



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 337**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 1/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98935688 .6**

86 Fecha de presentación : **17.07.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0990040**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2000**

54 Título: **Genes que controlan el metabolismo del fitato en plantas y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **22.07.1997 US 53371 P**
28.07.1997 US 53944 P
08.08.1997 US 55526 P
11.08.1997 US 55446 P
18.05.1998 US 85852 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es:
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, Inc.
800 Capital Square, 400 Locust Street
Des Moines, Iowa 50309, US

72 Inventor/es: **Martino-Catt, Susan, J.;**
Wang, Hongyu;
Beach, Larry, R.;
Bowen, Benjamin, A. y
Wang, Xun

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 296 337 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes que controlan el metabolismo del fitato en plantas y usos de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la nutrición animal. Específicamente, la presente invención se refiere a la identificación y al uso de genes que codifican diversas enzimas implicadas en el metabolismo de fitato en plantas y al uso de estos genes y de mutantes de los mismos para reducir los niveles de fitato y/o aumentar los niveles de fósforos no de fitato en los alimentos o en piensos.

Antecedentes de la invención

El papel del fósforo en la nutrición animal se conoce ampliamente. El ochenta por ciento del fósforo en el cuerpo de los animales se encuentra en el esqueleto, proporcionando estructura para el animal. El veinte por ciento del fósforo en los animales puede encontrarse en tejidos blandos, en los que es un compuesto constituyente y por lo tanto está implicado en una amplia serie de reacciones bioquímicas. Por ejemplo, se requiere fósforo para la síntesis y la actividad de ADN, ARN, fosfolípidos y algunas vitaminas B.

Aunque el fósforo es esencial para los animales sanos, también se sabe que no todo el fósforo en la alimentación está biodisponible. Las sales del ácido fítico (es decir, fitatos) son la principal forma de almacenamiento de fósforo en las plantas. Véase por ejemplo el documento "Chemistry and Application of Phytic Acid: an Overview," *Phytic Acid: Chemistry and Application*; Graf. Ed., Pilatos Press: Minneapolis, MN, págs. 1-21; (1986). Los fitatos son la principal forma de fósforo en semillas, representando típicamente del 50% al 80% del fósforo total de la semilla.

En el maíz y en las semillas de soja, por ejemplo, el fitato representa aproximadamente del 60% al 80% del fósforo total. Cuando los animales no rumiantes consumen dietas basadas en semillas, el ácido fítico consumido forma sales con varios minerales importantes para la nutrición en el tracto intestinal. La excreción de estas sales reduce la retención y la utilización, es decir la biodisponibilidad del fósforo de la dieta y el contenido de minerales. Por consiguiente, esto puede provocar deficiencias minerales en seres humanos y en animales que se alimentan de las semillas anteriores. Véase por ejemplo, McCance *al.*, *Biochem. J.*, 29: 4269 (1935); Edman, *Cereal Chem.*, 58: 21 (1981).

El fitato, una fuente importante de fósforo, no se metaboliza por animales monogástricos. De hecho, se considera que el ácido fítico es un factor anti-nutricional porque reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales mediante quelación; véase por ejemplo el documento Cheryan, "Phytic Acid Interactions in Food Systems", *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13: 297-335 (1980).

El fitato no solamente causa una reducción de la disponibilidad de los nutrientes. El fósforo unido al fitato en los desechos animales contribuye a contaminar el agua de la superficie y del suelo. Véase por ejemplo, el documento Jongbloed *al.*, *Nether. J. Ag. Sci.* 38: 567 (1990).

Debido a que el contenido de fitato de las semillas tiene un impacto sobre la dieta, la retención de fósforo y de minerales y el medio ambiente, se han propuestos varios enfoques para reducir este impacto. Los enfoques incluyen eliminar el fitato de la dieta mediante una intervención después de la cosecha y reducir el contenido de fitato de las semillas de forma genética.

Los métodos de procesamiento del alimento después de la cosecha que eliminan el ácido fítico físicamente o mediante la fermentación se describen por ejemplo por Indumadhavi *et al.*, *Int. J. Food Sci. Tech.* 27: 221 (1992). La hidrólisis del ácido fítico es un enfoque útil para aumentar el valor nutricional de muchos piensos vegetales. Las fitasas, como se describirá con más detalle a continuación, catalizan la conversión de ácido fítico en inositol y fosfato inorgánico. Los microorganismos que producen fitasas incluyen bacterias y levaduras. Véase por ejemplo los documentos Power *et al.*, *J. Bacterial.* 151: 1102-1108 (1982); Segueilha, *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 15(4): 399-404 (1993) y Nayini, *et al.*, *Lebensm. Wiss. Technol.* 17: 24-26 (1984).

