón pueden generarse, o producirse, utilizando lo que se conoce como mutagénesis de inserción (artículo de revisión: Thorneycroft *et al.*, 2001, *Journal of Experimental Botany* 52(361), 1593-1601). La mutagénesis de inserción debe entenderse con el significado, en particular, de la inserción de transposones o lo que se conoce como DNA de transferencia (T-DNA) en un gen que codifica una proteína BEI y/o proteína BEII y/o una proteína SSIII, reduciendo de este modo la actividad de dichas proteínas en la célula en cuestión.

Los transposones pueden tomar la forma de transposones que existen naturalmente en la célula (transposones endógenos) o bien aquéllos que no existen naturalmente en dicha célula pero han sido introducidos en la célula por medio de métodos recombinantes, tal como, por ejemplo, por transformación de la célula (transposones heterólogos). La modificación de la expresión de los genes por medio de transposones es conocida por los técnicos expertos. Una revisión de la utilización de transposones endógenos y heterólogos como herramientas en biotecnología vegetal puede encontrarse en Ramachandran y Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252). La posibilidad de identificar mutantes en los cuales han sido desactivados genes específicos por mutagénesis de inserción de transposones puede encontrarse en una revisión realizada por Maes *et al.*, (1999) *Trends in Plant Science* 4(3), 90-96). La generación de mutantes de arroz con ayuda de transposones endógenos ha sido descrita por Hirochika (2001, *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 118-122). La identificación de genes de maíz con ayuda de retrotransposones endógenos se expone, por ejemplo, en Hanley *et al.* (2000, *The Plant Journal* 22(4), 557-566). La posibilidad de generar mutantes con la ayuda de retrotransposones y métodos para identificación de mutantes se describen por Kumar e Hirochika (2001, *Trends in Plant Science* 6(3), 127-134). La actividad de transposones heterólogos en diferentes especies ha sido descrita tanto para plantas dicotiledóneas como para plantas monocotiledóneas, por ejemplo para arroz ((Greco *et al.*, 2001, *Plant Physiology* 125, 1175-1177; Liu *et al.*, 1999, *Molecular and General Genetics* 262, 413-420; Hiroyuki *et al.*, 1999, *The Plant Journal* 19 (5), 605-613; Jeon and Gynheung, 2001, *Plant Science* 161, 211-219), cebada (2000, Koprek *et al.*, *The Plant Journal* 24 (2), 253-263), *Arabidopsis thaliana* (Aarts *et al.*, 1993, *Nature* 363, 715-717, Schmidt y Willmitzer, 1989, *Molecular and General Genetics* 220, 17-24; Altmann *et al.*, 1992, *Theoretical and Applied Genetics* 84, 371-383; Tissier *et al.*, 1999, *The Plant Cell* 11, 1841-1852), tomate (Belzile y Yoder, 1992, *The Plant Journal* 2 (2), 173-179) y patata (Frey *et al.*, 1989, *Molecular and General Genetics* 217, 172-177; Knapp *et al.*, 1988, *Molecular and General Genetics* 213, 285-290).

En principio, las células de plantas y plantas de acuerdo con la invención, y el almidón producido por ellas, pueden generarse, o producirse, con ayuda de transposones tanto homólogos como heterólogos, incluyendo el uso de transposones homólogos también aquellos transposones que están ya naturalmente presentes en el genoma de la planta.

La mutagénesis de inserción de T-DNA está basada en el hecho de que ciertos segmentos (T-DNA) de plásmidos Ti de *Agrobacterium* son capaces de integrarse en el genoma de las células de las plantas. El sitio de integración en el cromosoma de la planta no es fijo sino que puede tener lugar en cualquier posición. Si el T-DNA se integra en un segmento del cromosoma que constituye una función del gen, ello puede conducir a una modificación de la expresión génica y por tanto también a una actividad alterada de una proteína codificada por el gen en cuestión. En particular, la integración de un T-DNA en la región codificante de una proteína significa frecuentemente que la proteína en cuestión ya no puede ser sintetizada en forma activa, o no puede serlo en absoluto, por la célula en cuestión. El uso de inserciones de T-DNA para la generación de mutantes ha sido descrito, por ejemplo, para *Arabidopsis thaliana*

ES 2 310 256 T3

(Krysan *et al.*, 1999, *The Plant Cell* 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan y Feldmann, 1997, *Trends in genetics* 13 (4), 152-156; Parinov y Sundaresan, 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11, 157-161) y arroz (Jeon y An, 2001, *Plant Science* 161, 211-219; Jeon *et al.*, 2000, *The Plant Journal* 22 (6), 561-570). Métodos para identificación de mutantes que han sido generados con ayuda de mutagénesis de inserción de T-DNA han sido descritos, entre otros, por Young *et al.*, (2001, *Plant Physiology* 125, 513-518), Parinov *et al.* (1999, *The Plant cell* 11, 2263-2270), Thorneycroft *et al.* (2001, *Journal of Experimental Botany* 52, 1593-1601), y McKinney *et al.* (1995, *The Plant Journal* 8 (4), 613-622).

En principio, la mutagénesis de T-DNA es adecuada para generar las células de las plantas de acuerdo con la invención y para producir el almidón producido por ellas.

En una realización adicional de la presente invención, la presencia y/o la expresión de una o más moléculas de ácido nucleico extraño conduce a la inhibición de la expresión de genes endógenos que codifican proteínas SSIII, proteínas BEI y proteínas BEII.

Las células de plantas de acuerdo con la invención pueden ser generadas por diversos métodos con los cuales está familiarizado el técnico experto, por ejemplo por aquéllos que conducen a una inhibición de la expresión de genes endógenos que codifican una proteína SSIII, BEI o BEII. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, la expresión de un RNA antisentido correspondiente o un constructo de RNA bicatenario, la provisión de moléculas o vectores que confieren un efecto de cosupresión, la expresión de una ribozima construida convenientemente que escinde específicamente transcritos que codifican una proteína SSIII, BEI o BEII, o lo que se conoce como "mutagénesis *in vivo*". Además, la reducción de la actividad de SSIII y/o BEI y/o BEII, en las células de las plantas puede efectuarse también por la expresión simultánea de moléculas de RNA de sentido y antisentido del gen diana específico a reprimir, preferiblemente el gen SSIII y/o BEI y/o BEII. El técnico experto está familiarizado con estos métodos. Además, es sabido que la generación en plantas de moléculas de RNA bicatenario de secuencias promotoras *in trans* puede conducir a metilación y desactivación transcripcional de copias homólogas de este promotor (Mette *et al.*, *EMBO J.* 19, (2000), 5194-5201).

Otros métodos para reducir la actividad de proteínas se describen más adelante en esta memoria.

Todos estos métodos están basados en la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico extraño en el genoma de las células de las plantas.

Para inhibir la expresión génica por medio de tecnología antisentido o de cosupresión es posible utilizar, por ejemplo, una molécula de DNA que abarca la totalidad de la secuencia que codifica una proteína SSIII y/o BEI y/o BEII que incluye cualesquiera secuencias flanqueantes que puedan estar presentes, o bien moléculas de DNA que abarcan únicamente partes de la secuencia codificante, que deben ser suficientemente largas a fin de producir un efecto antisentido, o efecto de cosupresión, en las células. Secuencias que son adecuadas tienen en general una longitud mínima no inferior a 15 pb, preferiblemente una longitud de 100-500 pb, y para inhibición eficaz antisentido o de cosupresión en particular secuencias que tienen una longitud superior a 500 pb.

Otra posibilidad que es adecuada para enfoques antisentido o de cosupresión es el uso de secuencias de DNA con un alto grado de homología con las secuencias endógenas que codifican las proteínas SSIII, BEI o BEII y que existen endógenamente en la célula de la planta. El grado mínimo de homología debería exceder aproximadamente de 65%. Debe preferirse el uso de secuencias con niveles de homología de al menos 90%, en particular entre 95 y 100%.

El uso de intrones, es decir, regiones no codificantes de genes, que codifican proteínas SSIII, BEI y/o BEII es también factible para conseguir un efecto antisentido o de cosupresión.

El uso de secuencias de intrones para inhibir la expresión génica de genes que codifican proteínas de la biosíntesis del almidón ha sido descrito en las solicitudes de patente internacional WO 97/04112, WO 97/04113, WO 98/37213, y WO 98/37214. El técnico experto está familiarizado con los métodos para conseguir un efecto antisentido y de cosupresión. El método de inhibición de cosupresión ha sido descrito, por ejemplo, en Jorgensen (*Trends Biotechnol.* 8 (1990), 340-344), Niebel *et al.*, (*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 197 (1995) 91-103), Flavell *et al.* (*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 197 (1995), 43-46), Palaqui y Vaucheret (*Plant. Mol. Biol.* 29 (1995), 149-159), Vaucheret *et al.*, (*Mol. Gen. Genet.* 248 (1995), 311-317), de Borne *et al.* (*Mol. Gen. Genet.* 243 (1994), 613-621).

La expresión de ribozimas para reducir la actividad de enzimas específicas en las células es también conocida por el técnico experto, y se describe, por ejemplo, en EP-B1 0321201. La expresión de ribozimas en células de plantas ha sido descrita, por ejemplo, en Feyter *et al.* (*Mol. Gen. Genet.* 250, (1996), 329-338).

Además, la reducción de la actividad de SSIII y/o BEI y/o BEII en las células de las plantas puede conseguirse también por lo que se conoce como "mutagénesis *in vivo*", donde un oligonucleótido híbrido RNA-DNA ("quime-roplasto") se introduce en las células por medio de células transformantes (Kipp, P.B., *et al.*, Poster Session en el "5th International Congress of Plant Molecular Biology", 21-27 de septiembre de 1997, Singapur; R. A. Dixon y C.J. Amtzen, Informe de la Reunión sobre "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; Solicitud de Patente Internacional WO 9515972; Kren *et al.*, *Hepatology* 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss *et al.*, *Science* 273, (1996), 1386-1389; Beetham *et al.*, 1999, *PNAS* 96, 8774-8778).

ES 2 310 256 T3

Parte del componente de DNA del oligonucleótido RNA-DNA es homóloga con una secuencia de ácido nucleico de un gen endógeno SSIII, BEI y/o BEII, pero contiene una mutación en comparación con la secuencia de ácido nucleico de un gen endógeno SSIII, BEI y/o BEII o contiene una región heteróloga que está rodeada por las regiones homólogas. Debido al apareamiento de bases de las regiones homólogas del oligonucleótido RNA-DNA y de la molécula endógena de ácido nucleico, seguido por recombinación homóloga, la región de mutación o heteróloga contenida en el componente DNA del oligonucleótido RNA-DNA puede transferirse al genoma de una célula de planta. Esto conduce a una reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII, BEI y/o BEII.

Además, la reducción de la actividad de SSIII y/o BEI y/o BEII en las células de las plantas puede estar causada también por la expresión simultánea de moléculas de sentido y antisentido de RNA del gen diana específico a reprimir, preferiblemente el gen SSIII y/o BEI y/o BEII.

Esto puede conseguirse por ejemplo por el uso de constructos quiméricos que contienen "repeticiones invertidas" del gen diana respectivo o partes del gen diana. Los constructos quiméricos codifican moléculas de RNA de sentido y antisentido del gen diana en cuestión. Los RNA de sentido y antisentido se sintetizan simultáneamente en las plantas como una sola molécula de RNA, siendo posible que los RNA de sentido y antisentido estén separados uno de otro por un espaciador y formen una molécula de RNA bicatenario.

Se ha demostrado que la introducción de constructos de DNA con repeticiones invertidas en el genoma de las plantas es un método sumamente eficaz para reprimir los genes correspondientes a los constructos de RNA con repeticiones invertidas (Waterhouse *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang y Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh *et al.*, Biochemical Society Transactions vol. 28 parte 6 (2000), 925-927; Liu *et al.*, Biochemical Society Transactions vol. 28 parte 6 (2000), 927-929); Smith *et al.*, (Nature 407, (2000), 319-320; Solicitud de Patente Internacional WO 99/53050 A1). Secuencias de sentido y antisentido del o de los genes diana pueden expresarse también por separado unas de otras por medio de promotores idénticos o diferentes (Nap, J-P *et al.* 6º Congreso Internacional de Biología Molecular de las Plantas, Quebec, 18-24 de junio de 2000; Poster S7-27, Sesión S7).

La reducción de la actividad de SSIII y/o BEI y/o BEII en las células de las plantas puede conseguirse también por tanto mediante generación de moléculas de RNA bicatenario de los genes SSIII y/o BEI y/o BEII. A este fin, se prefiere introducir, en el genoma de las plantas, repeticiones invertidas de moléculas de DNA de genes SSIII y/o BEI y/o BEII o cDNAs, hallándose las moléculas de DNA a transcribir (gen SSIII, BEI o BEII o cDNA, o fragmentos de estos genes o cDNAs) bajo el control de un promotor que gobierna la expresión de dichas moléculas de DNA.

Además, es sabido que la formación de moléculas de DNA bicatenario de moléculas de DNA promotoras en las plantas *in trans* puede conducir a metilación y desactivación transcripcional de copias homólogas de estos promotores, a los que se hace referencia en lo sucesivo en esta memoria como promotores diana (Mette *et al.*, EMBO J. 19, (2000) 5194-5201).

Así pues, es posible, por la vía de la desactivación del promotor diana, reducir la expresión génica de un gen diana específico (por ejemplo un gen SSIII, BEI o BEII) que se encuentra naturalmente bajo el control de este promotor diana.

Esto significa que las moléculas de DNA que abarcan los promotores diana de los genes a reprimir (genes diana) no se utilizan en este caso - en contraste con la función original de los promotores en las plantas - como elementos de control para la expresión de genes o cDNAs, sino como moléculas de DNA transcribibles en sí mismas.

Para generar las moléculas de RNA promotor diana bicatenario en las plantas, donde las mismas pueden presentarse en la forma de molécula de RNA horquilla, se prefiere utilizar constructos que contengan repeticiones invertidas de las moléculas del DNA promotor diana, encontrándose las moléculas del DNA promotor diana bajo el control de un promotor que gobierna la expresión génica de dichas moléculas de DNA promotor diana. Estos constructos se introducen subsiguientemente en el genoma de las plantas. La expresión de las repeticiones invertidas de dichas moléculas de DNA promotor diana conduce a la formación de moléculas de RNA promotor diana bicatenario en las plantas (Mette *et al.*, EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). De este modo puede desactivarse el promotor diana.

La reducción de la actividad de SSIII y/o BEI y/o BEII en las células de las plantas puede conseguirse también por tanto por generación de moléculas de RNA bicatenario de secuencias promotoras de los genes SSIII y/o BEI y/o BEII. A este fin, se prefiere introducir, en el genoma de las plantas, repeticiones invertidas de las moléculas de DNA promotor de los promotores SSIII y/o BEI y/o BEII, encontrándose las moléculas de DNA promotor diana a transcribir (promotor SSIII, BEI y/o BEII) bajo el control de un promotor que gobierna la expresión de dichas moléculas de DNA promotor diana.

El técnico experto conoce adicionalmente el modo de conseguir la actividad de una o más proteínas SSIII, BEI y/o BEII por expresión de derivados no funcionales, en particular mutantes trans-dominantes, de tales proteínas y/o por expresión de antagonistas/inhibidores de dichas proteínas.

Antagonistas/inhibidores de tales proteínas abarcan por ejemplo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o moléculas con características de fijación similares. Por ejemplo, se empleó un anticuerpo citoplásmico scFv para la

ES 2 310 256 T3

modulación de la actividad de la proteína del fitocromo A en plantas de tabaco modificadas genéticamente (Owen, *Bio/Technology* 10 (1992) 790-4; Revisión: Franken, E, Teuschel, U. y Hain, R., *Current Opinion in Biotechnology* 8, (1997), 411-416; Whitelam, *Trends Plant Sci.* 1 (1996), 268-272).

5 Promotores útiles para la expresión de ácidos nucleicos que reducen la actividad de un gen diana son, por ejemplo, el promotor del RNA del virus del mosaico de la coliflor 35S y el promotor ubiquitina del maíz para expresión constitutiva, el promotor B33 del gen patatín (Rocha-Sosa *et al.*, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29), el promotor MCPI del gen inhibidor de la metalocarbopeptidasa de la patata (Solicitud de Patente de Hungría HU9801674) o el promotor GBSSI de la patata (Solicitud de Patente Internacional WO 92/11376) para expresión específica del tubérculo en las patatas, o un promotor que asegura la expresión únicamente en tejidos fotosintéticamente activos, por ejemplo el promotor ST-LS1 (Stockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus *et al.*, *EMBO J.* 8 (1989), 2445-2451), el promotor Ca/b (véanse, por ejemplo, US 5656496, US 5639952, Bansal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, (1992), 3654-3658) y el promotor Rubisco SSU (véanse, por ejemplo, US 5034322, US 4962028), o bien, para expresión específica en el endospermo, el promotor glutelina (Leisy *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 14, (1990), 41-50; Zheng *et al.*, *Plant J.* 4, (1993), 357-366; Yoshihara *et al.*, *FEBS Lett.* 383, (1996), 213-218), el promotor Shrunken-1 (Werr *et al.*, *EMBO J.* 4, (1985), 1373-1380), el promotor HMG del trigo, el promotor USP, el promotor faseolina o promotores de genes zeína del maíz (Pedersen *et al.*, *Cell* 29, (1982), 1015-1026; Quatroccio *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15 (1990) 81-93).

20 La expresión de la o las moléculas de ácido nucleico extraño es particularmente ventajosa en aquellos órganos de las plantas que almacenan almidón. Ejemplos de tales órganos son el tubérculo de la planta de patata o los granos, o endospermo, de las plantas de maíz, trigo o arroz. Esta es la razón por la cual se prefiere utilizar promotores que confieren expresión en estos órganos.

25 Sin embargo, es también posible utilizar promotores que son activados únicamente en un momento determinado por factores externos (véase, por ejemplo, WO 93/07279). Promotores que pueden ser particularmente interesantes en este contexto son los promotores de las proteínas del choque térmico, que permiten la inducción simple. Otros que pueden ser [laguna] son promotores específicos de semillas tales como, por ejemplo, el promotor USP de Vicia faba, que asegura la expresión específica de semilla en vicia faba y otras plantas (Fiedler *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 22, 30 (1993), 669-679; Bäumlleim *et al.*, *Mol. Gen. Genet* 225, (1991), 459-467). Pueden emplearse también adicionalmente promotores específicos de frutos tales como, por ejemplo, los descritos en WO 91/01373.

Otro elemento que puede estar presente es una secuencia de terminación, que sirve para la terminación correcta de la transcripción y para la adición de una cola poli-A al transcrito, que se cree tiene una función en la estabilización de los transcritos. Tales elementos se describen en la bibliografía (véase, por ejemplo, Gielen *et al.*, *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) y pueden sustituirse en caso deseado.

Las células de plantas transgénicas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón modificado cuyas propiedades físico-químicas, en particular el contenido de amilosa y la relación amilosa/amilopeptina, el contenido de fósforo, el comportamiento de viscosidad, la fuerza de gel, el tamaño de gránulo y/o la morfología del gránulo están modificadas en comparación con el almidón sintetizado en plantas de tipo salvaje de tal modo que el mismo es más adecuado para usos específicos.

La presente invención se refiere también por tanto a una célula de planta modificada genéticamente de acuerdo con la invención, en particular a una célula de planta transgénica que sintetiza un almidón modificado.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la composición del almidón en las células de las plantas de acuerdo con la invención está modificada de tal manera que el contenido de amilosa asciende como mínimo a 30% y el contenido de fosfato está incrementado y la viscosidad final en el análisis RVA está incrementada en comparación con el almidón de las células de plantas procedentes de plantas correspondientes de tipo salvaje, de tal manera que este almidón es más adecuado para usos específicos.

En particular, los almidones de acuerdo con la invención tienen la ventaja de que se gelatinizan completamente en condiciones estándar a pesar del contenido incrementado de amilosa. Esto mejora notablemente la procesabilidad del almidón en comparación con otros almidones que tienen un contenido incrementado de amilosa. Por tanto, no es necesaria una temperatura incrementada o presión incrementada para la gelatinización del almidón de acuerdo con la invención. Ésta es la razón por la cual el uso de aparatos específicos tales como, por ejemplo, hornos de chorro, extrusores o autoclaves puede omitirse cuando se desdoblamos estos almidones. Otra ventaja de los almidones de acuerdo con la invención es que, cuando se someten a procesamiento con rodillos calientes, pueden aplicarse a los últimos en forma de una suspensión. Estos almidones con un contenido incrementado de amilosa se gelatinizarían cuando se someten a este tipo de procesamiento, sólo en una proporción limitada, si acaso, y no serían susceptibles de aplicación a los rodillos en cuestión en la forma de una pasta o película.

Los almidones de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para todas las aplicaciones en las cuales sean importantes la capacidad de espesamiento, las características de gelificación o las características de fijación de las sustancias añadidas. El almidón de acuerdo con la invención es por tanto particularmente adecuado para la producción de alimentos tales como, por ejemplo, artículos horneados, comidas rápidas, cremas, sopas, repostería, chocolate, helados, mezcla para rebozar pescado o carne, postres helados o bocadillos extruidos. Además, el almidón de acuerdo

ES 2 310 256 T3

con la invención es adecuado para la producción de colas, para aplicaciones en procesamiento de tejidos, como aditivo para materiales de construcción, para aplicaciones en el campo de la nutrición animal, como aditivo para cosméticos y en la fabricación del papel.

5 El almidón que ha sido aislado a partir de células de plantas de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la producción de almidón pregelatinizado.

10 Los almidones pregelatinizados son almidones físicamente modificados que se producen predominantemente por tratamiento termo-húmedo. En oposición al almidón nativo, aquéllos forman dispersiones/pastas o geles con agua fría, dependiendo de la concentración del almidón pregelatinizado utilizado y en función del tipo de almidón utilizado para producir el almidón pregelatinizado. Debido a estas características, existen una serie de posibles aplicaciones para los almidones pregelatinizados en la industria alimentaria y adicionalmente en muchos campos de la industria. El uso de almidón pregelatinizado, al que se hace referencia también como almidón hinchable en frío, en lugar del almidón nativo tiene frecuentemente la ventaja de que los procesos de producción pueden simplificarse y acortarse.