El uso de fitasas, fosfohidrolasas específicas del ácido fítico, típicamente de origen microbiano como suplementos dietéticos, se describe por Nelson *et al.*, *J. Nutr.* 101: 1289 (1971). Todas las tecnologías para después de la cosecha conocidas actualmente implican procedimientos añadidos y caros para evitar los problemas asociados con el fitato.

El enfoque genético implica desarrollar germoplasma para el cultivo que pose reducciones heredables del contenido de ácido fítico de la semilla. Se ha observado una variación cuantitativa heredable en el contenido de ácido fítico de las semillas en líneas de varias especies de cultivo. Véase Raboy, en: *Inositol Metabolism in Plants*, Moore D. J. *et al.*, (eds.) Alan R. Liss, Nueva York, pág. 52-73; (1990).

Sin embargo, se ha descubierto que esta variación está alta y positivamente correlacionada con la variación en características menos deseables, por lo tanto, el cultivo de semillas con contenido de ácido fítico reducido usando métodos de cultivo tradicionales, podría dar como resultado un germoplasma con características correlacionadas no deseables. Hasta la fecha, no se ha presentado germoplasma de maíz con bajo contenido en ácido fítico comercialmente aceptable producido mediante dicho enfoque.

Para la alteración genética del fitato, se ha examinado la variabilidad natural de fitato y fósforo libre. Véase el documento Raboy, V y D. B. Dickinson *Crop Sci.* 33: 1300-1305 (1993) y Raboy, V. *et al.*, *Maydica* 35: 383-390 (1990). Aunque se observó cierta variabilidad para el ácido fítico, no se observó un cambio correspondiente en el fósforo no de fitato. Además, la variabilidad entre las variedades representaba solamente el dos por ciento de la variación observada, mientras que el noventa y ocho por ciento de la variación del fitato se atribuía a factores medioambientales.

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios de la semilla de soja y de otros cultivos han indicado que la alteración de la expresión genética del fitato a través de métodos de selección recurrente de cultivos puede tener resultados no deseables correlacionados. Véase Raboy, V., D.B. Dickinson y F.E. Bellow; *Crop Sci.* 24: 431-434 (1984); Raboy, V., F.E. Below, y D. B. Dickinson; *J. Hered.* 80: 311-315 (1989); Raboy, V., M.M. Norman, G.A. Taylor, y S. G. Pickett; *Crop Sci.* 31: 631-635; (1991).

Aunque se ha propuesto que el bloqueo de la acumulación de ácido fítico podría ser valioso para la producción de germoplasma bajo en ácido fítico sin la introducción de respuestas no deseables correlacionadas (véase Raboy, *et al.*, *Crop Sci.* 33: 1300 (1993)) el empleo de dicho enfoque de selección mutante tradicional ha mostrado en algunos casos que la homocigosis de mutantes asociados con reducciones sustanciales del ácido fítico también demostró ser letal.

El mio-inositol se produce a partir de la glucosa en tres etapas que implican las enzimas hexoquinasa (EC 2.7.1.1.), L-mio-inositol 1-fosfato sintasa (EC 5.5.1.4) y L-mio-inositol 1-fosfato fosfatasa (EC 3.1.3.25). La ruta biosintética que conduce al fitato es compleja y no se entiende completamente. Sin vincularse a ninguna teoría particular de la formación de fitato, se cree que la síntesis puede estar mediada por una serie de una o más ADP-fosfotransferasas, quinasas dependientes de ATP e isomerasas. Se han aislado varios intermedios incluyendo por ejemplo 2 y 3 monofosfatos, 1,3 y 2,6 di-fosfatos, 1,3,5 y 2,5,6 trifosfatos, 1,3,5,6 y 2,3,5,6 tetrafosfatos y 1,2,4,5,6 y 1,2,3,4,6 penta-fosfatos. Se han presentado varios ciclos fútiles de desfosforilación y refosforilación de las formas P₅ y P₆ así como un ciclo que implica G6P→mio-inositol-1-fosfato→mio-inositol; siendo la última etapa completamente reversible, lo que indica que el control del flujo metabólico a través de esta ruta puede ser importante. La invención difiere de los enfoques anteriores porque proporciona herramientas y reactivos que permiten al especialista en la técnica, mediante la aplicación de entre otros, metodologías transgénicas para influir en el flujo metabólico con respecto de la ruta del ácido fítico. Esta influencia puede ser anabólica o catabólica, por lo que se entiende que la influencia puede actuar para disminuir el flujo resultante de la biosíntesis de ácido fítico y/o aumentar la degradación (es decir, el catabolismo del ácido fítico). Esta invención también contempla una combinación de los dos enfoques.