15 La producción de, por ejemplo, postres instantáneos y crema instantánea requiere almidones pregelatinizados que, después de ser agitados en un líquido frío tal como, por ejemplo, agua o leche, formen geles consistentes en un periodo de tiempo breve como ocurre por ejemplo en el caso de una crema que requiere ebullición. Estas exigencias no son satisfechas por los almidones pregelatinizados comerciales producidos con almidón de trigo, almidón de patata o almidón de maíz. Para obtener las características arriba mencionadas, se requieren aditivos para el almidón pregelatinizado tales como gelatina, alginato, carragenano y/o sales inorgánicas en el caso de los almidones pregelatinizados que están actualmente disponibles en el comercio. Esta adición de lo que se conoce como adyuvantes no es necesaria por ejemplo después de la producción de almidones pregelatinizados utilizando los almidones de acuerdo con la invención que se aíslan a partir de células de plantas de acuerdo con la invención.

20 La presente invención se refiere también a una célula de planta de acuerdo con la invención con un almidón modificado con morfología del gránulo modificada.

25 Para los propósitos de la presente invención, el término morfología del gránulo tiene por objeto hacer referencia al tamaño y la estructura superficial de los gránulos de almidón nativos. El almidón se almacena en los órganos de almacenamiento tales como, por ejemplo, tubérculos, raíces, embriones o endospermo de las plantas, como una estructura cristalina en forma granular. Los gránulos de almidón en los cuales están retenidas estas estructuras granulares después que el almidón ha sido aislado de las células de las plantas se conocen como almidón nativo. El tamaño medio del gránulo (determinado por el método que se describe más adelante en esta memoria) del almidón nativo de acuerdo con la invención es notablemente menor que el del almidón nativo aislado de plantas de tipo salvaje. En la micrografía electrónica de barrido (véanse las Figs. 4 y 5) puede verse con claridad que, sorprendentemente, los gránulos de almidón nativo de acuerdo con la invención tienen una superficie rugosa con muchos poros. En contraste, la estructura superficial de los gránulos de almidón nativos aislados de plantas de tipo salvaje, es predominantemente lisa y no pueden apreciarse poros.

30 Tanto la presencia de gránulos más pequeños como la superficie rugosa con sus poros conducen al hecho de que la superficie específica de los gránulos de almidón de acuerdo con la invención es considerablemente mayor - para igual volumen - que la superficie específica de los gránulos de almidón aislados de plantas de tipo salvaje. El almidón de acuerdo con la invención es particularmente adecuado por tanto para uso como vehículo para, por ejemplo, saborizantes, sustancias farmacológicamente activas, sustancias prebióticas, microorganismos probióticos, enzimas o colorantes. Estos almidones son también particularmente adecuados para susustancias coagulantes y en la fabricación del papel.

35 Una posible aplicación adicional para los almidones de acuerdo con la invención es en el campo de la perforación para materias primas. Así, cuando se perfora en busca de petróleo crudo, tienen que emplearse adyuvantes y/o lubricantes que eviten el sobrecalentamiento del taladro o la columna de taladros. Debido a sus particulares propiedades de gelatinización, el almidón de acuerdo con la invención es por tanto particularmente adecuado también para uso en este campo.

40 La presente invención se refiere también a una célula de planta de acuerdo con la invención que contiene un almidón modificado con un contenido de amilosa de al menos 30% y que tiene un contenido incrementado de fosfato y una viscosidad final incrementada en el análisis RVA en comparación con el almidón correspondiente de células de plantas, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente.

45 En conexión con la presente invención, el contenido de amilosa se determina por el método de Hovenkamp-Hermelink *et al.* (Potato Research 31, (1988), 241-246) descrito más adelante con mayor detalle para el almidón de patata. Este método puede aplicarse también a almidones aislados de otras especies de plantas. Métodos para aislamiento de almidones son conocidos por los técnicos expertos.

50 Para los propósitos de la presente invención, el "contenido de fosfato" de almidón hace referencia al contenido de fosfato unido covalentemente en la forma de monoésteres fosfato del almidón.

ES 2 310 256 T3

En conexión con la presente invención, el término “contenido incrementado de fosfato” significa que el contenido total de fosfato del fosfato unido covalentemente y/o el contenido de fosfato en la posición C6 del almidón sintetizado en las células de las plantas de acuerdo con la invención está incrementado, con preferencia al menos en un 270%, más preferiblemente al menos en un 300%, y de modo especialmente preferible al menos en un 350% en comparación con el almidón procedente de las células de plantas de las plantas de tipo salvaje correspondientes.

Para los propósitos de la presente invención, el término “contenido de fosfato en la posición C6” debe entenderse que significa el contenido de grupos fosfato que están unidos al átomo de carbono de la posición “6” de los monómeros de glucosa del almidón. En principio, las posiciones C2, C3 y C6 de las unidades de glucosa pueden estar fosforiladas en el almidón *in vivo*. En conexión con la presente invención, la determinación del contenido de fosfato en posición C6 (= contenido de C6-P) puede realizarse por vía de la determinación de glucosa-6-fosfato por medio de un test visual-enzimático (Nielsen *et al.*, Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) (véase más adelante).

En conexión con la presente invención, el término “contenido total de fosfato” del almidón hace referencia al contenido de fosfato unido covalentemente en la posición C-2, C-3 y C6 de las unidades de glucosa en la forma de monoésteres fosfato del almidón. El contenido de no-glucanos fosforilados tales como, por ejemplo, fosfolípidos, no está comprendido dentro del término “contenido total de fosfato” de acuerdo con la invención. Los no-glucanos fosforilados deben por tanto eliminarse cuantitativamente antes de la determinación del contenido total de fosfato. Métodos para separación de los no-glucanos fosforilados (por ejemplo fosfolípidos) y el almidón son conocidos por el técnico experto. Métodos para la determinación del contenido total de fosfato son conocidos por los técnicos expertos y se describen más adelante en esta memoria.

En una realización adicional de la invención, las células de las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón que tiene un contenido de fosfato de 40-120 nmol, en particular 60-110 nmol, preferiblemente 80-100 C6-P por mg de almidón en posición C6 de los monómeros de glucosa del almidón.

Un protocolo para la realización del análisis RVA se describe adicionalmente a continuación. Debe hacerse mención en particular al hecho de que el análisis RVA de los almidones de patata opera frecuentemente con una suspensión de almidón al 8% (p/p). La documentación incluida con el aparato “RVASuper 3” (instrucciones, Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW2102, Australia) recomienda una suspensión que contiene aproximadamente 10% del almidón para el análisis del almidón de patata. Sorprendentemente, se ha encontrado en el caso del almidón de plantas de patata en relación con la presente invención, que no era posible utilizar una suspensión de almidón al 8% (2 g de almidón en 25 ml de agua) para el análisis, dado que la viscosidad final alcanzaba valores situados más allá del alcance del aparato. Es por esto por lo que se emplearon únicamente suspensiones de almidón al 6% (1,5 g de almidón en 25 ml de agua) para el análisis RVA en lugar de suspensiones de almidón al 8%. En conexión con la presente invención, “viscosidad final incrementada en el análisis RVA” debe entenderse por tanto con el significado de un aumento de al menos 150%, especialmente al menos 200%, en particular al menos 250%, en comparación con las plantas de tipo salvaje que no han sido modificadas genéticamente. El aumento de las viscosidades finales se refiere a suspensiones de almidón al 6% en este contexto.

En conexión con la presente invención, debe entenderse adicionalmente que un almidón de patata significa uno que tiene al menos 300 RVU, especialmente 400 RVU, y en particular 500 RVU de viscosidad final en el análisis RVA con un contenido de almidón del 6%. La determinación de los valores RVU se expondrá en detalle más adelante en esta memoria.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a células de plantas de acuerdo con la invención que sintetizan un almidón modificado que, después de gelatinización en agua, forma un gel con una fuerza de gel incrementada en comparación con un gel producido con almidón de células de plantas de tipo salvaje correspondientes que no han sido modificadas genéticamente.

Para los propósitos de la presente invención, el término “fuerza de gel incrementada” debe entenderse que significa un aumento de la fuerza de gel con preferencia de al menos 300%, en particular al menos 500%, más preferiblemente al menos 700% y de modo especialmente preferible al menos 800%, hasta un máximo no mayor que 2000% o no mayor que 1500% en comparación con la fuerza de gel del almidón de células de plantas de tipo salvaje correspondientes que no se han modificado genéticamente.

En conexión con la presente invención, la fuerza de gel se determinará con ayuda de un Analizador de Textura en las condiciones descritas más adelante en esta memoria.

Para preparar los geles de almidón, la estructura cristalina del almidón nativo debe destruirse primeramente por calentamiento en suspensión acuosa con agitación constante. Esto se realizó con la ayuda de un Visco-Analyser Rapid (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW2102, Australia). Como ya se ha mencionado anteriormente en esta memoria, la suspensión de almidón al 8% se reemplazó por una suspensión de almidón solamente al 6% en el caso del almidón de plantas de patata, dado que las viscosidades finales de las suspensiones al 8% quedaban fuera del alcance de operación del aparato. Para determinar la fuerza de gel, las suspensiones de almidón gelatinizadas en el Visco-Analizador Rapid se guardaron durante cierto periodo de tiempo y se sometieron luego a análisis utilizando un Analizador de Textura. De acuerdo con ello, las suspensiones de almidón gelatinizado al 8% se reemplazaron también por suspensiones de almidón gelatinizado al 6% para determinar la fuerza de gel.

ES 2 310 256 T3

En una realización adicional de la presente invención, el almidón modificado sintetizado en las células de las plantas de acuerdo con la invención se distingue no sólo por un contenido incrementado de amilosa en comparación con el almidón de plantas de tipo salvaje correspondientes y un contenido de fosfato incrementado y una viscosidad final incrementada en el análisis RVA, sino también por una distribución modificada de las cadenas laterales.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere por tanto a células de plantas de acuerdo con la invención que sintetizan un almidón modificado, caracterizándose el almidón modificado por una distribución modificada de las cadenas laterales. En una realización de la presente invención, el término “distribución modificada de las cadenas laterales” debe entenderse con el significado de una reducción de la cantidad de cadenas laterales cortas con un DP (= grado de polimerización) de 6 a 11 de al menos 10%, preferiblemente al menos 15%, en particular al menos 30%, y de modo especialmente preferible al menos 50% en comparación con la cantidad de cadenas laterales cortas con un DP de 6 a 11 de amilopectina procedente de plantas de tipo salvaje y/o un aumento en el contenido de cadenas laterales cortas con un DP de 6 a 22 de al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, en particular al menos 15% y de modo especialmente preferible al menos 30% en comparación con la cantidad de cadenas laterales cortas con un DP de 16 a 22 de amilopectina procedente de plantas de tipo salvaje.

La cantidad de cadenas laterales cortas se determina por determinación del porcentaje de una cadena lateral específica en el total de todas las cadenas laterales. El total de todas las cadenas laterales se determina por determinación del área total bajo los picos que representan los grados de polimerización de DP6 a 26 en el cromatograma HPLC. El porcentaje de una cadena lateral particular en el total de todas las cadenas laterales se determina por determinación de la relación del área bajo el pico que representa esta cadena lateral en el cromatograma HPLC referido al área total. Un programa que puede utilizarse para determinar las áreas de los picos es, por ejemplo, Chromelion 6.20 de Dionex, EE.UU.

25 En una realización adicional de la presente invención, el almidón modificado sintetizado en las células de las plantas de acuerdo con la invención se distingue no sólo por un contenido incrementado de amilosa en comparación con el almidón de plantas de tipo salvaje correspondientes y un contenido incrementado de fosfato y una viscosidad final incrementada en el análisis RVA, sino también por un “perfil de cadenas laterales DP12 a 18” modificado y/o por un “perfil de cadenas laterales DP19 a 24” modificado y/o por un “perfil de cadenas laterales 25 a 30” modificado y/o por un “perfil de cadenas laterales DP37 a 42” modificados y/o por un “perfil de cadenas laterales DP62 a 123” modificado.

En conexión con la presente invención, el término “perfil de cadenas laterales DP12 a 18” modificado debe entenderse con el significado de una reducción de la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 12 a 18 de al menos 25%, preferiblemente al menos 35%, de modo especialmente preferible al menos 45% y de modo muy especialmente preferible al menos 55% en comparación con la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 12 a 18 de las plantas de tipo salvaje.

40 En conexión con la presente invención, el término “perfil de cadenas laterales DP19 a 24” modificado debe entenderse con el significado de una reducción de la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 19 a 24 de al menos 10%, preferiblemente al menos 20% y de modo especialmente preferible al menos 30% en comparación con la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 19 a 24 de las plantas de tipo salvaje.

45 En conexión con la presente invención, el término “perfil de cadenas laterales DP 25 a 30” modificado debe entenderse con el significado de una reducción de la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 25 a 30 de al menos 5% en comparación con la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 25 a 30 de las plantas de tipo salvaje.

50 En conexión con la presente invención, el término “perfil de cadenas laterales DP 37 a 42” modificado debe entenderse con el significado de un aumento de la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 37 a 42 de al menos 5%, preferiblemente al menos 10% y de modo especialmente preferible al menos 15% en comparación con la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 37 a 42 de las plantas de tipo salvaje.

55 En conexión con la presente invención, el término “perfil de cadenas laterales DP 62 a 123” modificado debe entenderse con el significado de un aumento de la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 62 a 123 de al menos 20%, preferiblemente de al menos 35%, de modo especialmente preferible de al menos 50% en comparación con la cantidad de cadenas laterales de amilopectina con un DP de 62 a 123 de las plantas de tipo salvaje.

60 El perfil de cadenas laterales se determina por determinación del porcentaje de un grupo específico de cadenas laterales en el total de todas las cadenas laterales en el cromatograma GPC. A este fin, el área total bajo la línea del cromatograma GPC se divide en segmentos individuales, cada uno de los cuales representa grupos de cadenas laterales de diferentes longitudes. Los segmentos seleccionados contienen cadenas laterales con el grado de polimerización siguiente (DP = número de monómeros de glucosa en una cadena lateral): $DP \leq 11$, DP 12-18, DP 19-24, DP 25-30, DP 31-36, DP 37-42, DP 43-48, DP 49-55, DP 56-61 y DP 62-123. Para correlacionar el volumen de elución con la masa molecular, la columna GPC se calibra con patrones de dextrano (Fluka, Product #31430). Los dextranos utilizados, su masa molecular asociada y los volúmenes de elución se muestran en Fig. 9. Utilizando el gráfico de calibración resultante, el diagrama de elución se muestra como una distribución de pesos moleculares. Para determinar el peso molecular de las cadenas laterales individuales, se asignó un peso molecular de 162 para la glucosa. El área total bajo

ES 2 310 256 T3

la línea en el cromatograma GPC se asigna como 100% y el porcentaje de las áreas de los segmentos individuales se calcula basándose en el porcentaje del área total.

En una realización adicional especialmente preferida, la amilopectina del almidón de acuerdo con la invención, procedente de células de plantas de acuerdo con la invención o plantas de acuerdo con la invención, exhibe una cantidad incrementada de las cadenas laterales de amilopectina con un DP mayor que 123 en comparación con la cantidad de cadenas laterales con un DP mayor que 123 de la amilopectina de las plantas de tipo salvaje.

Las células de plantas de acuerdo con la invención pueden utilizarse para la regeneración de plantas intactas.

Las plantas que pueden obtenerse por regeneración de las células de plantas transgénicas de acuerdo con la invención son análogamente materia objeto de la presente invención.

Las células de plantas de acuerdo con la invención pueden pertenecer a cualquier especie de plantas, es decir, a plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las mismas son preferiblemente células vegetales de plantas útiles en agricultura, es decir plantas que son cultivadas por el hombre para los propósitos de nutrición o para propósitos técnicos, en particular industriales. La invención se refiere preferiblemente a plantas formadoras de fibras (por ejemplo lino, cáñamo, algodón), plantas oleaginosas (por ejemplo colza oleaginosa, girasol, soja), plantas que almacenan azúcar (por ejemplo remolacha azucarera, caña de azúcar, mijo de azúcar) y plantas que almacenan proteínas (por ejemplo legumbres). En una realización adicionalmente preferida, la invención se refiere a plantas forrajeras, en particular a plantas forrajeras y hierbas forrajeras (alfalfa, trébol y análogas) y plantas de hortalizas (por ejemplo tomate, lechuga, escarola). En una realización preferida adicional, la invención se refiere a células de plantas procedentes de plantas que almacenan almidón (por ejemplo trigo, cebada, avena, centeno, patata, maíz, arroz, guisante, mandioca), siendo especialmente preferidas células de plantas de patata.

Una multiplicidad de técnicas están disponibles para introducir DNA en una célula de planta hospedadora. Estas técnicas abarcan la transformación de células de plantas con T-DNA utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, la fusión de protoplastos, inyección, la electroporación de DNA, la introducción de DNA por medio del método biolístico, y otras posibilidades.

El uso de la transformación de las células de plantas mediada por agrobacterias ha sido estudiado intensivamente y descrito suficientemente en Pep 120516; Hoekema, en: *The Binary Plant Vector System* Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Capítulo V; Fraley *et al.*, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46 y en An *et al.* *EMBO J.* 4, (1985), 277-287. En lo que respecta a la transformación de la patata, véase, por ejemplo, Rocha-Sosa *et al.*, *EMBO J.* 8, (1989), 29-33).

La transformación de plantas monocotiledóneas por medio de vectores basados en transformación con agrobacterias ha sido descrita también (Chang *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 22, (1993), 491-506; Hiei *et al.*, *Plant. J.* 6, (1994) 271-282; Deng *et al.*, *Science in China* 33, (1990), 28-34; Wilmink *et al.*, *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May *et al.*, *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner y Domisse, *Int. J. Plant. Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie *et al.*, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Un sistema alternativo para la transformación de plantas monocotiledóneas es la transformación por medio del método biolístico (Wan y Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil *et al.*, *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), transformación de protoplastos, la electroporación de células parcialmente permeabilizadas, y la introducción de DNA por medio de fibras de vidrio. En particular, la transformación del maíz ha sido descrita repetidamente en la bibliografía (véase, por ejemplo, WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm *et al.*, *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel *et al.*, *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726).

La transformación con éxito de otras especies de cereales ha sido descrita también, por ejemplo para la cebada (Wan y Lemaux, véase arriba; Ritala *et al.*, véase arriba; Krens *et al.*, *Nature* 296, (1982), 72-74) y el trigo (Nehra *et al.*, *Plant J.* 5, (1994), 285-297). Todos los datos arriba mencionados son adecuados para los propósitos de la presente invención.

Cualquier promotor que es activo en células de plantas es adecuado generalmente para la expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico extraño. El promotor puede seleccionarse de tal manera que la expresión en las plantas de acuerdo con la invención tiene lugar constitutivamente o sólo en un tejido específico, en un momento particular del desarrollo de la planta o en un momento determinado por factores externos. Por lo que respecta a la planta, el promotor puede ser homólogo o heterólogo.

En una realización adicional de la invención, se expresa al menos un RNA antisentido en células de plantas a fin de reducir la actividad de una o más proteínas SSIII y/o proteínas BEI y/o proteínas BEII.

La presente invención, se refiere por consiguiente a una célula de planta de acuerdo con la invención, en donde dichas moléculas de ácido nucleico extraño se seleccionan del grupo constituido por

- a) moléculas de DNA que codifican al menos un RNA antisentido que conduce a una reducción de la expresión de al menos un gen endógeno que codifica proteínas SSIII y/o proteínas BEI y/o proteínas BEII;

ES 2 310 256 T3

- b) moléculas de DNA que, por un efecto de cosupresión, conducen a una reducción de la expresión de al menos un gen endógeno que codifica una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII;
- 5 c) moléculas de DNA que codifican al menos una ribozima que escinde específicamente transcritos de al menos un gen endógeno que codifica proteínas SSIII y/o proteínas BEI y/o proteínas BEII; y
- 10 d) moléculas de ácido nucleico introducidas por medio de mutagénesis *in vivo* que conducen a una mutación o inserción de una secuencia heteróloga en al menos un gen endógeno que codifica una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII, conduciendo la mutación o inserción a una reducción de la expresión de al menos un gen que codifica una o más proteínas SSIII y/o proteínas BEI y/o proteínas BEII, o a la síntesis de proteínas SSIII y/o BEI y/o BEII inactivas;
- 15 e) moléculas de DNA que codifican simultáneamente al menos un RNA antisentido y al menos un RNA de sentido, en donde dicho RNA antisentido y dicho RNA de sentido forman una molécula de DNA bicatenario que conduce a una reducción de la expresión de al menos un gen endógeno que codifica una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII;
- 20 f) moléculas de DNA que contienen transposones, conduciendo la integración de las secuencias de transposones a una mutación o una inserción en al menos un gen endógeno que codifica una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII que conducen a una reducción de la expresión de al menos un gen que codifica una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII, o que da como resultado la síntesis de proteínas SSIII y/o BEI y/o BEII inactivas; y
- 25 g) moléculas de cDNA que, debido a la inserción en al menos un gen endógeno que codifica una o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII, conduce a una reducción de la expresión de al menos un gen endógeno que codifica uno o más proteínas SSIII y/o una o más proteínas BEI y/o una o más proteínas BEII, o que dan como resultado la síntesis de proteínas SSIII y/o BEI y/o BEII inactivas.
- 30

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a cualquier clase de material de propagación de plantas de acuerdo con la invención.

35 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de las moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria para la generación de las células de plantas y plantas de acuerdo con la invención.

Descripción de las figuras

40 Fig. 1

Una representación gráfica de las características de viscosidad del almidón de plantas de patata. El análisis se realizó utilizando un visco-analizador Rapid (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW2102, Australia). Las condiciones en las cuales se llevó a cabo el análisis se describen en el método analítico RVA 1 en el capítulo “Métodos Generales”. El almidón para el test se aisló de los tubérculos de plantas de tipo salvaje (WT), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y/o una proteína BEI (038VL008 y 038VL- 107) o de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (110 CF 003 y 108 CF 041). El almidón se aisló por el método descrito en “Ejemplos”, “Proceso de extracción de almidón para patatas”.

50 Fig. 2

55 Una representación gráfica de las características de viscosidad del almidón de las plantas de patata. El análisis se llevó a cabo utilizando un Visco-Analizador Rapid (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australia). Las condiciones en las cuales se llevó a cabo el análisis se describen en el método analítico RVA 2 en el capítulo “Métodos Generales”. El almidón para el test se aisló de los tubérculos de plantas de tipo salvaje (WT), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI (038VL008 y 038VL107 o de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (100CF003 y 108CF041). El almidón se aisló por el método descrito bajo “Ejemplos”, “Proceso de extracción del almidón para patatas”.

60

Fig. 3

65 Una representación gráfica de las características de viscosidad del almidón de las plantas de patata. El análisis se llevó a cabo utilizando un Visco-Analizador Rapid (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australia). Las condiciones en las cuales se llevó a cabo el análisis se describen en el método analítico RVA 3 en el capítulo “Métodos Generales”. El almidón para el test se aisló de los tubérculos de plantas de tipo salvaje

ES 2 310 256 T3

(WT), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI (038VL008 y 038VL107 o de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (100CF003 y 108CF041). El almidón se aisló por el método descrito bajo “Ejemplos”, “Proceso de extracción del almidón para patatas”.

5

Fig. 4

Micrografía electrónica de barrido de un gránulo de almidón de patata aislado de plantas de tipo salvaje.

10

Fig. 5

Micrografía electrónica de barrido de un gránulo de almidón de patata aislado de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI y de una proteína BEII (110CF003).

15

Fig. 6

Representación esquemática del vector pGSV71- α -BEII-basta, que se utilizó para la retransformación de plantas en las cuales se observa ya una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI. (RB, borde de T-DNA izquierdo, LB, borde de T-DNA derecho; CaMV35, promotor del virus 35S del mosaico de la coliflor; NOS, secuencia de poliadenilación del gen de nopalina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; OCS, secuencia de poliadenilación del gen de octopina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; B33, promotor del gen patatín de la patata; BEII, secuencias codificantes del gen BEII de patata; bar, secuencia codificante de una fosfinotricina-acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus*).

20

25

Fig. 7

Representación esquemática del vector pB33- α -BE- α -SSIII-Kan, que se utilizó para la generación de plantas transgénicas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (RB, borde de T-DNA izquierdo, LB, borde de T-DNA derecho; nos5', promotor del gen de nopalina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; nptII, gen que codifica la actividad de una neomicina-fosfotransferasa; nos3, secuencia de poliadenilación del gen de nopalina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; OCS, secuencia de poliadenilación del gen de octopina-sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; B33, promotor del gen patatín de la patata; BE, secuencias codificantes del gen BEI de la patata; SSIII, secuencias codificantes del gen SSIII de la patata).

30

35

Fig. 8

La Figura muestra el diagrama de elución entero de la amilopectina de los almidones de las líneas 038VL008, 108CF041 y del tipo salvaje. Como se muestra en la figura, la cantidad de cadenas laterales mayores en la línea 108CF041 es notablemente mayor en contraste con el substrato de 038VL008 y/o del tipo salvaje correspondientes.

40

45

Fig. 9

Curva de calibración y tabla con los patrones de dextrano correspondientes.

50

Fig. 10

La figura muestra el diagrama de elución entero de la amilopectina de los almidones de las líneas 038VL008, 108CF041 y del tipo salvaje. En contraste con Fig. 8, el eje x no muestra el volumen de elución, sino el peso molecular. El diagrama de elución de Fig. 8 en función de la distribución de pesos moleculares se muestra con la ayuda del gráfico de calibración de Fig. 9.

55

Fig. 11

Esta figura representa la distribución del perfil de cadenas laterales de la amilopectina de plantas de la línea 038VL008 en comparación con el perfil de cadenas laterales de la amilopectina de plantas de tipo salvaje.

60

Fig. 12

Esta figura representa la distribución del perfil de cadenas laterales de la amilopectina de plantas de la línea 108CF041 en comparación con el perfil de cadenas laterales de la amilopectina de plantas de tipo salvaje.

65

ES 2 310 256 T3

Descripción de las secuencias

SEQ ID 1

5 Secuencia de ácido nucleico de la almidón-sintasa de SSIII de la patata (*Solanum tuberosum*) con indicación de las secuencias que codifican la proteína SSIII correspondiente.

SEQ ID 2

10 Secuencia de aminoácidos de una proteína SSIII de patata.

SEQ ID 3

15 Secuencia de aminoácidos del dominio de fijación Pfam cbm25 de la proteína SSIII de la patata (*Solanum tuberosum*)

SEQ ID 4

20 Secuencia de ácido nucleico codificante de la enzima ramificadora BEI de la patata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID 5

25 Secuencia de aminoácidos de la enzima ramificadora BEI de la patata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID 6

30 Secuencia de ácido nucleico codificante de la enzima ramificadora BEII de la patata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID 7

35 Secuencia de aminoácidos de la enzima ramificadora BEII de la patata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID 8

40 Secuencia de ácido nucleico amplificada por PCR de la enzima ramificadora BEII de la patata (*Solanum tuberosum*).

45 Métodos generales

Se utilizaron en los ejemplos los métodos siguientes:

50 Análisis del almidón

a) Determinación del contenido de amilosa y de la relación amilosa/amilopectina

55 Se aisló almidón de plantas de patata por métodos estándar, y se determinaron el contenido de amilosa y la relación amilosa:amilopectina por el método descrito por Hovenkamp-Hermelink *et al.* (Potato Research 31, (1988), 241-246).

b) Determinación del contenido de fosfato

60 En el almidón, las posiciones C2, C3 y C6 de las unidades de glucosa pueden estar fosforiladas. Para determinar el contenido de C6-P del almidón, se hidrolizan 50 mg de almidón durante 4 h a 95°C en 500 µl de HCl 0,7M. Las muestras se centrifugan luego durante 10 minutos a 15500 g y se retiran los sobrenadantes. Se mezclan 7 µl de los sobrenadantes con 193 µl de tampón de imidazol (imidazol 100 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y NAD 0,4 mM). La medida se llevó a cabo en un fotómetro a 340 nm. Después que se hubo estabilizado la absorción de la base, se inició la reacción enzimática por adición de 2 unidades de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (de Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim). El cambio en la absorción es directamente proporcional a la concentración del contenido de G-6-p del almidón.

ES 2 310 256 T3

El contenido total de fosfato se determinó por el método de Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Se tratan aproximadamente 50 mg de almidón con 30 μ l de solución etanólica de nitrato de magnesio y se reducen a cenizas durante 3 horas a 500°C en un horno de mufla. El residuo se trata con 300 μ l de ácido clorhídrico 0,5M y se incuba durante 30 minutos a 60°C. Una parte alícuota se lleva subsiguiente a 300 μ l con ácido clorhídrico 0,5M y se añade esto a una mezcla de 100 μ l de ácido ascórbico al 10% y 600 μ l de molibdato de amonio al 0,42% en ácido sulfúrico 2M, después de lo cual se incuba durante 20 minutos a 45°C. Esto va seguido por una determinación fotométrica a 820 nm con una serie de calibración de fosfato como estándar.

c) Determinación de la fuerza de gel (Analizador de Textura)

1,5 g de almidón (DM) se gelatinizan en el aparato RVA en 25 ml de una suspensión acuosa (programa de temperatura: véase el punto d) "Determinación de las características de viscosidad por medio de un Visco-Analizador Rapid ((RVA)") y se guardan subsiguientemente durante 24 horas a la temperatura ambiente en un recipiente herméticamente cerrado. Las muestras se fijan bajo la sonda (pistón redondo con superficie plana) de un Analizador de Textura TA-XT2 de Stable Micro Systems (Surrey, Reino Unido) y se determinó la fuerza de gel utilizando los parámetros siguientes:

- Velocidad del test - 0,5 mm/s
- Profundidad de penetración 7 mm
- Superficie de contacto 113 mm²
- Presión 2 g

d) Determinación de las características de viscosidad por medio de un Visco-Analizador Rapid (RVA)

Método estándar

Se absorben 2 g de almidón (DM) en 25 ml de agua (agua de tipo VE, conductividad de al menos 15 mega-ohm) y se utilizan para el análisis en un Visco-Analizador Rapid (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, NSW 2102, Australia). El aparato opera siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores de viscosidad se indican en RVUs de acuerdo con el manual de operaciones del fabricante, que se incorpora en la descripción adjunta por referencia. Para determinar la viscosidad de la solución acuosa de almidón, la suspensión de almidón se calienta primeramente durante 1 minuto a 50°C (paso 1), y se calienta luego desde 50°C a 95°C a una tasa de 12°C por minuto (paso 2). La temperatura se mantiene luego durante 2,5 minutos a 95° (paso 3). A continuación, se enfría la solución desde 95°C a 50°C a una tasa de 12°C por minuto (paso 4). La viscosidad se determina durante todo el procedimiento.

En particular, en aquellos casos en que los límites del intervalo de medida del RVA eran insuficientes cuando se introdujeron por pesada 2,0 g de almidón (DM) en 25 ml de agua (agua de tipo VE, conductividad de al menos 15 mega-ohm), únicamente se recogieron 1,5 g de almidón (DM) en 25 ml de agua (agua de tipo VE, conductividad de al menos 15 mega-ohm).

Por razones de comparación con la técnica anterior, se utilizó adicionalmente un perfil de temperatura modificado en algunos casos. Se utilizaron los perfiles de temperatura siguientes:

Método analítico RVA 1:

Para determinar la viscosidad de una solución acuosa de almidón al 6%, se agita primeramente la suspensión de almidón durante 10 segundos a 960 rpm y se calienta subsiguientemente a 50°C a una velocidad de agitación de 160 rpm, inicialmente durante 1 minuto (paso 1). La temperatura se elevó luego desde 50°C a 95°C a una tasa de calentamiento de 12°C por minuto (paso 2). La temperatura se mantiene durante 2,5 minutos a 95° (paso 3) y se enfría luego desde 95°C a 50°C a 12°C por minuto (paso 4). En el último paso (paso 5), se mantiene la temperatura de 50°C durante 2 minutos.

Después que ha terminado el programa, se retira el agitador y se tapa el vaso. El almidón gelatinizado está disponible ahora para el análisis de textura al cabo de 24 horas.

Método analítico RVA 2:

Para determinar la viscosidad de una solución acuosa de almidón al 6%, la suspensión de almidón se agita primeramente durante 10 segundos a 960 rpm y se calienta subsiguientemente a 50°C a una velocidad de agitación de 160 rpm, inicialmente durante 2 minutos (paso 1). La temperatura se elevó luego desde 50°C a 95°C a una tasa de calentamiento de 1,5°C por minuto (paso 2). La temperatura se mantiene durante 15 minutos a 95°C (paso 3) y se enfría luego desde

ES 2 310 256 T3

95°C a 50°C a 1,5°C por minuto (paso 4). En el último paso (paso 5), la temperatura de 50°C se mantiene durante 15 minutos.

Una vez que ha terminado el programa, se retira el agitador y se tapa el vaso. El almidón gelatinizado está disponible ahora para el análisis de textura después de 24 horas.

Método analítico RVA 3:

Para determinar la viscosidad de una solución acuosa de almidón al 10%, la suspensión de almidón se agita primeramente durante 10 segundos a 960 rpm y se calienta subsiguientemente a 50°C a una velocidad de agitación de 160 rpm, inicialmente durante 2 minutos (paso 1). La temperatura se elevó luego desde 50°C a 95°C a una tasa de calentamiento de 1,5°C por minuto (paso 2). La temperatura se mantiene durante 15 minutos a 95°C (paso 3) y se enfría luego desde 95°C a 50°C a 1,5°C por minuto (paso 4). En el último paso (paso 5), la temperatura de 50°C se mantiene durante 15 minutos. Este perfil del análisis RVA corresponde al empleado en WO 9634968. Una vez que ha terminado el programa, se retira el agitador y se tapa el vaso. El almidón gelatinizado está disponible ahora para el análisis de textura después de 24 horas.

El perfil del análisis RVA contiene parámetros que se muestran para la comparación de medidas y sustancias diferentes. En el contexto de la presente invención, los términos que siguen deben entenderse como se indica a continuación:

1. *Viscosidad máxima (RVA Max)*

La viscosidad máxima se entiende con el significado del valor más alto de viscosidad, medido en RVUs, obtenido en el paso 2 ó 3 del perfil de temperatura.

2. *Viscosidad mínima (RVA Min)*

La viscosidad mínima se entiende con el significado del valor más bajo de viscosidad, medido en RVUs, observado en el perfil de temperatura después de la viscosidad máxima. Normalmente, esto tiene lugar en el paso 3 del perfil de temperatura.

3. *Viscosidad final (RVA Fin)*

La viscosidad final se entiende con el significado del valor de viscosidad, medido en RVUs, observado al final de la medida.

4. *Reposición (Equipo RVA)*

Lo que se conoce como la "reposición" se calcula por sustracción del valor de la viscosidad final del valor del mínimo existente después de la viscosidad máxima en la curva.

5. *Temperatura de gelatinización (RVA T)*

La temperatura de gelatinización se entiende con el significado del valor puntual del perfil de temperatura en el que, por primera vez, la viscosidad aumenta drásticamente durante un breve periodo.

e) Análisis de la distribución de cadenas laterales de la amilopectina por medio de cromatografía de intercambio iónico

Para separar amilosa y amilopectina, se disuelven 200 mg de almidón en recipientes de reacción de 50 ml, utilizando 12 ml de DMSO al 90% (vol/vol) en agua. Después de la adición de tres volúmenes de etanol, el precipitado se separa por centrifugación durante 10 minutos a aproximadamente 1800 g a la temperatura ambiente (RT). El pélet se lava luego con 30 ml de etanol, se seca y se disuelve en 40 ml de solución de NaCl al 1% (p/v) a 75°C. Después que la solución se ha enfriado a 30°C, se añaden con lentitud aproximadamente 90 mg de timol, y se incuba esta solución durante al menos 60 h a 30°C. La solución se centrifuga luego durante 30 minutos a 2000 g (RT). El sobrenadante se trata luego con tres volúmenes de etanol, y la amilopectina que se sedimenta se separa por centrifugación durante 5 minutos a 2000 g (RT). El pélet (amilopectina) se lava luego con etanol y se seca utilizando acetona. Por adición de DMSO al pélet, se obtiene una solución al 1%, de la cual se tratan 200 µl con 345 µl de agua, 10 µl de acetato de sodio 0,5M (pH 3,5) y 5 µl de isoamilasa (dilución 1:10; Megazyme) y se incuban durante aproximadamente 16 horas a 37°C. Una dilución acuosa 1:5 de este material digerido se filtra subsiguientemente a través de un filtro de 0,2 µm, y se analizan 100 ml del filtrado por cromatografía iónica (HPAEC-PAD, Dionex). La separación se realizó utilizando una columna PA-100 (con precolumna adecuada), mientras que la detección se realizó amperométricamente. Las condiciones de elución fueron como sigue:

Solución A - NaOH 0,15 M

Solución B - acetato de sodio 1M en NaOH 0,15 M.

ES 2 310 256 T3

TABLA 1

Composición del tampón de elución para el análisis de cadenas laterales de la amilopectina en diferentes momentos durante el análisis HPEAC-PAD Dionex. Entre los momentos indicados, la composición del tampón de elución cambia en cada caso linealmente

5

10

15

20

t (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
5	0	100
35	30	70
45	32	68
60	100	0
70	100	0
72	0	100
80	0	100
Parada		

25

La determinación de la cantidad relativa de cadenas laterales cortas en el total de todas las cadenas laterales se lleva a cabo por la determinación del porcentaje de una cadena lateral particular en el total de todas las cadenas laterales. El total de todas las cadenas laterales se determina por determinación del área total bajo los picos que representan los grados de polimerización de DP6 a 26 en el cromatograma HPCL.

30

El porcentaje de una cadena lateral particular en el total de todas las cadenas laterales se determina mediante la determinación de la relación del área bajo el pico que representa esta cadena lateral en el cromatograma HPLC al área total. Para la determinación de las áreas de los picos se utilizó el programa Chromelion 6.20, versión 6.20 de Dionex, EE.UU..

35

f) Determinación del tamaño de gránulo

Se extrajo el almidón de tubérculos de patata por métodos estándar (véanse los Ejemplos).

40

La determinación del tamaño de los gránulos se llevó a cabo luego utilizando un fotosedimentómetro de tipo "Lumosed FS1", de Retsch GmbH, Alemania, utilizando el software V.2.3. Los ajustes del software fueron como sigue:

45

Datos de la sustancia:	Calibración No.	0
	Densidad [kg/m ³]	1500
Fluido de sedimentación:	Agua tipo	
	Viscosidad [Pa s]	0,001
	Densidad [kg/m ³]	1000
	Adición	-
	Registros	5 min
	Punto de corte [µm]	250
	Paso [%]	100
	Intervalo de medida	4,34-117,39 µm
	Calibración	N
	Temperatura	20°C

65

La distribución del tamaño de los gránulos se determinó en solución acuosa y se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y sobre la base de la bibliografía de, por ejemplo, H. Pitsch, Korngrößenbestimmung [determinación del tamaño de los gránulos]; LABO-1988/3 Fachzeitschrift für Labor Technik, Darmstadt.

ES 2 310 256 T3

g) Micrografías electrónicas de barrido (SEM)

Para estudiar la superficie de las muestras de almidón, se espolvorearon las últimas sobre el recipiente de muestras utilizando un adhesivo conductor. Para evitar la carga, los recipientes de muestra se sometieron finalmente a sublimación catódica con un recubrimiento de Pt de 4 nm. Las muestras de almidón se estudiaron utilizando el microscopio electrónico de barrido con emisión de campo JSM 6330 F (Jeol) a un voltaje de aceleración de 5 kV.

h) Determinación de la actividad de las proteínas SSIII, BEI y BEII

Se llevaron a cabo éstas como se especifica en los ejemplos.

Ejemplos

Generación del vector de expresión ME5/6

pGSV71 es un derivado del plásmido pGSV7, que se deriva del vector intermediario pGSV1. pGSV1 es un derivado de pGSC1700, cuya construcción ha sido descrita por Cornelissen y Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25). pGSV1 se obtuvo de pGSC1700 por delección del gen de resistencia a la carbenicilina y delección de las secuencias de T-DNA de la región TL-DNA del plásmido pTiB6S3.

pGSV7 contiene el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, Gene 2, (1977), 95-113) y el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.*, Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 contiene adicionalmente el gen marcador seleccionable *aadA*, del transposón Tn1331 de *Klebsiella pneumoniae*, que confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Tolmasky, Plasmid 24(3), (1990), 218-226; Tolmasky y Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40).

El plásmido pGSV71 se obtuvo por clonación de un gen quimérico *bar* entre las regiones de borde de pGSV7. El gen quimérico *bar* contiene la secuencia promotora del virus del mosaico de la coliflor para iniciación de la transcripción (Odell *et al.*, Nature 313, (1985), 180), el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson *et al.*, EMBO J. 6, (1987), 2519-2523) y la región no traducida 3' del gen de T-DNA pTiT37 de la nopalina-sintasa para terminación de la transcripción y para poliadenilación. El gen *bar* confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El T-DNA contiene la secuencia del borde derecho del TL-DNA del plásmido pTiB6S3 (Gielen *et al.*, EMBO J. 3, (1984), 835-846) en la posición 198-222. Una secuencia polienlazadora está localizada entre los nucleótidos 223 y 249. Los nucleótidos 250-1634 contienen la región promotora del virus del mosaico de la coliflor p35S3 (Odell *et al.*, véase arriba). La secuencia codificante del gen de resistencia a la fosfotricina (*bar*) de *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson *et al.* 1987, véase arriba) se encuentra entre los nucleótidos 1635-2186. Los dos codones terminales en el extremo 5' del gen *bar* de tipo salvaje se reemplazaron por los codones ATG y GAC. Una secuencia polienlazadora está localizada entre los nucleótidos 2187 y 2205. El fragmento TaqI de 260 pb del extremo 3' no traducido del gen de la nopalina-sintasa (3' nos) del T-DNA del plásmido pTiT37 (Depicker *et al.*, J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982), 561-573) está localizado entre los nucleótidos 2206 y 2465. Los nucleótidos 2466-2519 contienen una secuencia polienlazadora. La secuencia del borde izquierdo del TL-DNA de pTiB6S3 (Gielen *et al.*, EMBO J. 3, (1984), 835-846) está localizada entre los nucleótidos 2320 y 2344.

El vector pGSV71 se cortó luego utilizando la enzima PstI y se hizo romo en los extremos. El promotor B33 y la casete ocs se escindieron luego del vector pB33-Kan en la forma de un fragmento EcoRI-HindIII, se hizo romo en los extremos y se insertó en el vector pGSV71 que se había cortado con PstI y se había hecho romo en los extremos. El vector resultante se utilizó como vector de partida para la construcción de ME5/6: Se introdujo un oligonucleótido que contenía los sitios de escisión EcoRI, PacI, SpeI, SrfI, SpeI, NotI, PacI y EcoRI en el sitio de escisión por PstI del vector ME4/6 localizado entre el promotor B33 y el elemento ocs, duplicando el sitio de escisión por PstI. El vector de expresión resultante se denominó ME5/6.

Descripción del vector pSK-Pac:

pSK-Pac es un derivado de pSK-Bluescript (Stratagene, EE.UU.) en el cual se introdujo un sitio de escisión por PacI en cada flanco del sitio múltiple de clonación (MCS).

Generación de plantas transgénicas de patata con una expresión génica reducida de un gen BEI, SSIII y BEII

Para generar plantas transgénicas con una actividad reducida de una proteína BEI, una proteína SSIII y una proteína BEII, se generaron en un primer paso plantas transgénicas con una actividad reducida de una proteína BEI y una proteína SSIII. A este fin, el T-DNA del plásmido pB33- α -BEI- α -SSIII-Kan se transfirió a plantas de patata con ayuda de agrobacterias como ha sido descrito por Rocha-Sosa *et al.* (EMBO J. 8, (1989), 23-29).

ES 2 310 256 T3

Para construir el plásmido pB33- α -BEI- α -SSIII-Kan (véase Fig. 7), se construyó el vector de expresión pBin33-Kan en un primer paso. A este fin, el promotor del gen patatín B33 de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa *et al.*, 1989, véase arriba) se ligó en la forma de un fragmento DraI (nucleótidos -1512 - +14) en el vector pUC19 cortado con SstI (GenBank Acc. No. M77789), cuyos extremos se han hecho romos con ayuda de DNA-polimerasa T4. Esto dio lugar al plásmido pUC19-B33. El promotor B33 se escindió de este plásmido utilizando EcoRI y SmaI y se ligó al vector pBinAR cortado adecuadamente. Esto dio lugar al vector de expresión de plantas pBin33-Kan. El plásmido pBinAR es un derivado del plásmido vector pBin19 (Bevan, Nucl. Acid Research 12, (1984), 8711-8721) y fue construido por Höfgen y Willmitzer (Plant Sci. 66, (1990), 221-230). Un fragmento HindII de 1631 pares de bases que contiene un cDNA parcial que codifica la enzima BEI de patata (Kossmann *et al.*, 1991, Mol. & Gen. Genetics 230 (1-2): 39-44) se hizo luego romo en los extremos y se introdujo en el vector pBin33, que se había cortado previamente con SmaI, en orientación antisentido con relación al promotor B33 (promotor del gen patatín B33 de *Solanum tuberosum*; Rocha-Sosa *et al.*, 1989). El plásmido resultante se abrió por corte utilizando BamHI. Un fragmento BamHI de 1363 pares de bases que contenía un cDNA parcial que codificaba la enzima SSIII de patata (Abel *et al.*, 1996, loc. Cit.) se introdujo en el sitio de escisión, de nuevo en orientación antisentido con relación al promotor B33.

Después de la transformación, se identificaron varias líneas de plantas transgénicas de patatas en cuyos tubérculos se observó una actividad notablemente reducida de una proteína BEI y SSIII. Las plantas resultantes de esta transformación se designaron 038VL.

Para detectar la actividad de las almidón-sintasas solubles (SSIII) por electroforesis en gel no desnaturizante, se digirieron muestras de tejido de tubérculos de patata en Tris-HCl 50 mM de pH 7,6, DTT 2 mM, EDTA 2,5 mM, glicerol al 10% y PMSF 1,4 mM. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara MiniProtean II (BioRAD). La concentración de monómero de los geles, que tenían un espesor de 1,5 mm, ascendía a 7,5% (p/v), y Tris-glicina 25 mM de pH 8,4 actuó como el gel y los tampones de ejecución. Se aplicaron cantidades idénticas de extracto de proteína y se separaron durante 2 horas a 10 mA para cada gel. Los geles de actividad se incubaron subsiguientemente en tricina-NaOH 50 mM de pH 8,5, acetato de potasio 25 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, ADP-glucosa 1 mM, 0,1% (p/v) de amilopectina y citrato de sodio 0,5M. Los glucanos formados se tiñeron con solución de Lugol.

La actividad de BEI se detectó análogamente con ayuda de electroforesis en gel no desnaturizante:

Para aislar las proteínas de las plantas, el material de muestra se trituró en nitrógeno líquido utilizando un mortero con mano, se recogió en tampón de extracción (citrato de sodio 50 mM, pH 6,5; EDTA 1 mM, DTT 4 mM), se centrifugó (10 min, 14.000 g, 4°C) y se empleó luego directamente en la medida de la concentración de proteínas siguiendo el método de Bradford. A continuación, se trataron 5 a 20 μ g de extracto de proteínas total (de acuerdo con los requerimientos) con 4x tampón de carga (20% glicerol, Tris-HCl 125 mM, pH 6,8) y se aplicaron a un gel de actividad BE. El tampón de ejecución (RB) estaba compuesto como sigue: RB = 30,2 g de base Tris, pH 8,0, 144 g de glicina para 1 litro de agua.

Después que hubo terminado el paso del gel, cada uno de los geles se incubó durante una noche a 37°C en 25 ml de "tampón de fosforilasa" (25 ml de citrato de sodio 1M de pH 7,0, 0,47 g de glucosa-1-fosfato, 12,5 mg de AMP, 2,5 mg de fosforilasa a/b de conejo). Los geles se tiñeron utilizando solución de Lugol.

Análisis en más profundidad demostraron que los almidones aislados de las líneas 038VL008 y 038VL107, en los cuales se habían reducido a la vez la proteína BEI y la proteína SSIII, presentaban el contenido máximo de fosfato de todos los transformantes independientes estudiados.

Se transformaron subsiguientemente plantas de estas líneas con el plásmido pGSV71- α BEII-basta como ha sido descrito por Rocha-Sosa *et al.* (EMBO J. 8, (1989), 23-29).

Se construyó el plásmido pGSV71- α BEII-basta por cribado de una genoteca de cDNA de patata específica del tubérculo con un fragmento de DNA amplificado utilizando RT-PCR (Iniciador: 5' gggggtgttgcttggacta y 5' -cccttcctcc-taatccca; Stratagene ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR Systems, con RNA total de tubérculos como molde, siguiendo métodos estándar. De esta manera, se aisló un fragmento de DNA de aproximadamente 1250 pb (SEQ ID No. 8), y se subclonó luego en el sitio de escisión por EcoRV del vector de clonación pSK-Pac (véase anteriormente en esta memoria) en la forma de un fragmento EcoRV-SmaI y se ligó subsiguientemente al vector de expresión ME5/6 en orientación antisentido con relación al promotor en la forma de un fragmento PacI. Esto dio lugar al plásmido pGSV71- α BEII-basta (véase Fig. 6).

Se obtuvieron muestras de tejido del tubérculo de los transformantes independientes a partir de las plantas obtenidas por transformación con el plásmido pGSV71- α BEII-basta, a las que se hizo referencia como 108CF y 110CF, y se determinó su contenido de amilosa (véase Métodos). Los almidones de las líneas independientes cuyos tubérculos tenían el contenido máximo de amilosa se utilizaron para un análisis ulterior de las características del almidón. Para demostrar que en estas plantas no solamente se reduce la actividad de una proteína BEI y SSIII, sino que se reduce también la actividad de una proteína BEII, se llevó a cabo otro análisis con ayuda de electroforesis en gel no desnaturizante. El análisis se llevó a cabo siguiendo el mismo método ya realizado anteriormente para el análisis de la actividad reductora de BEI, con la excepción de que el gel de poliacrilamida no desnaturizante contenía 0,5% de maltodextrina (Beba), solución de maltodextrina de concentración 15% para recién nacidos, Nestlé) además de la

ES 2 310 256 T3

composición arriba descrita. La adición de dextrina hizo posible demostrar las diferentes actividades de las proteínas BEI y BEII después de incubación de los geles en “tampón de fosforilasa” (25 ml de citrato de sodio 1M de pH 7,0, 0,47 g de glucosa-1-fosfato, 12,5 mg de AMP, 2,5 mg de fosforilasa a/b de conejo) durante 1 noche a 37°C, seguido por tinción con solución de Lugol en un gel.

5

Proceso de extracción del almidón de patata

10 Todos los tubérculos de una línea (4 a 5 kg) se procesan juntos en un extractor de jugo disponible comercialmente (Multipress Automatic MP80, Braun). El agua de los frutos que contienen almidón se recoge en un cubo de 10 l (relación altura del cubo/diámetro del cubo = aprox. 1,1) que contiene 200 ml de agua del grifo junto con una cuchara llena hasta el borde (aprox. 3-4 g) de bisulfito de sodio. El cubo se llena a continuación completamente con agua del grifo. Después que se ha dejado sedimentar el almidón durante 2 horas, se separa el sobrenadante por decantación, se suspende de nuevo el almidón en 10 l de agua del grifo y se vierte sobre un tamiz con una abertura de malla de 15 125 µm. Después de 2 horas (el almidón se ha sedimentado de nuevo en el fondo del cubo), se decanta nuevamente el sobrenadante acuoso. Este paso de lavado se repite tres veces más, de tal modo que el almidón se resuspende un total de 5 veces en agua fresca del grifo. Después de ello, los almidones se secan a 37°C hasta un contenido de agua de 12-17% y se homogeneizan utilizando un mortero con mano. Los almidones están ahora disponibles para los análisis.

20

Ejemplo 2

Análisis del almidón de las plantas con expresión reducida de los genes BEI, SSIII y BEII

25

El almidón de varias líneas independientes de las transformaciones 108CF y 110CF descritas en el Ejemplo 1 se aisló a partir de tubérculos de patata. Las propiedades físico-químicas de este almidón se analizaron subsiguientemente. Los resultados de la caracterización de los almidones modificados se muestran en la Tabla 2 (Tab. 2) para un ejemplo de una selección de ciertas líneas de plantas. Los análisis se llevaron a cabo por los métodos descritos 30 anteriormente en esta memoria.

30

Las Tablas 2, 3 y 4 que siguen resumen los resultados del análisis RVA basado en almidón de plantas de tipo salvaje:

35

RVA, método analítico 1

TABLA 2

40

Parámetros del análisis RVA del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003) en porcentajes basados en datos del almidón de tipo salvaje. El análisis RVA se realizó como se describe en el Método Analítico 1

45

	RVA max (%)	RVA min (%)	RVA fin (%)	RVA ajustado (%)	RVA T (%)	Fuerza de gel
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	158,7	69,8	72,0	79,5	73,0	55,4
108CF041	59,6	89,9	227,5	693,7	150,2	532,3
038VL107	151,1	94,3	94,0	93,0	82,2	52,2
110CF003	106,4	158,6	265,0	625,7	151,5	737,1

50

55

60

65

ES 2 310 256 T3

RVA, método analítico 2

TABLA 3

5 *Parámetros del análisis RVA del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003) en porcentajes basados en datos del almidón de tipo salvaje. El análisis RVA se realizó como se describe en el Método Analítico 2*

10

	RVA max (%)	RVA min (%)	RVA fin (%)	RVA ajustado (%)	RVA T (%)	Fuerza de gel
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	167,1	40,4	52,6	77,6	54,2	63,0
108CF041	44,5	82,5	187,5	402,7	137,4	412,2
038VL107	152,0	76,1	81,9	93,8	76,9	51,7
110CF003	92,4	172,2	n.d.	n.d.	139,0	795,0

15

20

25

RVA, método analítico 3

TABLA 4

30 *Parámetros del análisis RVA del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003) en porcentajes basados en datos del almidón de tipo salvaje. El análisis RVA se realizó como se describe en el Método Analítico 3*

35

	RVA max (%)	RVA min (%)	RVA fin (%)	RVA ajustado (%)	RVA T (%)	Fuerza de gel
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	n.d.	50,2	76,5	127,8	77,0	100,5
108CF041	74,7	291,0	n.d.	205,7	236,0	630,3
038VL107	n.d.	84,5	86,4	90,1	102,3	58,1
110CF003	89,8	259,7	n.d.	n.d.	196,6	663,9

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 256 T3

Las Tablas 5, 6 y 7 siguientes resumen los resultados del análisis RVA. Los datos no se refieren al tipo salvaje, sino que son las medidas reales:

RVA, método analítico 1 (véase también Fig. 1)

TABLA 5

Parámetros del análisis RVA del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003) en RVUs. El análisis RVA se realizó como se describe en el Método Analítico 1

	RVA max (RVU)	RVA min (RVU)	RVA fin (RVU)	RVA ajustado (RVU)	RVA T (RVU)	Fuerza de gel
cv. Desiree	255,05	162,33	210,25	47,92	4,6	25,1
038VL008	404,83	113,25	151,33	38,08	3,36	13,9
108CF041	152,08	145,92	478,33	332,42	6,91	133,6
038VL107	385,5	153	197,58	44,58	3,78	13,1
110CF003	271,5	257,42	557,25	299,83	6,97	185

RVA, método analítico 2 (véase también Fig. 2)

TABLA 6

Parámetros del análisis RVA del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003) en RVUs. El análisis RVA se realizó como se describe en el Método Analítico 2

	RVA max (RVU)	RVA min (RVU)	RVA fin (RVU)	RVA ajustado (RVU)	RVA T (RVU)	Fuerza de gel
cv. Desiree	212,17	113,75	169,25	55,5	28,78	23,8
038VL008	354,58	45,92	89	43,08	15,61	15
108CF041	94,33	93,83	317,33	223,5	39,53	98,1
038VL107	322,58	86,58	138,67	52,08	22,13	12,3
110CF003	196,08	195,92	n.d.	n.d.	39,99	189,2

ES 2 310 256 T3

RVA, método analítico 3 (véase también Fig. 3)

TABLA 7

5 *Parámetros del análisis RVA del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003) en RVUs. El análisis RVA se realizó como se describe en el Método Analítico 3*

10

	RVA max (RVU)	RVA min (RVU)	RVA fin (RVU)	RVA ajusta- do (RVU)	RVA T (RVU)	Fuerza de gel
Desiree	819,67	207,67	314,25	106,58	16,88	56,5
038VL008	n.d.	104,17	240,33	136,17	12,99	56,8
108CF041	612,33	604,25	823,5	219,25	39,83	356,1
038VL107	n.d.	175,42	271,5	96,08	17,27	32,8
110CF003	736,08	539,42	n.d.	n.d.	33,18	375,1

15

20

25

Sumario de los análisis de fosfato y amilosa:

30

No.	Genotipo	Fosfato en C6 (%)	Fosfato total en (%)	Amilosa (%)	Amilosa (% WT)
1	cv. Desiree	100	100	22	100
2	038VL008	346,4	255,2	19,4	85,8
3	108CF041	557,3	427,6	36,8	162,8
4	038VL007	225,5	182,8	19,7	87,2
5	110CF003	446,4	348,3	34,6	153,1

35

40

TABLA 8

45 *Contenidos de fosfato y amilosa del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI (038VL008, 038VL107) y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y una proteína BEI y una proteína BEII (108CF041, 110CF003). Los contenidos de fosfato en la posición C6 de los monómeros de glucosa y el contenido total de fosfato del almidón se indican en porcentaje basado en el almidón de las plantas de tipo salvaje; los contenidos de amilosa se indican en porcentaje de amilosa basado en la cantidad total del almidón, o en porcentaje basado en el contenido de amilosa del almidón de las plantas de tipo salvaje*

55

60

65

ES 2 310 256 T3

El análisis de la distribución de cadenas laterales de la amilopectina se llevó a cabo como se ha descrito arriba. La tabla que sigue es un sumario de las contribuciones de las áreas de los picos individuales:

TABLA 9

La tabla muestra un sumario de las contribuciones de las áreas individuales de los picos del cromatograma HPAEC al área total de los picos de las plantas de tipo salvaje (CV Desiree), de plantas 038VL008 y 038V1107 (plantas de patata con actividad reducida de una proteína BEI y de una proteína SSIII) y de líneas seleccionadas de las transformaciones 108CF y 110CF (plantas de patata con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI y de una proteína BEII). El número de monómeros de glucosa en las cadenas laterales individuales se muestra como dp

Unidades de glucosa	cv. Desiree	038VL008	108CF041	038VL107	110CF003
dp 6	1,52	4,16	1,88	2,39	0,86
dp 7	1,4	1,4	0,63	1,42	0,59
dp 8	1,23	0,77	0,33	0,99	0,38
dp 9	2,05	1,42	0,74	1,79	0,75
dp 10	3,55	2,8	1,74	3,33	1,77
dp 11	5,16	4,41	2,92	4,96	3,46
dp 12	6,25	5,77	4,47	6,22	5,17
dp 13	6,71	6,7	5,63	6,87	6,35
dp 14	6,75	7,06	6,35	6,99	7,38
dp 15	6,48	6,76	6,62	6,65	7,63
dp 16	6,07	5,99	6,34	6,11	7,13
dp 17	5,6	5,21	5,81	5,49	6,3
dp 18	5,28	4,78	5,87	5,11	5,98
dp 19	4,99	4,74	6,17	4,94	5,91
dp 20	4,76	4,65	6,07	4,78	5,64
dp 21	4,5	4,46	5,65	4,5	5,26
dp 22	4,16	4,12	5,07	4,2	4,7
dp 23	3,77	3,68	4,59	3,78	4,19
dp 24	3,44	3,36	4,24	3,42	3,75
dp 25	3,08	3,09	3,86	3,07	3,49
dp 26	2,73	2,8	3,36	2,77	3,03
dp 27	2,39	2,58	2,95	2,37	2,65
dp 28	2,07	2,26	2,39	2,01	2,1
dp 29	1,67	1,87	1,87	1,71	1,69
dp 30	1,38	1,58	1,54	1,35	1,3
dp 31	1,07	1,28	1,02	1,04	0,87
dp 32	0,79	0,96	0,7	0,75	0,6
dp 33	0,57	0,69	0,6	0,51	0,51
dp 34	0,36	0,43	0,39	0,32	0,34
dp 35	0,22	0,22	0,19	0,17	0,2
Total	100	100	99,99	100,01	99,98

ES 2 310 256 T3

La longitud máxima de cadena, cuyo valor es la media de las longitudes de las dos cadenas (dada en DP) que son las contribuyentes máximas al área total bajo los picos del cromatograma HPAEC, es - en el caso de la amilopectina desramificada - de las plantas de tipo salvaje en DP = 13, en el caso de las plantas 038VL análogamente en DP = 13 y en el caso de las plantas 108CF y 110CF, como promedio, en 15.

Si la longitud máxima de cadena de las plantas transgénicas se compara con la longitud máxima de cadena de la amilopectina de las plantas de tipo salvaje, resultan los valores siguientes para la relación de longitudes máximas de cadena (relación PCL):

relación PCL para 038VL = $13/13 = 1$

relación PCL para 108/110CF = $15/13 = 1,15$

Adicionalmente, se analizó la morfología de los gránulos de almidón utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM). La superficie de los gránulos de almidón de las plantas 108/110CF parece recubierta o levantada con formación de poros.

Además, la determinación del tamaño de los gránulos se llevó a cabo utilizando un fotosedimentómetro de tipo "Lumosed" de Retsch GmbH, Alemania.

Se determinó el tamaño medio de los gránulos de las muestras de almidón sin tratar (Tabla 3). Tamaño medio de los gránulos [μm].

TABLA 10

Valores del tamaño medio de los gránulos del almidón aislado de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree), plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI (038VL008, 038VL107), y de plantas con una actividad reducida de una proteína SSIII y de una proteína BEI y de una proteína BEII (108CF041, 110CF003)

Muestra	Tamaño medio de gránulo
cv. Desiree	29,7
038VL008	21,5
108CF041	20,8
038VL 107	22,9
11 0CF003	20,7

Ejemplo 3

Análisis de la distribución de las cadenas laterales de amilopectina por medio de cromatografía de permeación de gel

Para separar amilosa y amilopectina, se disuelven 100 mg de almidón en 6 ml de DMSO de concentración 90% (v/v) con agitación constante. Después de la adición de 3 volúmenes de etanol, el precipitado se separa por centrifugación durante 10 minutos a 1800 g y a la temperatura ambiente. El pélet se lava subsiguientemente con 30 ml de etanol, se seca y se disuelve en 10 ml de solución de NaCl de concentración 1% (p/v) a 60°C. Después de enfriar la solución a 30°C, se añaden con lentitud aproximadamente 50 mg de timol, y se incuba esta solución durante 2 a 3 días a 30°C. La solución se centrifuga subsiguientemente durante 30 minutos a 2000 g a la temperatura ambiente. El sobrenadante se trata con 3 volúmenes de etanol, y la amilopectina que precipita se separa por centrifugación durante 5 minutos a 2000 g a la temperatura ambiente. El pélet (amilopectina) se lava con 10 ml de etanol de concentración 70% (v/v), se centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a la temperatura ambiente y se seca luego utilizando acetona.

Se agitan subsiguientemente 10 mg de amilopectina durante 10 minutos a 70°C en 250 μl de DMSO de concentración 90% (v/v). Se añaden 375 μl de agua a una temperatura de 80°C a la solución hasta que se completa la disolución.

Se tratan 200 μl de esta solución con 300 μl de una solución de acetato de sodio 16,6 mM a pH 3,5 y 2 μl de isoamilasa (0,24 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$, Megazyme, Sydney, Australia) y la mezcla se incuba durante 15 horas a 37°C.

Una dilución 1:4 de esta mezcla de reacción acuosa de isoamilasa con DMSO, que comprende nitrato de sodio 90 mM, se filtra subsiguientemente a través de un filtro de 0,2 μm , y se analizan por cromatografía 24 μl del filtrado. La separación se llevó a cabo con dos columnas conectadas en serie, primeramente una Gram PSS3000 (Polymer Standards Service, con precolumna adecuada), seguida por una gram PSS100. La detección se realizó por medio de un detector de índice de refracción (RI 71, Shodex). La columna se equilibró con DMSO que comprendía nitrato de sodio 90 mM. Se eluyó con DMSO que comprendía nitrato de sodio 90 mM a un caudal de 0,7 ml/min durante un periodo de 1 hora.

ES 2 310 256 T3

Para correlacionar el volumen de elución con la masa molecular, la columna utilizada se calibró con estándares de dextrano. Los dextransos utilizados, su peso molecular y los volúmenes de elución se muestran en Fig. 9. Utilizando el gráfico de calibración resultante, se mostró el diagrama de elución como una distribución de pesos moleculares (Fig. 10).

5

Los cromatogramas obtenidos se evaluaron ulteriormente utilizando el programa Wingpc Versión 6 de Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemania.

El área total bajo la línea del cromatograma GPC se dividió en segmentos individuales, cada uno de los cuales representa grupos de cadenas laterales de longitudes diferentes. Los segmentos seleccionados contenían cadenas de glucano con el grado de polimerización siguiente (DP = número de monómeros de glucosa en una cadena lateral): DP ≤ 11, DP 11-18, DP 19-24, DP 25-30, DP 31-36, DP 37-42, DP 43-48, DP 49-55, DP 56-61 y DP 62-123. Para determinar el peso molecular de las cadenas laterales individuales, se supuso para la glucosa un peso molecular de 162. El área total bajo la línea en el cromatograma GPC se estableció luego como 100%, y se calculó el porcentaje de las áreas de los segmentos individuales basado en el porcentaje del área total. Los resultados obtenidos por este análisis se muestran en la Tabla 11.

TABLA 11

20 *Perfiles de las cadenas laterales DP 12 a 18, DP 19 a 24, DP 25 a 30, DP 31 a 36, DP 37 a 42, DP 43 a 48, DP 49 a 55, DP 56 a 61 y DP 62 a 123 para la amilopectina aislada de plantas de tipo salvaje (cv. Desiree) y de plantas con una actividad reducida de una SSIII y de una proteína BEI y de una proteína BEII (108CF041). Los porcentajes indican la modificación de los perfiles de las cadenas laterales individuales basados en amilopectina aislada de plantas de tipo salvaje*

25

	Tipo salvaje	08CF041 c
DP=11	100%	40%
DP12-18	100%	50%
DP19-24	100%	69%
DP25-30	100%	91%
DP31-36	100%	111%
DP37-42	100%	116%
DP43-48	100%	110%
DP49-55	100%	107%
DP56-61	100%	109%
DP62-123	100%	157%

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Célula de planta que está modificada genéticamente, conduciendo la modificación genética a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEII que existen endógenamente en la célula de la planta en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente, mientras que las células de la planta modificadas genéticamente sintetizan un almidón modificado, que después de la gelatinización de una suspensión al 6% en agua forma un gel con una fuerza de gel que está incrementada al menos en un 300% en comparación con la fuerza de gel del almidón extraído de células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente.

2. Célula de planta de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la modificación genética es la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico extraño cuya presencia y/o expresión conduce a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII y BEI y BEII que existen en la célula de la planta en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente.

3. Planta que contiene células de planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2.

4. Método para generar una planta modificada genéticamente, en el cual

a) se genera una célula de planta que sintetiza un almidón modificado, almidón que después de gelatinización de una suspensión al 6% en agua forma un gel con una fuerza de gel que está incrementada al menos en un 300% en comparación con la fuerza de gel del almidón extraído de células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no se han modificado genéticamente, que comprende la modificación genética de la célula de la planta, conduciendo la modificación genética a la reducción de la actividad de una o más proteínas SSIII que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEI que existen endógenamente en la célula de la planta y a la reducción de la actividad de una o más proteínas BEII que existen endógenamente en la célula de la planta, en comparación con células de plantas correspondientes, de plantas de tipo salvaje, que no han sido modificadas genéticamente;

b) se regenera una planta a partir de, o utilizando, la célula de planta generada de acuerdo con a); y,

c) en caso apropiado, se generan plantas adicionales a partir de la planta generada de acuerdo con el paso b).

5. Método para generar una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 4 que sintetiza un almidón modificado, en el cual

a) se modifica genéticamente una célula de planta por la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico extraño cuya presencia y/o expresión conduce a la reducción de la actividad de, en cada caso, al menos una proteína SSIII, BEI y BEII en comparación con células de plantas de tipo salvaje correspondientes que no han sido modificadas genéticamente;

b) se regenera una planta a partir de, o utilizando, la célula generada de acuerdo con a); y

c) en caso apropiado, se generan plantas adicionales a partir de las plantas generadas de acuerdo con el paso b).

6. Planta de acuerdo con la reivindicación 3, que es una planta que almacena almidón.

7. Planta de acuerdo con la reivindicación 6, que es una planta de patata.

8. Material de propagación de plantas de acuerdo con una de las reivindicaciones 3, 6 ó 7, que contiene al menos una célula de planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2.

9. Uso de una o más moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas con la actividad enzimática de al menos una proteína SSIII, al menos una proteína BEI y al menos una proteína BEII o sus fragmentos para la generación de células de plantas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 o de plantas de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 ó 6 a 7.

10. Almidón que puede obtenerse a partir de células de plantas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 o de una planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 3, 6 ó 7 o de material de propagación de acuerdo con la reivindicación 8.

11. Almidón de acuerdo con la reivindicación 10, que es un almidón de patata.

ES 2 310 256 T3

12. Método para producir un almidón de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 ó 11, que comprende la extracción del almidón de una planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 3, 6 ó 7 y/o de partes que almacenan almidón de una planta de este tipo y/o una célula de planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2 y/o de material de propagación de acuerdo con la reivindicación 8.

5

13. Almidón de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 ó 11, que puede obtenerse por un método de acuerdo con la reivindicación 12.

10

14. Método para modificar el almidón de una planta, que comprende el método para generar una planta de acuerdo con una de las reivindicaciones 3, 6 ó 7 y obtener almidón a partir de la planta o partes que contienen almidón de la misma.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

RVA –Método de análisis 1

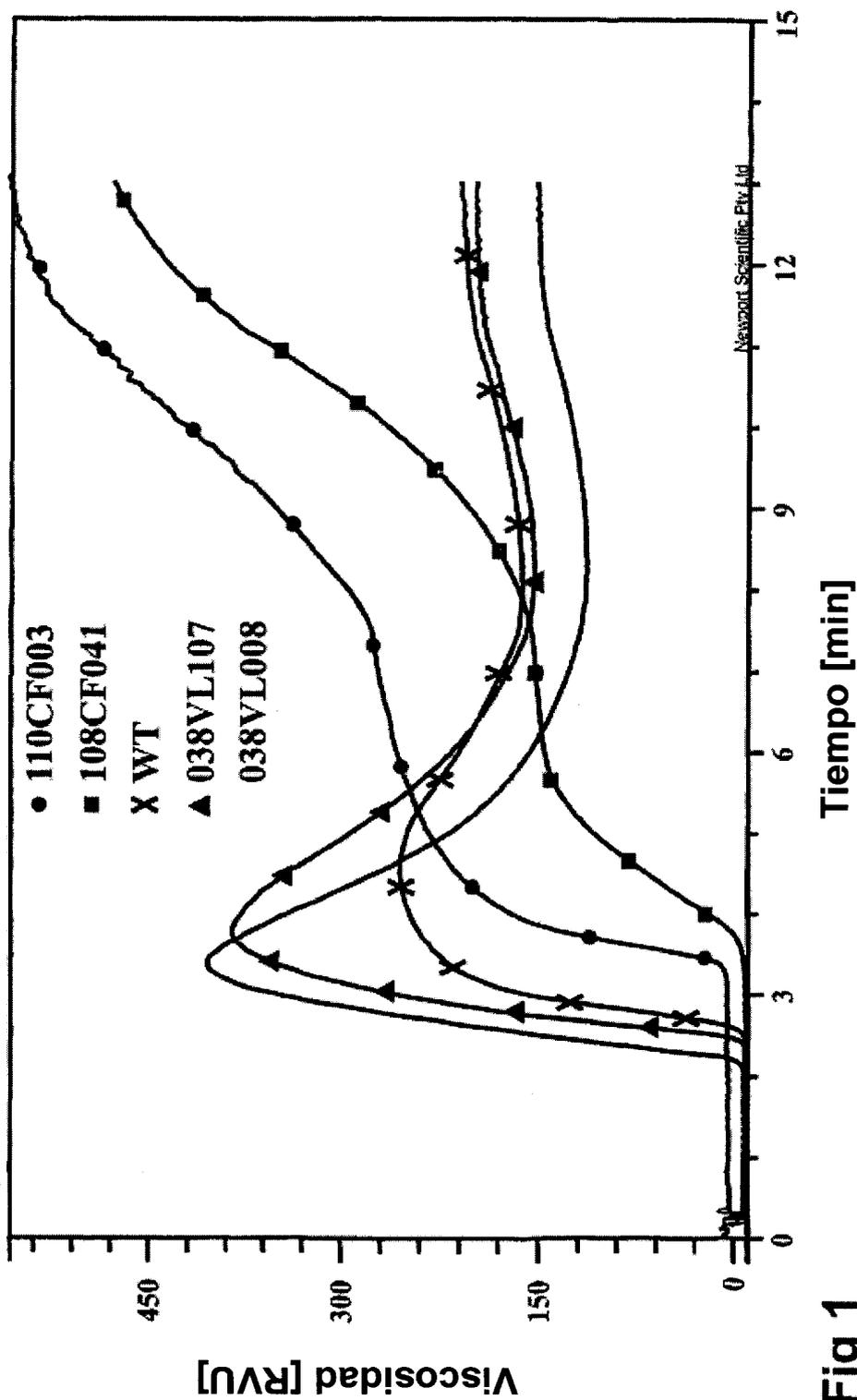


Fig 1

RVA - Método de análisis 2

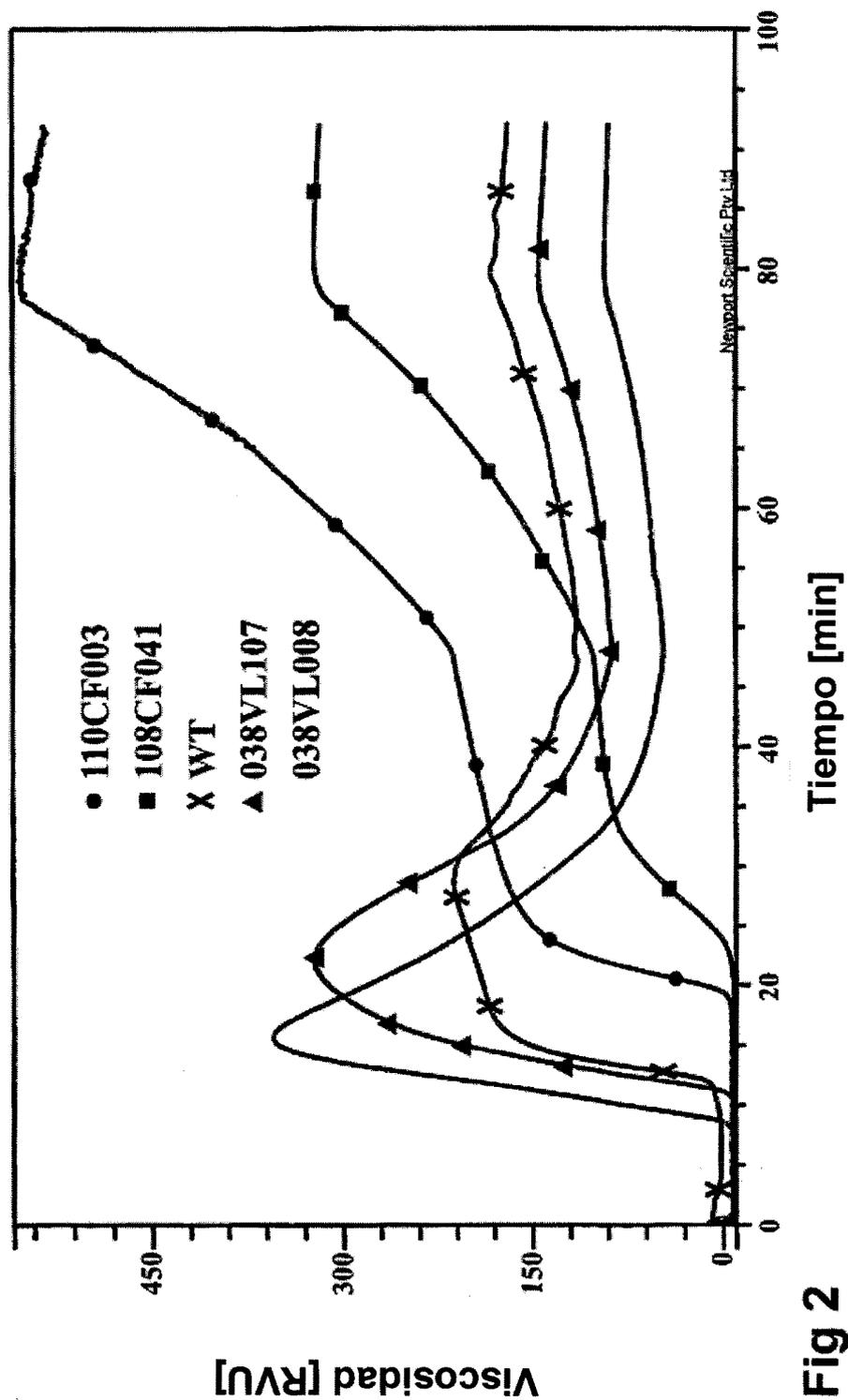


Fig 2

RVA – Método de análisis 3

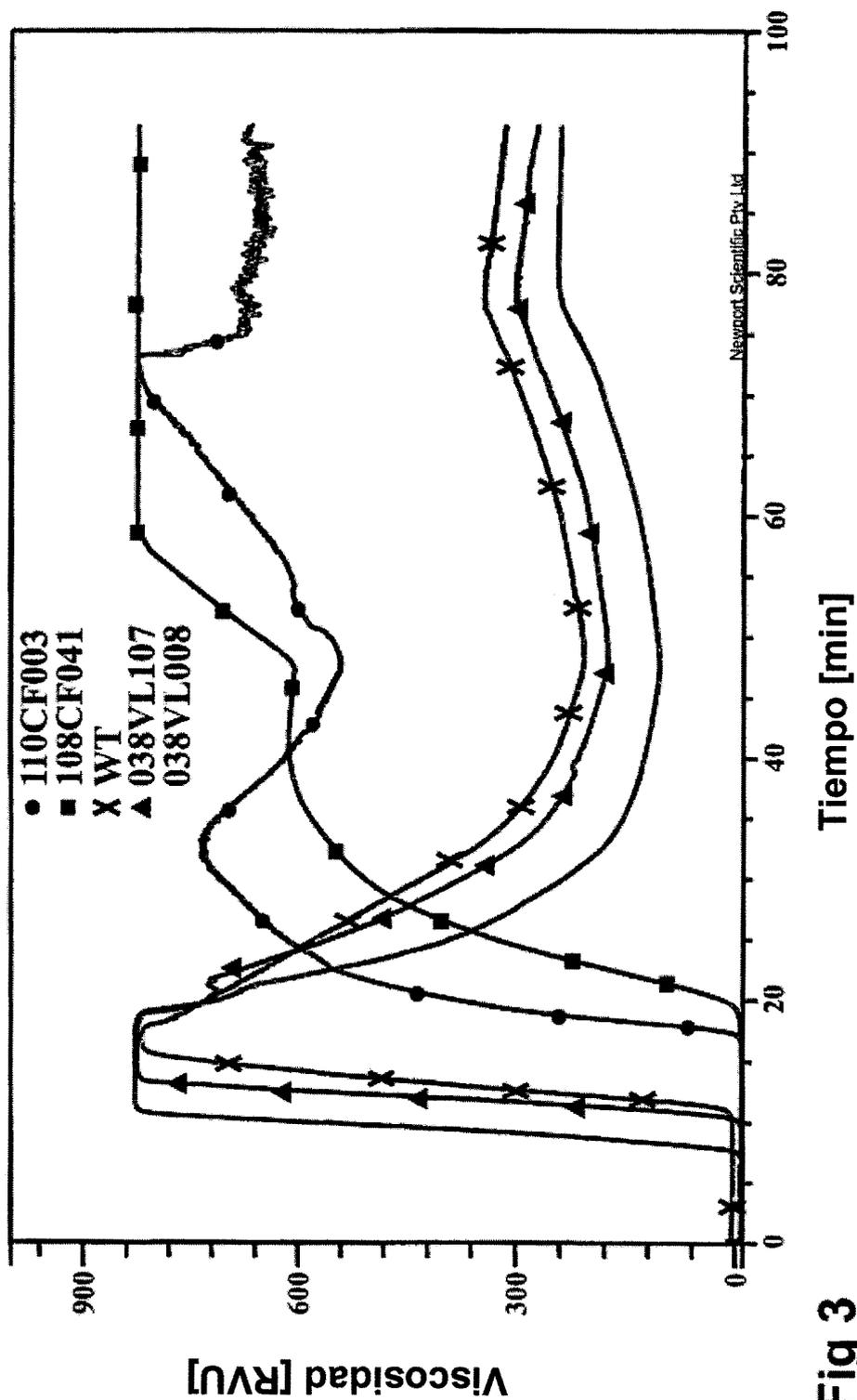


Fig 3

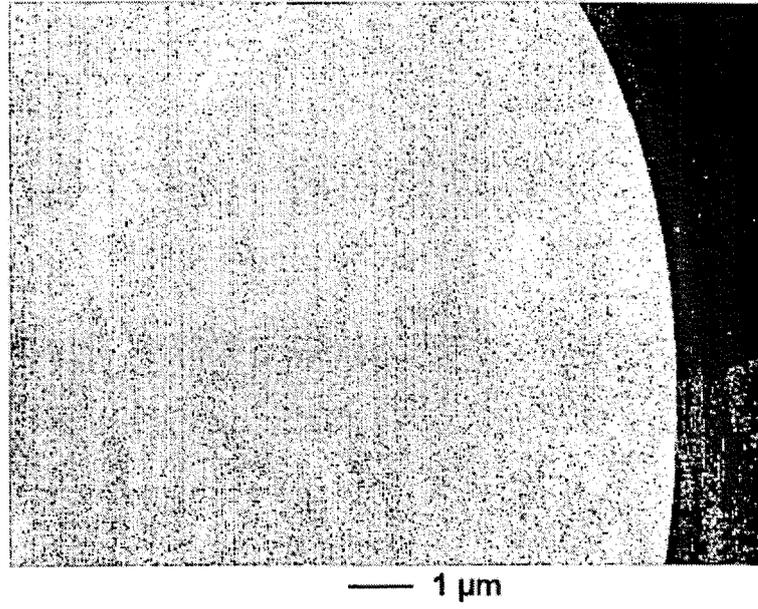


Fig 4

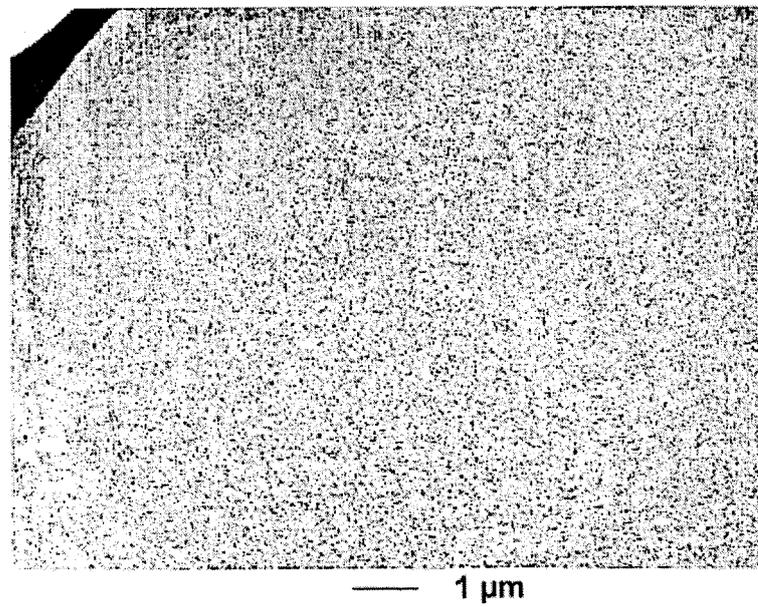


Fig 5

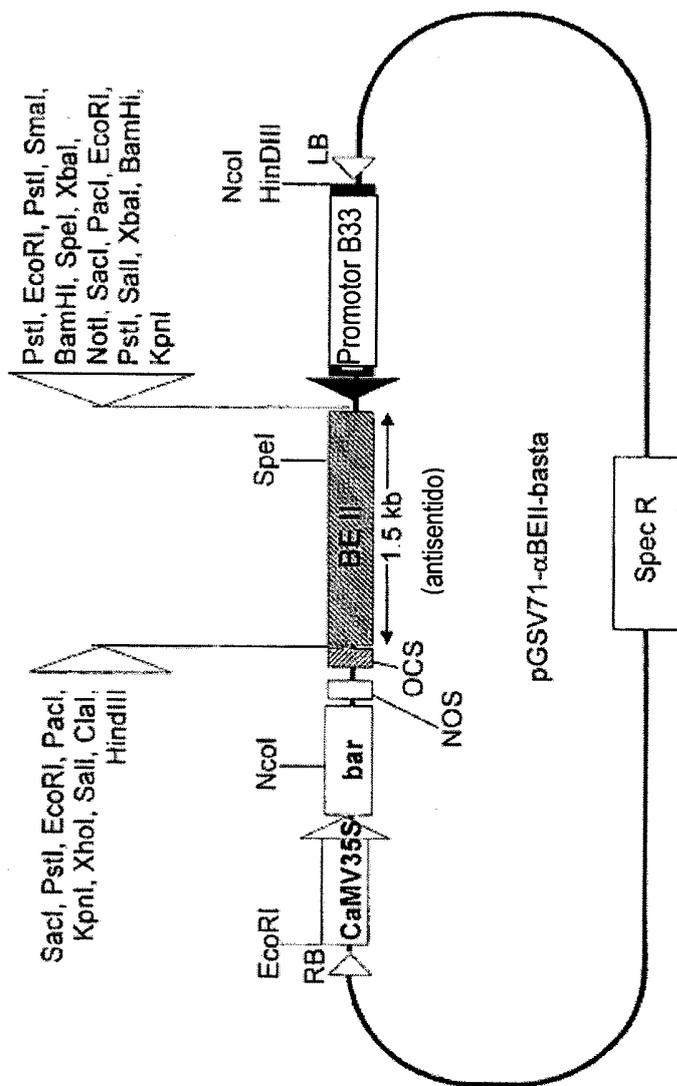


Fig 6

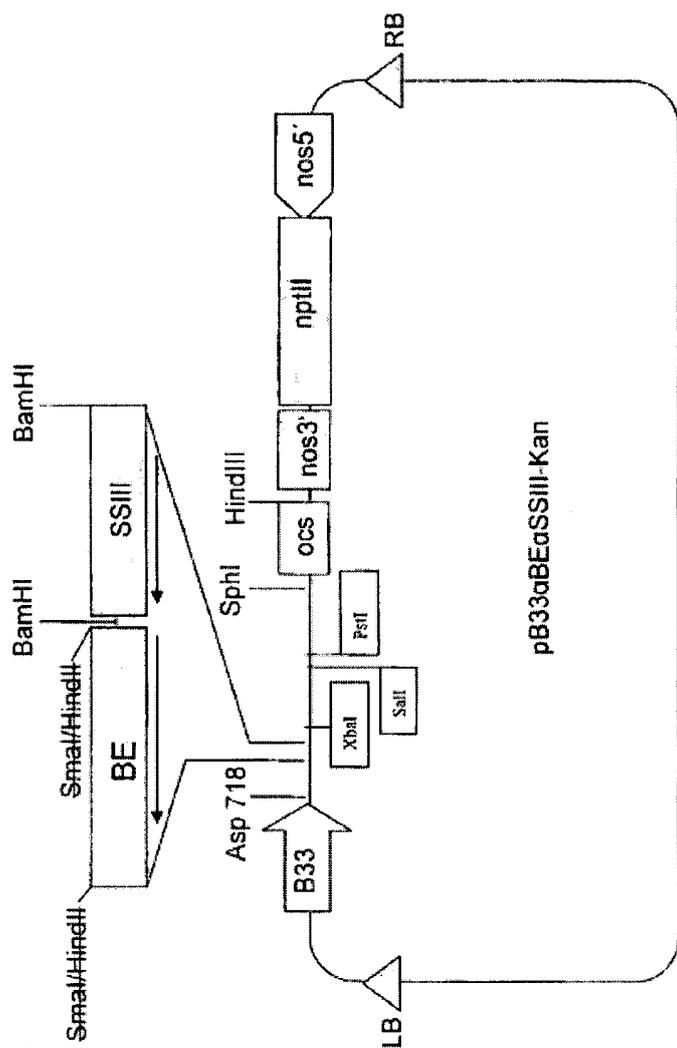


Fig 7

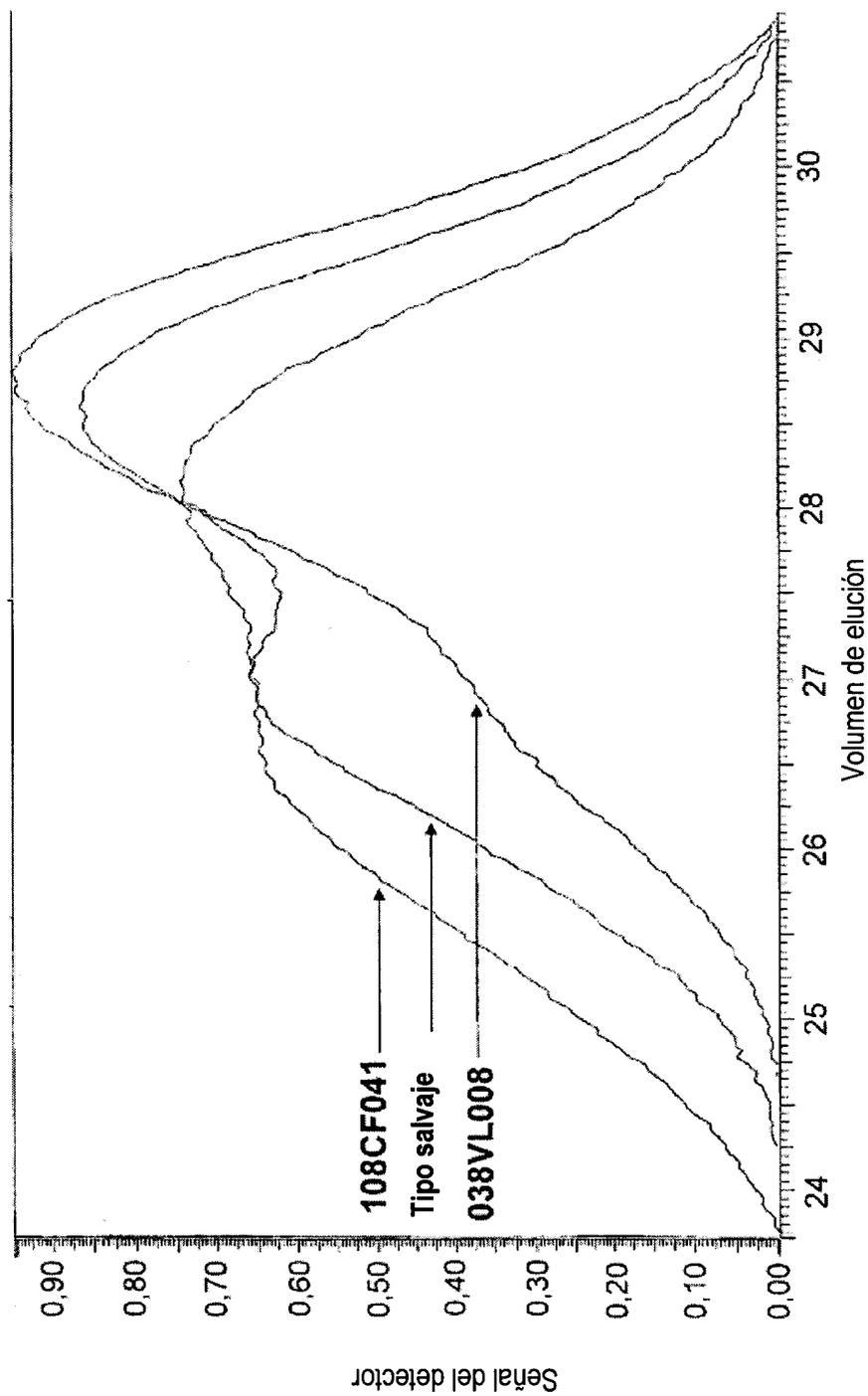


Fig 8

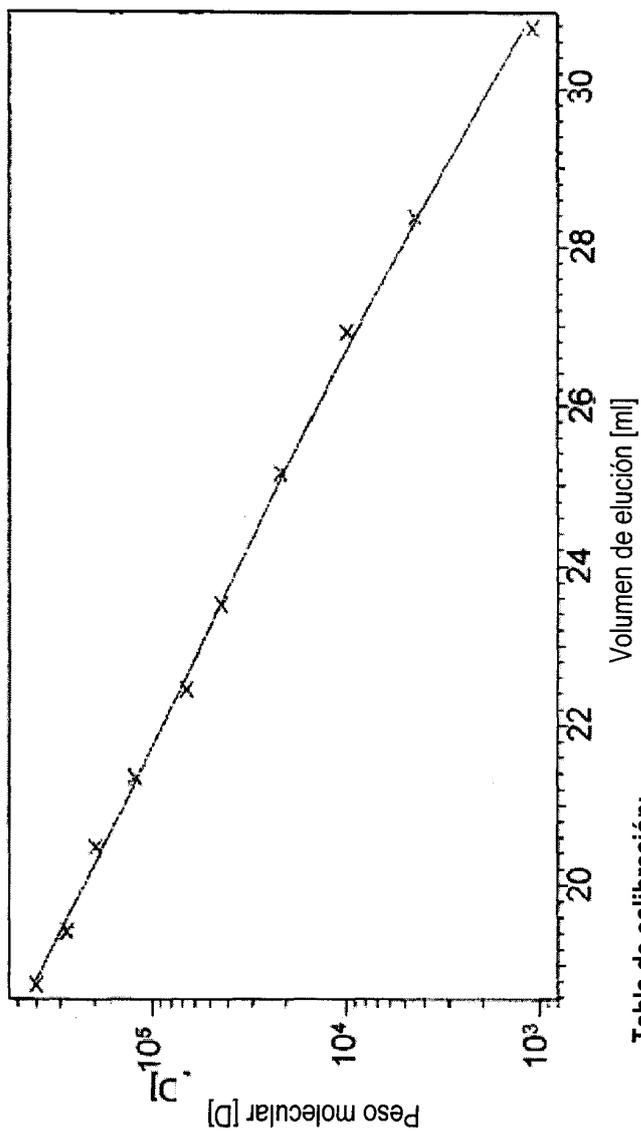


Tabla de calibración:

Volumen de elución [ml]	Peso molecular [D]	Denominación de la muestra
18.76	401300	Dextrano T670
19.41	276500	Dextrano T740
20.49	196300	Dextrano T270
21.35	123600	Dextrano T150
22.45	66700	Dextrano T80
23.52	43500	Dextrano T50
25.15	21400	Dextrano T25
26.92	9890	Dextrano T12
28.38	4440	Dextrano T5
30.77	1080	Dextrano T1

FIG. 9

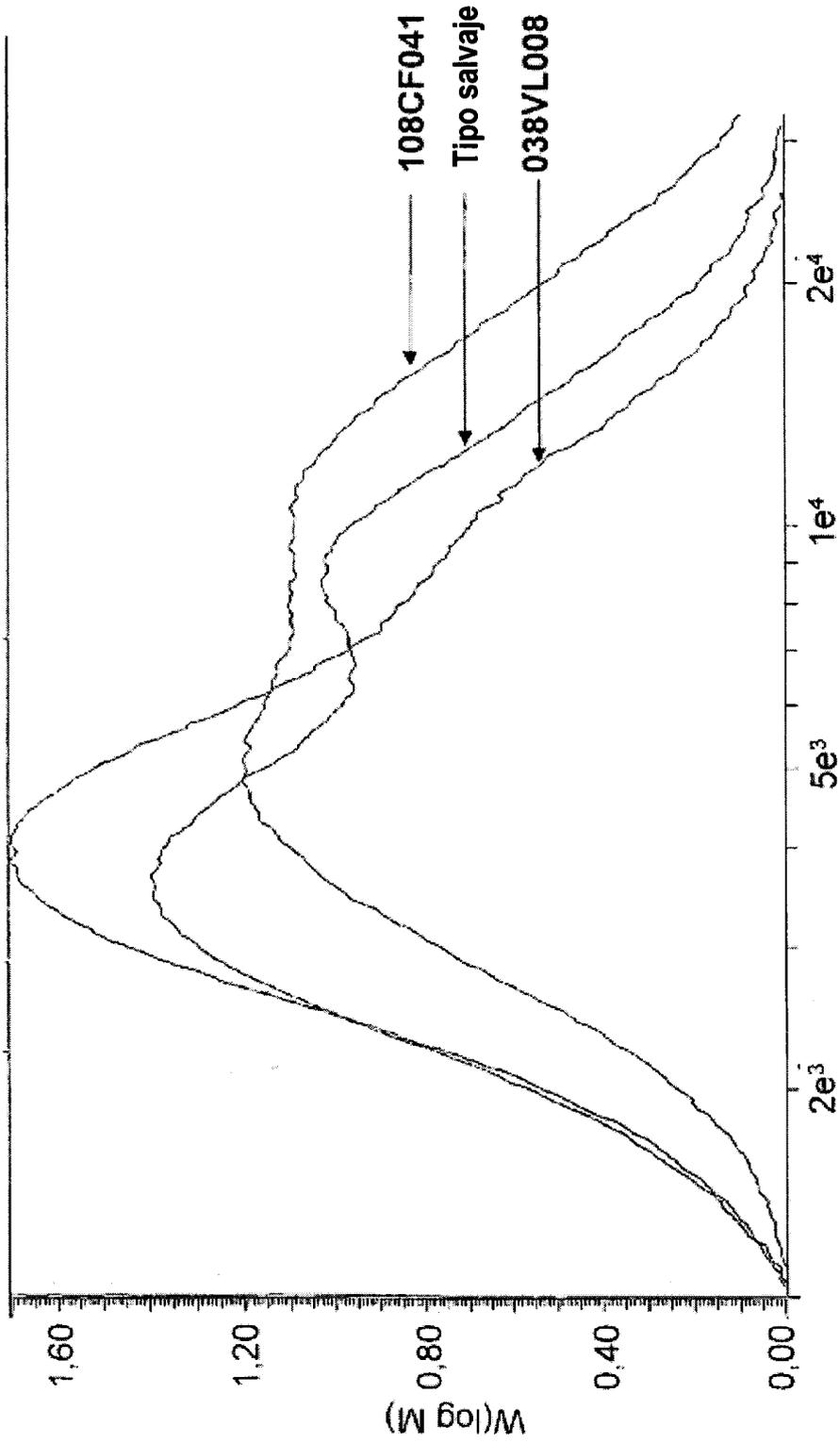


Fig 10

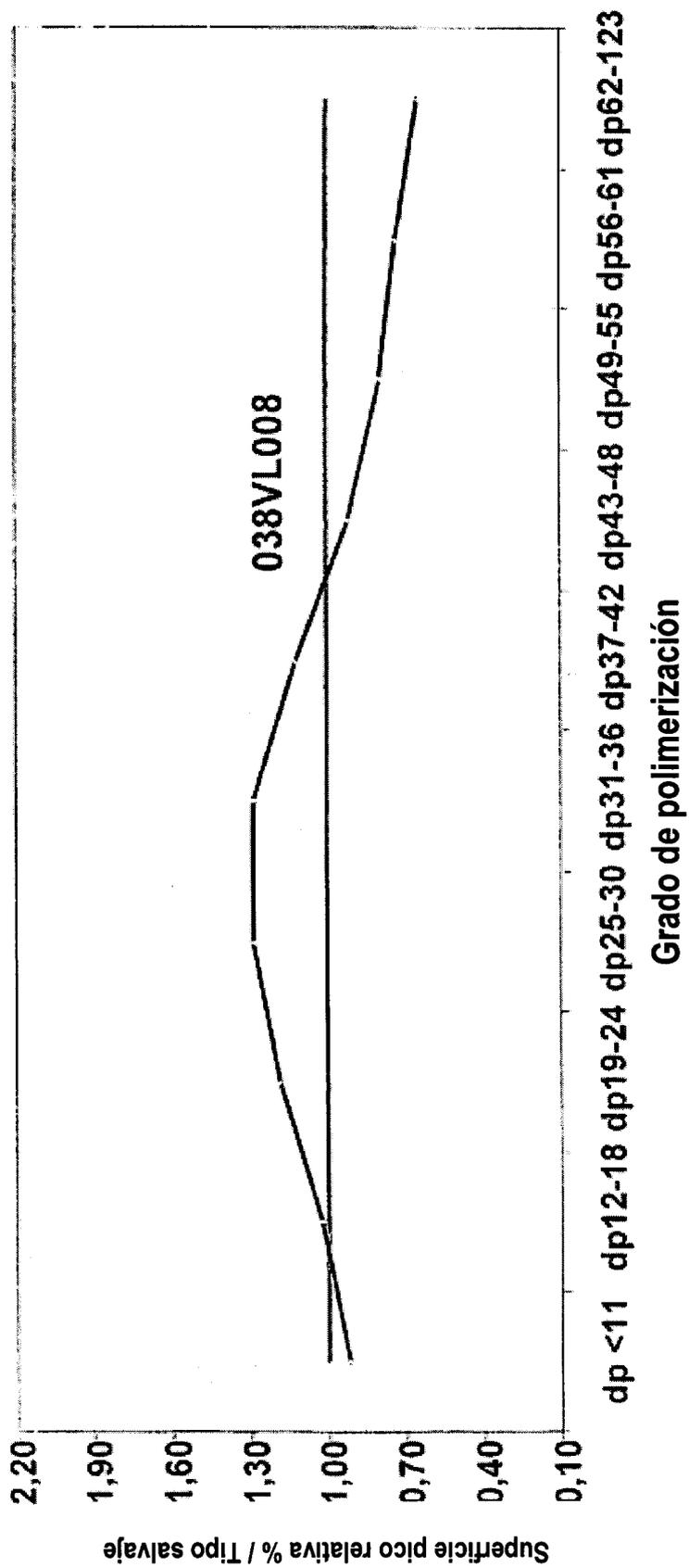
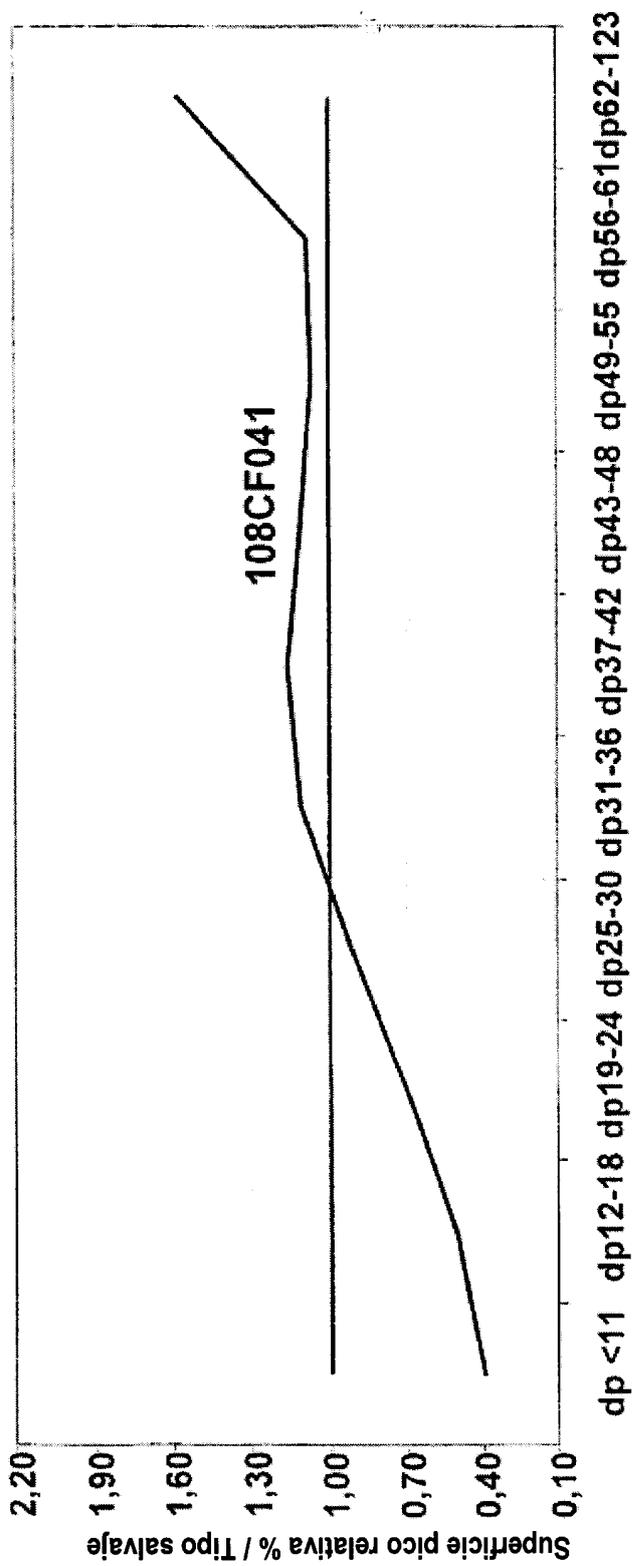


Fig 11



Grado de polimerización

Fig 12

ES 2 310 256 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Bayer CropScience GmbH
- 5 <120> Células de plantas y plantas que sintetizan un almidón con una viscosidad final incrementada
- <130> BCS 02 5002 - PCT
- 10 <150> EP 02028530.0
<151> 2002-12-19
- <150> EP 03090275.3
- 15 <151> 2003-08-29
- <160> 8
- 20 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 4167
- 25 <212> DNA
<213> *Solanum tuberosum*
- <220>
- 30 <221> CDS
<222> (207) .. (3899)
<223>
- 35 <300>
<301> Abel G J Springer F Willmitzer I and Kossmann I
<302> Clonación y análisis funcional de un cDNA que codifica un nuevo 139 kDa
- 40 <303> Plant J.
<304> 10
<305> 6
- 45 <306> 981-991
<307> 1996
<308> X94400
<309> 1995-12-22
- 50 <313> (1)..(4167)
- <300>
- 55 <308> EMBL / X94400
<309> 1997-04-16
<313> (1) .. (4167)
- 60
- 65

ES 2 310 256 T3

<400> 1

ttttttaata gatttttaaa accccattaa agcaaatacg tatataattg cagcacagat
60

5 acagagaggg agagagaaaag atagtgtgtt gatgaaggag aagagagata tttcacatgg
120

gatgttctat ttgattctgt ggtgaacaag agttttacaa agaacattcc tttttctttt
180

tttcttggtt cttgtgtggg tcagecc atg gat gtt cca ttt cca ctg cat aga
233

15 Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg
1 5

20 cca.ttg agt tgc aca agt gtc tcc aat gca ata acc cac ctc aag atc
281

Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile

25 10 15 20 25

aaa cct ttt ctt ggg ttt gtc tct cat gga acc aca agt cta tca gta
329

Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val

30 30 35 40

35 caa tct tct tca tgg agg aag gat gga atg gtt act ggg gtt tca ttt
377

Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe

40 45 50 55

cca ttt tgt gca aat ctc tcc gga aga aga cgg aga aaa gtt tca act
425

Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr

45 60 65 70

act agg agt caa gga tct tca cct aag ggg ttt gtg cca agg aag ccc
473

Thr Arg Ser Gln Gly Ser Ser Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro

50 75 80 85

55 tca ggg atg agc acg caa aga aag gtt cag aag agc aat ggt gat aaa
521

Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg Lys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys

60 90 95 100 105

65 gaa agt caa agt act tca aca tct aaa gaa tct gaa att tcc aac cag
569

Glu Ser Gln Ser Thr Ser Thr Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln

110 115 120

ES 2 310 256 T3

aag acg gtt gaa gca aga gtt gaa act agt gac gat gac act aaa gta
 617
 Lys Thr Val Glu Ala Arg Val Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val
 5 125 130 135

gtg gtg agg gac cac aag ttt ctg gag gat gag gat gaa atc aat ggt
 665
 Val Val Arg Asp His Lys Phe Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly
 10 140 145 150

tct act aaa tca ata agt atg tca cct gtt cgt gta tca tct caa ttt
 713
 Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe
 15 155 160 165

gtt gaa agt gaa gaa act ggt ggt gat gac aag gat gct gta aag tta
 761
 Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu
 20 170 175 180 185

aac aaa tca aag aga tcg gaa gag agt gat ttt cta att gat tct gta
 809
 Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val
 25 190 195 200

ata aga gaa caa agt gga tct cag ggg gaa act aat gcc agt agc aag
 857
 Ile Arg Glu Gln Ser Gly Ser Gln Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys
 30 205 210 215

gga agc cat gct gtg ggt aca aaa ctt tat gag ata ttg cag gtg gat
 905
 Gly Ser His Ala Val Gly Thr Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp
 35 220 225 230

gtt gag cca caa caa ttg aaa gaa aat aat gct ggg aat gtt gaa tac
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 310 256 T3

953
 Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr
 5 235 240 245

aaa gga cct gta gca agt aag cta ttg gaa att act aag gct agt gat
 1001
 10 Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp
 250 255 260 265

gtg gaa cac act gaa agc aat gag att gat gac tta gac act aat agt
 1049
 15 Val Glu His Thr Glu Ser Asn Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser
 20 270 275 280

ttc ttt aaa tca gat tta att gaa gag gat gag cca tta gct gca gga
 1097
 25 Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly
 285 290 295

aca gtg gag act gga gat tct tct cta aac tta aga ttg gag atg gaa
 1145
 30 Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu
 35 300 305 310

gca aat cta cgt agg cag gct ata gaa agg ctt gcc gag gaa aat tta
 1193
 40 Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu
 315 320 325

ttg caa ggg atc aga tta ttt tgt ttt cca gag gtt gta aaa cct gat
 1241
 45 Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp
 330 335 340 345

gaa gat gtc gag ata ttt ctt aac aga ggt ctt tcc act ttg aag aat
 1289
 50 Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn
 55

60

65

ES 2 310 256 T3

	350	355	360
5	gag tct gat gtc ttg att atg gga gct ttt aat gag tgg cgc tat agg 1337 Glu Ser Asp Val Leu Ile Met Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg		
	365	370	375
10	tct ttt act aca agg cta act gag act cat ctc aat gga gat tgg tgg 1385 Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp		
15	380	385	390
20	tct tgc aag atc cat gtt ccc aag gaa gca tac agg gct gat ttt gtg 1433 Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val		
	395	400	405
25	ttt ttt aat gga caa gat gtc tat gac aac aat gat gga aat gac ttc 1481 Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe		
30	410	415	420
	agt ata act gtg aaa ggt ggt atg caa atc att gac ttt gaa aat ttc 1529 Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe		
35	430	435	440
40	ttg ctt gag gag aaa tgg aga gaa cag gag aaa ctt gct aaa gaa caa 1577 Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln		
45	445	450	455
	gct gaa aga gaa aga cta gcg gaa gaa caa aga cga ata gaa gca gag 1625 Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu		
50	460	465	470
55			
60			
65			

ES 2 310 256 T3

5 aaa gct gaa att gaa gct gac aga gca caa gca aag gaa gag gct gca
 1673
 Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala
 475 480 485

10 aag aaa aag aaa gta ttg cga gaa ttg atg gta aaa gcc acg aag act
 1721
 Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr
 490 495 500 505

15 cgt gat atc acg tgg tac ata gag cca agt gaa ttt aaa tgc gag gac
 1769
 Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp
 510 515 520

25 aag gtc agg tta tac tat aac aaa agt tca ggt cct ctc tcc cat gct
 1817
 Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala
 525 530 535

30 aag gac ttg tgg atc cac gga gga tat aat aat tgg aag gat ggt ttg
 1865
 Lys Asp Leu Trp Ile His Gly Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu
 540 545 550

35 tct att gtc aaa aag ctt gtt aaa tct gag aga ata gat ggt gat tgg
 1913
 Ser Ile Val Lys Lys Leu Val Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp
 555 560 565

45 tgg tat aca gag gtt gtt att cct gat cag gca ctt ttc ttg gat tgg
 1961
 Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp
 570 575 580 585

50 gtt ttt gct gat ggt cca ccc aag cat gcc att gct tat gat aac aat
 2009
 Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn

55

60

65

ES 2 310 256 T3

	590	595	600
5	cac cgc caa gac ttc cat gcc att gtc ccc aac cac att ccg gag gaa 2057		
	His Arg Gln Asp Phe His Ala Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu		
	605	610	615
10	tta tat tgg gtt gag gaa gaa cat cag atc ttt aag aca ctt cag gag 2105		
	Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu		
15	620	625	630
20	gag aga agg ctt aga gaa gcg gct atg cgt gct aag gtt gaa aaa aca 2153		
	Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr		
	635	640	645
25	gca ctt ctg aaa act gaa aca aag gaa aga act atg aaa tca ttt tta 2201		
	Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu		
30	650	655	660
	665		
35	ctg tct cag aag cat gta gta tat act gag cct ctt gat atc caa gct 2249		
	Leu Ser Gln Lys His Val Val Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala		
	670	675	680
40	gga agc agc gtc aca gtt tac tat aat ccc gcc aat aca gta ctt aat 2297		
	Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn		
45	685	690	695
50	ggt aaa cct gaa att tgg ttc aga tgt tca ttt aat cgc tgg act cac 2345		
	Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His		
	700	705	710

ES 2 310 256 T3

cgc ctg ggt cca ttg cca cct cag aaa atg tcg cct gct gaa aat ggc
 2393
 Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly
 5 715 720 725

acc cat gtc aga gca act gtg aag gtt cca ttg gat gca tat atg atg
 2441
 Thr His Val Arg Ala Thr Val Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met
 10 730 735 740 745

gat ttt gta ttt tcc gag aga gaa gat ggt ggg att ttt gac aat aag
 2489
 Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys
 15 750 755 760

agc gga atg gac tat cac ata cct gtg ttt gga gga gtc gct aaa gaa
 2537
 Ser Gly Met Asp Tyr His Ile Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu
 20 765 770 775

cct cca atg cat att gtc cat att gct gtc gaa atg gca cca att gca
 2585
 Pro Pro Met His Ile Val His Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala
 25 780 785 790

aag gtg gga ggc ctt ggt gat gtt gtt act agt ctt tcc cgt gct gtt
 2633
 Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val
 30 795 800 805

caa gat tta aac cat aat gtg gat att atc tta cct aag tat gac tgt
 2681
 Gln Asp Leu Asn His Asn Val Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys
 35 810 815 820 825

ttg aag atg aat aat gtg aag gac ttt cgg ttt cac aaa aac tac ttt
 2729
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 310 256 T3

	Leu	Lys	Met	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Phe	Arg	Phe	His	Lys	Asn	Tyr	Phe
					830					835					840	
5	tgg ggt ggg act gaa ata aaa gta tgg ttt gga aag gtg gaa ggt ctc 2777															
	Trp	Gly	Gly	Thr	Glu	Ile	Lys	Val	Trp	Phe	Gly	Lys	Val	Glu	Gly	Leu
10				845					850					855		
	tcg gtc tat ttt ttg gag cct caa aac ggg tta ttt tcg aaa ggg tgc 2825															
15	Ser	Val	Tyr	Phe	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Gly	Cys
				860					865					870		
20	tgc tat ggt tgt agc aat gat ggt gaa cga ttt ggt ttc ttc tgt cac 2873															
	Val	Tyr	Gly	Cys	Ser	Asn	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Gly	Phe	Phe	Cys	His
25		875						880						885		
	gcg gct ttg gag ttt ctt ctg caa ggt gga ttt agt ccg gat atc att 2921															
30	Ala	Ala	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Ile	Ile
						890			895				900			905
35	cat tgc cat gat tgg tct agt gct cct gtt gct tgg ctc ttt aag gaa 2969															
	His	Cys	His	Asp	Trp	Ser	Ser	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Leu	Phe	Lys	Glu
40					910					915				920		
	caa tat aca cac tat ggt cta agc aaa tct cgt ata gtc ttc acg ata 3017															
45	Gln	Tyr	Thr	His	Tyr	Gly	Leu	Ser	Lys	Ser	Arg	Ile	Val	Phe	Thr	Ile
					925					930				935		
50	cat aat ctt gaa ttt ggg gca gat ctc att ggg aga gca atg act aac 3065															
	His	Asn	Leu	Glu	Phe	Gly	Ala	Asp	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Met	Thr	Asn
55				940					945					950		

ES 2 310 256 T3

5 gca gac aaa gct aca aca gtt tca cca act tac tca cag gag gtg tct
 3113
 Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser
 955 960 965

10 gga aac cct gta att gcg cct cac ctt cac aag ttc cat ggt ata gtg
 3161
 Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val
 970 975 980 985

15 aat ggg att gac cca gat att tgg gat cct tta aac gat aag ttc att
 3209
 Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile
 990 995 1000

25 ccg att ccg tac acc tca gaa aac gtt gtt gaa ggc aaa aca gca
 3254
 Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala
 1005 1010 1015

30 gcc aag gaa gct ttg cag cga aaa ctt gga ctg aaa cag gct gac
 3299
 Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp
 1020 1025 1030

35 ctt cct ttg gta gga att atc acc cgc tta act cac cag aaa gga
 3344
 Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly
 1035 1040 1045

45 atc cac ctc att aaa cat gct att tgg cgc acc ttg gaa cgg aac
 3389
 Ile His Leu Ile Lys His Ala Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn
 1050 1055 1060

50 gga cag gta gtc ttg ctt ggt tct gct cct gat cct agg gta caa

55
60
65

ES 2 310 256 T3

	3434	Gly Gln Val Val	Leu Leu Gly Ser Ala	Pro Asp Pro Arg Val	Gln
5		1065		1070	1075
	aac gat ttt gtt 3479	aat ttg gca aat caa	ttg cac tcc aaa tat	aat	
10		Asn Asp Phe Val	Asn Leu Ala Asn Gln	Leu His Ser Lys Tyr	Asn
		1080		1085	1090
15		gac cgc gca cga 3524	ctc tgt cta aca tat	gac gag cca ctt tct	cac
		Asp Arg Ala Arg	Leu Cys Leu Thr Tyr	Asp Glu Pro Leu Ser	His
20		1095		1100	1105
25		ctg ata tat gct 3569	ggt gct gat ttt att	cta gtt cct tca ata	ttt
		Leu Ile Tyr Ala	Gly Ala Asp Phe Ile	Leu Val Pro Ser Ile	Phe
		1110		1115	1120
30		gag cca tgt gga 3614	cta aca caa ctt acc	gct atg aga tat ggt	tca
		Glu Pro Cys Gly	Leu Thr Gln Leu Thr	Ala Met Arg Tyr Gly	Ser
		1125		1130	1135
35		att cca gtc gtg 3659	cgt aaa act gga gga	ctt tat gat act gta	ttt
		Ile Pro Val Val	Arg Lys Thr Gly Gly	Leu Tyr Asp Thr Val	Phe
40		1140		1145	1150
45		gat gtt gac cat 3704	gac aaa gag aga gca	caa cag tgt ggt ctt	gaa
		Asp Val Asp His	Asp Lys Glu Arg Ala	Gln Gln Cys Gly Leu	Glu
		1155		1160	1165
50		cca aat gga ttc 3749	agc ttt gat gga gca	gat gct gcc gga gtt	gat
		Pro Asn Gly Phe	Ser Phe Asp Gly Ala	Asp Ala Gly Gly Val	Asp

55

60

65

ES 2 310 256 T3

	1170	1175	1180
5	tat gct ctg aat 3794	aga gct ctc tct gct	tgg tac gat ggt cgg gat
	Tyr Ala Leu Asn	Arg Ala Leu Ser Ala	Trp Tyr Asp Gly Arg Asp
	1185	1190	1195
10	tgg ttc aac tct 3839	tta tgc aag cag gtc	atg gaa caa gat tgg tct
	Trp Phe Asn Ser	Leu Cys Lys Gln Val	Met Glu Gln Asp Trp Ser
15	1200	1205	1210
20	tgg aac cga cct 3884	gct ctt gat tat ttg	gag ctt tac cat gct gct
	Trp Asn Arg Pro	Ala Leu Asp Tyr Leu	Glu Leu Tyr His Ala Ala
	1215	1220	1225
25	aga aag tta gaa 3939	tag ttagtttgtag	agatgctagc agaaaaattc acgagatctg
	Arg Lys Leu Glu		
	1230		
30	caatctgtac aggttcagtg 3999	tttgcgtctg gacagctttt	ttatttccta tatcaaagta
35	taaatcaagt ctacactgag 4059	atcaatagca gacagtcctc	agttcatttc atttttgtg
	caacatatga aagagottag 4119	cctctaataa tgtagtcatt	gatgattatt tgttttggga
40	agaaatgaga aatcaaagga 4167	tgcaaaatc tctgaaaaaa	aaaaaaaa
45	<210> 2		
	<211> 1230		
	<212> PRT		
	<213> <i>Solanum tuberosum</i>		
50			
55			
60			
65			

ES 2 310 256 T3

<400> 2

5	Met	Asp	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	His	Arg	Pro	Leu	Ser	Cys	Thr	Ser	Val
	1				5					10					15	
10	Ser	Asn	Ala	Ile	Thr	His	Leu	Lys	Ile	Lys	Pro	Phe	Leu	Gly	Phe	Val
			20						25					30		
15	Ser	His	Gly	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Trp	Arg	Lys
			35					40					45			
20	Asp	Gly	Met	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Pro	Phe	Cys	Ala	Asn	Leu	Ser
		50					55					60				
25	Gly	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Val	Ser	Thr	Thr	Arg	Ser	Gln	Gly	Ser	Ser
	65					70					75					80
30	Pro	Lys	Gly	Phe	Val	Pro	Arg	Lys	Pro	Ser	Gly	Met	Ser	Thr	Gln	Arg
				85						90					95	
35	Lys	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Gln	Ser	Thr	Ser	Thr
				100					105					110		
40	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Ile	Ser	Asn	Gln	Lys	Thr	Val	Glu	Ala	Arg	Val
			115					120					125			
45	Glu	Thr	Ser	Asp	Asp	Asp	Thr	Lys	Val	Val	Val	Arg	Asp	His	Lys	Phe
		130					135					140				
50	Leu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Ile	Asn	Gly	Ser	Thr	Lys	Ser	Ile	Ser	Met
	145					150					155					160
55	Ser	Pro	Val	Arg	Val	Ser	Ser	Gln	Phe	Val	Glu	Ser	Glu	Glu	Thr	Gly
				165						170					175	
60	Gly	Asp	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Leu	Asn	Lys	Ser	Lys	Arg	Ser	Glu
				180					185					190		

ES 2 310 256 T3

Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val Ile Arg Glu Gln Ser Gly Ser
 195 200 205
 5
 Gln Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys Gly Ser His Ala Val Gly Thr
 210 215 220
 10
 Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys
 225 230 235 240
 15
 Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys
 245 250 255
 20
 Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp Val Glu His Thr Glu Ser Asn
 260 265 270
 25
 Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile
 275 280 285
 30
 Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser
 290 295 300
 35
 Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala
 305 310 315 320
 40
 Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe
 325 330 335
 45
 Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu
 340 345 350
 50
 Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn Glu Ser Asp Val Leu Ile Met
 355 360 365
 55
 Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr
 370 375 380
 60
 Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro
 385 390 395 400
 65

ES 2 310 256 T3

	Lys	Glu	Ala	Tyr	Arg	Ala	Asp	Phe	Val	Phe	Phe	Asn	Gly	Gln	Asp	Val
					405					410					415	
5	Tyr	Asp	Asn	Asn	Asp	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Ile	Thr	Val	Lys	Gly	Gly
			420						425					430		
10	Met	Gln	Ile	Ile	Asp	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Trp	Arg
			435					440						445		
15	Glu	Gln	Glu	Lys	Leu	Ala	Lys	Glu	Gln	Ala	Glu	Arg	Glu	Arg	Leu	Ala
		450					455					460				
20	Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Glu	Ile	Glu	Ala	Asp
	465					470					475					480
25	Arg	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Arg
					485					490					495	
30	Glu	Leu	Met	Val	Lys	Ala	Thr	Lys	Thr	Arg	Asp	Ile	Thr	Trp	Tyr	Ile
				500					505					510		
35	Glu	Pro	Ser	Glu	Phe	Lys	Cys	Glu	Asp	Lys	Val	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Asn
			515					520					525			
40	Lys	Ser	Ser	Gly	Pro	Leu	Ser	His	Ala	Lys	Asp	Leu	Trp	Ile	His	Gly
		530					535					540				
45	Gly	Tyr	Asn	Asn	Trp	Lys	Asp	Gly	Leu	Ser	Ile	Val	Lys	Lys	Leu	Val
	545					550					555					560
50	Lys	Ser	Glu	Arg	Ile	Asp	Gly	Asp	Trp	Trp	Tyr	Thr	Glu	Val	Val	Ile
					565					570					575	
55	Pro	Asp	Gln	Ala	Leu	Phe	Leu	Asp	Trp	Val	Phe	Ala	Asp	Gly	Pro	Pro
				580					585					590		
60	Lys	His	Ala	Ile	Ala	Tyr	Asp	Asn	Asn	His	Arg	Gln	Asp	Phe	His	Ala
			595					600					605			
65																

ES 2 310 256 T3

Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu
 610 615 620

5

His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala
 625 630 635 640

10

Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr
 645 650 655

15

Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu Leu Ser Gln Lys His Val Val
 660 665 670

20

Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr
 675 680 685

25

Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe
 690 695 700

30

Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro
 705 710 715 720

35

Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly Thr His Val Arg Ala Thr Val
 725 730 735

40

Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg
 740 745 750

45

Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys Ser Gly Met Asp Tyr His Ile
 755 760 765

50

Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu Pro Pro Met His Ile Val His
 770 775 780

55

Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp
 785 790 795 800

60

Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val Gln Asp Leu Asn His Asn Val
 805 810 815

65

ES 2 310 256 T3

Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Leu Lys Met Asn Asn Val Lys
 820 825 830
 5
 Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys
 835 840 845
 10
 Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro
 850 855 860
 15
 Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp
 865 870 875 880
 20
 Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu
 885 890 895
 25
 Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Ser Ser
 900 905 910
 30
 Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu Gln Tyr Thr His Tyr Gly Leu
 915 920 925
 35
 Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile His Asn Leu Glu Phe Gly Ala
 930 935 940
 40
 Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val
 945 950 955 960
 45
 Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro
 965 970 975
 50
 His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile
 980 985 990
 55
 Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu
 995 1000 1005
 60
 Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg
 1010 1015 1020
 65

ES 2 310 256 T3

Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile
 1025 1030 1035
 5 Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly Ile His Leu Ile Lys His Ala
 1040 1045 1050
 10 Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn Gly Gln Val Val Leu Leu Gly
 1055 1060 1065
 15 Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala
 1070 1075 1080
 20 Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu
 1085 1090 1095
 25 Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His Leu Ile Tyr Ala Gly Ala Asp
 1100 1105 1110
 30 Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln
 1115 1120 1125
 35 Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser Ile Pro Val Val Arg Lys Thr
 1130 1135 1140
 40 Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe Asp Val Asp His Asp Lys Glu
 1145 1150 1155
 45 Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu Pro Asn Gly Phe Ser Phe Asp
 1160 1165 1170
 50 Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp Tyr Ala Leu Asn Arg Ala Leu
 1175 1180 1185
 55 Ser Ala Trp Tyr Asp Gly Arg Asp Trp Phe Asn Ser Leu Cys Lys
 1190 1195 1200
 60 Gln Val Met Glu Gln Asp Trp Ser Trp Asn Arg Pro Ala Leu Asp
 1205 1210 1215
 65 Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala Arg Lys Leu Glu
 1220 1225 1230

55 <210> 3

<211> 61

<212> PRT

60 <213> *Solanum tuberosum*

65

ES 2 310 256 T3

<400> 3

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

20 <210> 4

<211> 1641

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

25

<400> 4

30 atgaagcaca gttcagctat ttccgctggt ttgaccgatg acaattcgac aatggcaccc
60
ctagaggaag atgtcaacac tgaaaatatt ggctctctaa atttggatcc aactttggaa
120
35 ccttatctag atcacttcag acacagaatg aagagatatg tggatcagaa aatgctcatt
180

40

45

50

55

60

65

ES 2 310 256 T3

gaaaaatatg agggaccct tgaggaattt gctcaaggtt attttaaatt tggattcaac
 240

5 agggaagatg gttgcatagt ctatcgtgaa tgggctcctg ctgctcagga agcagaagtt
 300

attggcgatt tcaatggtag gaacggttct aaccacatga tggagaagga ccagtttggg
 360

10 gtttggagta ttagaattcc tgatgttgac agtaagccag tcattccaca caactccaga
 420

gttaagtttc gtttcaaaca tggtaatgga gtgtgggtag atcgtatccc tgcttggata
 480

15 aagtatgcca ctgcagacgc cacaaagttt gcagcaccat atgatgggtg ctactgggac
 540

20 ccaccacctt cagaaaggta ccacttcaaa taacctcgcc ctcccaaacc ccgagcccca
 600

cgaatctacg aagcacatgt eggcatgagc agctctgagc cacgtgtaa ttcgtatcgt
 660

25 gagtttgcag atgatgtttt acctcggatt aaggcaaata actataatac tgtccagttg
 720

atggccataa tggaacattc ttactatgga tcatttggat atcatgttac aaactttttt
 780

30 gctgtgagca atagatatgg aaaccoggag gacctaaagt atctgataga taaagcacat
 840

35 agcttggggt tacaggttct ggtggatgta gttcacagtc atgcaagcaa taatgtcact
 900

gatggcctca atggctttga tattggccaa ggttctcaag aatcctactt tcatgctgga
 960

40 gagegagggt accataagtt gtgggatagc aggotgttca actatgcca ttgggagggt
 1020

cttegtttcc ttctttccaa cttgaggtgg tggctagaag agtataactt tgacggattt
 1080

45 cgatttgatg gaataacttc tatgctgtat gttcatcatg gaatcaatat gggatttaca
 1140

ggaaactata atgagtattt cagcgaggct acagatgttg atgctgtggt ctatttaatg
 1200

50 ttggccaata atctgattca caagatttcc ccagacgcaa ctgtttattgc cgaagatgtt

55

60

65

ES 2 310 256 T3

1260

tctgggatgc cgggccttag ccggcctggt tctgagggag gaattggttt tgattaccgc
1320

5

ctggcaatgg caatcccaga taagtggata gattatttaa agaataagaa tgatgaagat
1380

10

tgggccatga aggaagtaac atcgagtttg acaaatagga gatatacaga gaagtgtata
1440

gcatatgcgg agagccatga tcagtcctatt gtcggtgaca agaccattgc atttctccta
1500

15

atgaacaaaag agatgtattc tggcatgtct tgcttgacag atgcttctcc tgttgttgat
1560

20

gcaggaattg cgcttgacaa gatgatccat ttttttcaca atggccttgg gaggagaggg
1620

gtacctcaat ttcattgggta a
1641

25 <210> 5

<211> 546

<212> PRT

30 <213> *Solanum tuberosum*

<300>

<308> Swiss Prot / P30924

35 <309> 1993-07-26

<400> 5

40 Met Lys His Ser Ser Ala Ile Ser Ala Val Leu Thr Asp Asp Asn Ser
1 5 10 15

45 Thr Met Ala Pro Leu Glu Glu Asp Val Asn Thr Glu Asn Ile Gly Leu
20 25 30

50

55

60

65

ES 2 310 256 T3

Leu Asn Leu Asp Pro Thr Leu Glu Pro Tyr Leu Asp His Phe Arg His
 35 40 45
 5
 Arg Met Lys Arg Tyr Val Asp Gln Lys Met Leu Ile Glu Lys Tyr Glu
 50 55 60
 10
 Gly Pro Leu Glu Glu Phe Ala Gln Gly Tyr Leu Lys Phe Gly Phe Asn
 65 70 75 80
 15
 Arg Glu Asp Gly Cys Ile Val Tyr Arg Glu Trp Ala Pro Ala Ala Gln
 85 90 95
 20
 Glu Ala Glu Val Ile Gly Asp Phe Asn Gly Arg Asn Gly Ser Asn His
 100 105 110
 25
 Met Met Glu Lys Asp Gln Phe Gly Val Trp Ser Ile Arg Ile Pro Asp
 115 120 125
 30
 Val Asp Ser Lys Pro Val Ile Pro His Asn Ser Arg Val Lys Phe Arg
 130 135 140
 35
 Phe Lys His Gly Asn Gly Val Trp Val Asp Arg Ile Pro Ala Trp Ile
 145 150 155 160
 40
 Lys Tyr Ala Thr Ala Asp Ala Thr Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Asp Gly
 165 170 175
 45
 Val Tyr Trp Asp Pro Pro Pro Ser Glu Arg Tyr His Phe Lys Tyr Pro
 180 185 190
 50
 Arg Pro Pro Lys Pro Arg Ala Pro Arg Ile Tyr Glu Ala His Val Gly
 195 200 205
 55
 Met Ser Ser Ser Glu Pro Arg Val Asn Ser Tyr Arg Glu Phe Ala Asp
 210 215 220
 60
 Asp Val Leu Pro Arg Ile Lys Ala Asn Asn Tyr Asn Thr Val Gln Leu
 225 230 235 240
 65

ES 2 310 256 T3

Met Ala Ile Met Glu His Ser Tyr Tyr Gly Ser Phe Gly Tyr His Val
 245 250 255
 5
 Thr Asn Phe Phe Ala Val Ser Asn Arg Tyr Gly Asn Pro Glu Asp Leu
 260 265 270
 10
 Lys Tyr Leu Ile Asp Lys Ala His Ser Leu Gly Leu Gln Val Leu Val
 275 280 285
 15
 Asp Val Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Val Thr Asp Gly Leu Asn
 290 295 300
 20
 Gly Phe Asp Ile Gly Gln Gly Ser Gln Glu Ser Tyr Phe His Ala Gly
 305 310 315 320
 25
 Glu Arg Gly Tyr His Lys Leu Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Ala
 325 330 335
 30
 Asn Trp Glu Val Leu Arg Phe Leu Leu Ser Asn Leu Arg Trp Trp Leu
 340 345 350
 35
 Glu Glu Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Ile Thr Ser Met
 355 360 365
 40
 Leu Tyr Val His His Gly Ile Asn Met Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Asn
 370 375 380
 45
 Glu Tyr Phe Ser Glu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met
 385 390 395 400
 50
 Leu Ala Asn Asn Leu Ile His Lys Ile Phe Pro Asp Ala Thr Val Ile
 405 410 415
 55
 Ala Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Gly Leu Ser Arg Pro Val Ser Glu
 420 425 430
 60
 Gly Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Arg Leu Ala Met Ala Ile Pro Asp Lys
 435 440 445
 65

ES 2 310 256 T3

	Trp	Ile	Asp	Tyr	Leu	Lys	Asn	Lys	Asn	Asp	Glu	Asp	Trp	Ser	Met	Lys
	450						455					460				
5	Glu	Val	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Arg	Arg	Tyr	Thr	Glu	Lys	Cys	Ile
	465					470					475					480
10	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Ser	Ile	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Ile
					485					490					495	
15	Ala	Phe	Leu	Leu	Met	Asn	Lys	Glu	Met	Tyr	Ser	Gly	Met	Ser	Cys	Leu
				500					505					510		
20	Thr	Asp	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Asp	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Asp	Lys	Met
			515					520					525			
25	Ile	His	Phe	Phe	His	Asn	Gly	Leu	Gly	Arg	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Phe
		530					535					540				
30	His	Gly														
	545															

<210> 6

<211> 2649

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

<300>

<308> EMBL / AJ011890

<309> 1999-04-07

<300>

<302> Mejoras en o relativas a la composición del almidón en las plantas

<308> EMBL / A58164

<309> 1998-03-05

<310> WO 96 34968

<311> 1996-05-03

<312> 1996-11-07

ES 2 310 256 T3

<400> 6

5 atggtgtata cactctctgg agttcgtttt cctactgttc catcagtgta caaatctaat
60

ggattcagca gtaatggtga toggaggaat gctaattgtt ctgtattctt gaaaaagcac
120

10 tctctttcac ggaagatctt ggctgaaaag tcttcttaca attccgaatt ccgaccttct
180

acaqttgcag catcggggaa agtccttggt cctggaacct agagtgatag ctctcatcc
240

15 tcaacagacc aatttgagtt cactgagaca tctccagaaa attccccagc atcaactgat
300

gtagatagtt caacaatgga acacgctagc cagattaata ctgagaacga tgacgttgag
360

20 ccgtcaagtg atcttacagg aagtgttgaa gagctggatt ttgcttcate actacaacta
420

25 caagaaggtg gtaaactgga ggagtctaaa acattaata cttctgaaga gacaattatt
480

gatgaatctg ataggatcag agagaggggc atccctccac ctggacttgg tcagaagatt
540

30 tatgaaatag accccctttt gacaaaactat cgtaacacc ttgattacag gtattcacag
600

tacaagaaac tgagggaggc aattgacaag tatgaggggt gtttgaagc cttttctcgt
660

35 ggttatgaaa aaatgggttt cactcgtagt gctacaggta tcacttacog tgagtgggct
720

40 cttggtgcc agtcagctgc cctcattgga gatttcaaca attgggacgc aaatgctgac
780

attatgactc ggaatgaatt tgggtctctg gagatttttc tgccaaataa tgtggatggt
840

45

50

55

60

65

ES 2 310 256 T3

tctcctgcaa ttctctatgg gtccagagtg aagatacgtg tggacactcc atcaggtgtt
 900
 5 aaggattcca ttcttgcttg gatcaactac tctttacagc ttctgatga aattccatat
 960
 aatggaatac attatgatcc acccgaagag gagaggtata tcttccaaca cccacggcca
 1020
 10 aagaaaccaa agtcgctgag aatatatgaa tctcatattg gaatgagtag tccggagcct
 1080
 aaaattaact catacgtgaa ttttagagat gaagttcttc ctgcataaa aaagcttggg
 1140
 15 tacaatgctc tgcaaattat ggctattcaa gagcattctt attacgctag ttttggttat
 1200
 20 catgtcacia atttttttgc accaagcagc cgttttgaa cgcccagcga ccttaagtct
 1260
 ttgattgata aagctcatga gctaggaatt gttgttctca tggacattgt tcacagccat
 1320
 25 gcacaaata atactttaga tggactgaac atgtttgact gcaccgatag ttgttacttt
 1380
 cactctggag ctctgggta tcattggatg tgggattccc gcctctttaa ctatggaaac
 1440
 30 tgggaggtac ttaggtatct tctctcaaat gcgagatggt ggttggatgc gttcaaattt
 1500
 gatggattta gatttgatgg tgtgacatca atgatgtata ttcaccacgg attatcggtg
 1560
 35 ggattcactg ggaactaoga ggaatacttt ggactcgcaa ctgatgtgga tgctgttgtg
 1620
 40 tatctgatgc tggtaacoga tcttattcat gggcttttcc cagatgcaat taccattggt
 1680
 gaagatgta gcggaatgcc gacattttgt attcccgtcc aagagggggg tgttggcttt
 1740
 45 gactatcggc tgcataatgc aattgctgat aaacggattg agttgctcaa gaaacgggat
 1800
 50 gaggattgga gagtgggtga fattgttcat aactgacaa atagaagatg gtccgaaaag
 1860

55

60

65

ES 2 310 256 T3

tgtgtttcat acgctgaaag tcatgatcaa gctctagtcg gtgataaaac tatagcattc
1920

5 tggctgatgg acaaggatat glatgathtt atggctctgg atagaccgtc aacatcatta
1980

atagatcgtg ggatagcatt gcacaagatg attaggcttg taactatggg attaggagga
2040

10 gaagggatacc taaatttcat gggaaatgaa ttcggccacc ctgagtggat tgatttcocct
2100

agggctgaac aacacctctc tgatggctca gtaatccccg gaaaccaatt ccgttatgat
2160

15 aaatgcagac ggagatttga cctgggagat gcagaatatt taagataccg tgggttgcaa
2220

20 gaatttgacc ggcctatgca gtatcttgaa gataaatatg agtttatgac ttcagaacac
2280

cagttcatat cacgaaagga tgaaggagat aggatgattg tatttgaaaa aggaaaccta
2340

25 gtttttgtct ttaattttca ctggacaaaa agctattcag actatcgcat agcctgcctg
2400

aaacctggaa aataccgggt tgccttgac tcagatgate cacittttgg tggcttcggg
2460

30 agaattgac ataatgccga atatttcacc tttgaaggat ggtatgatga tcgtcctcgt
2520

tcaattatgg tgtatgcacc ttgtaaaaca gcagtggctc atgcactagt agacaaagaa
35 2580

gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gtagcagcag tagaagaagt agtagtagaa
2640

40 gaagaatga
2649

<210> 7

45 <211> 882

<212> PRT

<213> *Solanum tuberosum*

50

55

60

65

ES 2 310 256 T3

<400> 7

5	Met	Val	Tyr	Thr	Leu	Ser	Gly	Val	Arg	Phe	Pro	Thr	Val	Pro	Ser	Val
	1				5					10					15	
10	Tyr	Lys	Ser	Asn	Gly	Phe	Ser	Ser	Asn	Gly	Asp	Arg	Arg	Asn	Ala	Asn
				20					25					30		
15	Val	Ser	Val	Phe	Leu	Lys	Lys	His	Ser	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Leu	Ala
			35					40					45			
20	Glu	Lys	Ser	Ser	Tyr	Asn	Ser	Glu	Phe	Arg	Pro	Ser	Thr	Val	Ala	Ala
		50					55					60				
25	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Gln	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser
	65					70					75					80
30	Ser	Thr	Asp	Gln	Phe	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Ser	Pro	Glu	Asn	Ser	Pro
					85					90					95	
35	Ala	Ser	Thr	Asp	Val	Asp	Ser	Ser	Thr	Met	Glu	His	Ala	Ser	Gln	Ile
				100						105				110		
40	Lys	Thr	Glu	Asn	Asp	Asp	Val	Glu	Pro	Ser	Ser	Asp	Leu	Thr	Gly	Ser
			115					120					125			
45	Val	Glu	Glu	Leu	Asp	Phe	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Gly	Gly
		130					135					140				
50	Lys	Leu	Glu	Glu	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Thr	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Ile
	145					150					155					160
55	Asp	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Arg	Glu	Arg	Gly	Ile	Pro	Pro	Pro	Gly	Leu
					165					170					175	
60	Gly	Gln	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile	Asp	Pro	Leu	Leu	Thr	Asn	Tyr	Arg	Gln
				180					185					190		
65	His	Leu	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Lys	Lys	Leu	Arg	Glu	Ala	Ile

ES 2 310 256 T3

	195	200	205
5	Asp Lys Tyr Glu Gly Gly 210	Leu Glu Ala Phe Ser 215	Arg Gly Tyr Glu Lys 220
10	Met Gly Phe Thr Arg Ser 225	Ala Thr Gly Ile Thr Tyr Arg Glu Trp Ala 230	
15	Leu Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Ile Gly Asp Phe Asn Asn Trp Asp 245		250 255
20	Ala Asn Ala Asp Ile Met Thr Arg Asn Glu Phe Gly Val Trp Glu Ile 260	265	270
25	Phe Leu Pro Asn Asn Val Asp Gly Ser Pro Ala Ile Pro His Gly Ser 275		285
30	Arg Val Lys Ile Arg Met Asp Thr Pro Ser Gly Val Lys Asp Ser Ile 290	295	300
35	Pro Ala Trp Ile Asn Tyr Ser Leu Gln Leu Pro Asp Glu Ile Pro Tyr 305	310	315 320
40	Asn Gly Ile His Tyr Asp Pro Pro Glu Glu Glu Arg Tyr Ile Phe Gln 325		330 335
45	His Pro Arg Pro Lys Lys Pro Lys Ser Leu Arg Ile Tyr Glu Ser His 340	345	350
50	Ile Gly Met Ser Ser Pro Glu Pro Lys Ile Asn Ser Tyr Val Asn Phe 355	360	365
55	Arg Asp Glu Val Leu Pro Arg Ile Lys Lys Leu Gly Tyr Asn Ala Leu 370	375	380
60	Gln Ile Met Ala Ile Gln Glu His Ser Tyr Tyr Ala Ser Phe Gly Tyr 385	390	395 400
65	His Val Thr Asn Phe Phe Ala Pro Ser Ser Arg Phe Gly Thr Pro Asp		

ES 2 310 256 T3

	405	410	415
5	Asp Leu Lys Ser 420	Leu Ile Asp Lys Ala His Glu Leu Gly 425	Ile Val Val 430
10	Leu Met Asp Ile Val His Ser 435	His Ala Ser Asn Asn Thr 440	Leu Asp Gly 445
15	Leu Asn Met Phe Asp Cys Thr 450	Asp Ser Cys Tyr Phe His Ser 455	Gly Ala 460
20	Arg Gly Tyr His Trp Met Trp 465	Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr 470	Gly Asn 475
25	Trp Glu Val Leu Arg Tyr Leu Leu Ser 485	Asn Ala Arg Trp Trp 490	Leu Asp 495
30	Ala Phe Lys Phe Asp Gly Phe Arg 500	Phe Asp Gly Val Thr Ser Met Met 505	
35	Tyr Ile His His Gly Leu Ser Val 515	Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Glu Glu 520	
40	Tyr Phe Gly Leu Ala Thr Asp Val 530	Asp Ala Val Val Tyr Leu Met Leu 535	
45	Val Asn Asp Leu Ile His Gly Leu Phe Pro 545	Asp Ala Ile Thr Ile Gly 555	
50	Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Thr Phe Cys 565	Ile Pro Val Gln Glu Gly 570	
55	Gly Val Gly Phe Asp Tyr Arg Leu His Met 580	Ala Ile Ala Asp Lys Arg 585	
60	Ile Glu Leu Leu Lys Lys Arg Asp Glu Asp 595	Trp Arg Val Gly Asp Ile 600	
65	Val His Thr Leu Thr Asn Arg Arg Trp Ser 605	Glu Lys Cys Val Ser Tyr	

ES 2 310 256 T3

	610		615		620											
5	Ala 625	Glu	Ser	His	Asp	Gln 630	Ala	Leu	Val	Gly	Asp 635	Lys	Thr	Ile	Ala	Phe 640
	Trp	Leu	Met	Asp	Lys 645	Asp	Met	Tyr	Asp	Phe 650	Met	Ala	Leu	Asp	Arg	Pro 655
10	Ser	Thr	Ser	Leu 660	Ile	Asp	Arg	Gly	Ile 665	Ala	Leu	His	Lys	Met	Ile	Arg 670
15	Leu	Val	Thr 675	Met	Gly	Leu	Gly	Gly 680	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asn 685	Phe	Met	Gly
20	Asn 690	Glu	Phe	Gly	His	Pro	Glu 695	Trp	Ile	Asp	Phe	Pro 700	Arg	Ala	Glu	Gln
25	His 705	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Val 710	Ile	Pro	Gly	Asn 715	Gln	Phe	Arg	Tyr	Asp 720
30	Lys	Cys	Arg	Arg 725	Arg	Phe	Asp	Leu	Gly	Asp 730	Ala	Glu	Tyr	Leu	Arg	Tyr 735
35	Arg	Gly	Leu	Gln 740	Glu	Phe	Asp	Arg	Pro 745	Met	Gln	Tyr	Leu	Glu 750	Asp	Lys
40	Tyr	Glu	Phe 755	Met	Thr	Ser	Glu 760	His	Gln	Phe	Ile	Ser	Arg 765	Lys	Asp	Glu
45	Gly	Asp 770	Arg	Met	Ile	Val	Phe 775	Glu	Lys	Gly	Asn 780	Leu	Val	Phe	Val	Phe
50	Asn 785	Phe	His	Trp	Thr	Lys 790	Ser	Tyr	Ser	Asp 795	Tyr	Arg	Ile	Ala	Cys	Leu 800
55	Lys	Pro	Gly	Lys 805	Tyr	Pro	Val	Ala	Leu	Asp 810	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Phe 815
60	Gly	Gly	Phe	Gly 820	Arg	Ile	Asp	His	Asn 825	Ala	Glu	Tyr	Phe	Thr	Phe	Glu 830
65	Gly	Trp	Tyr 835	Asp	Asp	Arg	Pro	Arg	Ser 840	Ile	Met	Val	Tyr	Ala	Pro	Cys 845
70	Lys	Thr 850	Ala	Val	Val	Tyr	Ala 855	Leu	Val	Asp	Lys	Glu 860	Glu	Glu	Glu	Glu
75	Glu 865	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu 870	Val	Ala	Ala	Val	Glu 875	Glu	Val	Val	Val	Glu 880
80	Glu	Glu														

65 <210> 8
 <211> 1255

ES 2 310 256 T3

<212> DNA

<213> *Solanum tuberosum*

5 <400> 8

atTTTgtatt cccgTtcaag atgggggtgt Tggctttgac tatcggtgc atatggcaat
60

Tgctgataaa Tggattgagt Tgctcaagaa acgggatgag gattggagag Tgggtgatat
120

Tgttcataca ctgacaaata gaagatggtc ggaaaagtgt gtttcatacg ctgaaagtca
180

Tgatcaagct ctagtggTg.ataaaaactat agcattctgg ctgatggaca aggatatgta
240

Tgattttatg gctttggata gaccgtcaac atcattaata gatcgtggga tagcattgca
300

caagatgatt aggcttGtaa ctatgggatt aggaggagaa gggTacctaa atttcattggg
360

aaatgaattc ggcacccctg agTggattga tttccctagg gctgaacaac acctctctga
420

Tggctcagta attcccgga accaatTcag ttatgataaa Tgcagacgga gatttgacct
480

gggagatgca gaatatttaa gataccgtgg gttgcaagaa tttgaccggg ctatgcagta
540

tcttgaagat aaatatgagt ttatgacttc agaacaccag tTcatatcac gaaaggatga
600

aggagatagg atgattgtat ttgaaaaagg aaacctagtt tttgtcttta attttcactg
660

gacaaaaagc tattcagact atcgcatagg ctgcctgaag cctggaaaat acaaggttgc
720

cttgactca gatgatccac tttttggTgg ctTcgggaga attgatcata atgccgaatg
780

ttTcaccttt gaaggatggT atgatgatcg tctcgtTca attatggTgt atgcacctag
840

tagaacagca gtggTctatg cactagtaga caaagaagaa gaagaagaag aagtagcagt
900

agtagaagaa gtagtagtag aagaagaatg aacgaactTg Tgatcgcgtt gaaagattTg
960

aacgctacat agagctTctt gacgtatctg gcaatattgc atcagtctTg gcggaattTc
1020

atgtgacaaa aggtttgcaa ttctttccac tattagtagt gcaacgatat acgcagagat
1080

gaagtgctga acaaacatat gTaaaatcga Tgaatttatg Togaatgctg ggacgggctt
1140

cagcaggttt Tgcttagtga gTtctgTaaa ttgtcatctc tttatatgta cagccaacta
1200

gaaatcaatt atgtgagacc Taaaatacaa Taaccataaa atggaaatag Tgctg
1255

65