Como se ha mencionado anteriormente, una vez formado el fitato puede desfosforilarse mediante fosfohidrolasas, particularmente 3-fitasas que se encuentran típicamente en microorganismos y 6-fitasas que son la forma dominante en plantas. Después del suceso inicial, las dos enzimas son capaces de desfosforilar con éxito el fitato a inositol libre.

Por consiguiente, también se ha informado de que pueden transformarse plantas con construcciones que comprenden un gen que codifica fitasa. Véase Pen *et al.*, publicación PCT WO 91/14782. Las semillas o tejidos vegetales transgénicos que expresan fitasas pueden usarse como suplementos dietéticos. Sin embargo, esta aplicación no se ha utilizado para reducir el ácido fítico de las *semillas*.

En base a lo anterior, existe la necesidad de mejorar el contenido nutricional de plantas, particularmente de maíz y de semilla de soja aumentando el fósforo no de fitato y reduciendo el fitato de las semillas sin efectos adversos obvios o sustanciales.

Sumario de la invención

Por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar plantas, particularmente maíz transgénico, que tienen niveles aumentados de fósforo no de fitato sin los efectos perjudiciales correspondientes.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar plantas, particularmente maíz transgénico que tienen niveles reducidos de fósforo en forma de fitato sin los efectos perjudiciales correspondientes.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar líneas vegetales transgénicas con fenotipos dominantes heredables que son útiles en programas de cultivo diseñados para producir productos comerciales con disponibilidad de fósforo aumentada y fitato reducido.

Es otro objeto de la presente invención mejorar el rendimiento animal alimentando a los animales con plantas y partes de las mismas particularmente semillas con un valor nutricional aumentado.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar semillas vegetales, particularmente semillas de maíz y el alimento resultante, que da como resultado una menor contaminación medioambiental, cuando se excretan, que las semillas usadas actualmente.

Esto y otros objetos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad de mio-inositol 1-fosfato sintasa y que comprende:

ES 2 296 337 T3

(a) una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID N° 11, o un complemento de la misma;

5 (b) un polinucleótido que tiene una secuencia de un ácido nucleico amplificada a partir de una biblioteca de ácido nucleico de *Zea mays* usando los cebadores de la SEC ID N° 12-13.

10 (c) un polinucleótido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 10, el que el % de identidad de secuencia se basa en toda la región codificante y se determina mediante el programa GAP en el que la penalización de creación de huecos = 50 y la penalización de extensión de hueco es = a 3; y

(d) una secuencia de polinucleótidos que codifica un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 11, teniendo el fragmento una delección de 1 a 10 aminoácidos;

15 o un complemento de (a) o de (c).

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan polipéptidos que se han identificado como nuevas enzimas biosintéticas de fitato.

20 Se proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de mio-inositol 1-fosfato sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 11, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se basa en toda la secuencia y se determina mediante el programa GAP donde la penalización de creación de huecos = 12 y la penalización de extensión de hueco es = 4.

25 Es otro objeto de la invención además, proporcionar polinucleótidos que codifiquen mio-inositol 1-fosfato sintasa del maíz.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención el polinucleótido comprende las regiones que codifican mio-inositol 1-fosfato sintasa.

30 En otra realización particular preferida de la presente invención los polipéptidos se aíslan a partir de *Zea mays*.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido que tiene una secuencia de un ácido nucleico amplificada a partir de una biblioteca de ácido nucleico de *Zea mays*, usando los cebadores de la SEC ID N° 12-13.

35 De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican enzimas de mio-inositol 1-fosfato sintasa, particularmente las de *Zea mays*, ARNm, ADNc, ADN genómicos y en realizaciones adicionales de este aspecto de la invención, variantes, análogos o derivados de los mismos útiles, o fragmentos de los mismos, incluyendo fragmentos de las variantes, análogos y derivados.

40 Otras realizaciones de la invención son variantes alélicas de origen natural de las moléculas de ácido nucleico en la secuencia siempre que codifiquen mio-inositol 1-fosfato sintasa.

45 Es otro objeto de la invención proporcionar un proceso para producir los polipéptidos, fragmentos de polipéptidos, variantes y derivados, fragmentos de las variantes y derivados y análogos de los anteriores.

50 En una realización preferida de este aspecto de la invención se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de mio-inositol 1-fosfato sintasa que comprenden cultivar células hospedadoras que tienen incorporado de forma expresable en su interior un polinucleótido en condiciones para la expresión de enzimas mio-inositol 1-fosfato sintasa en el hospedador y después la recuperación del polipéptido expresado.

55 De acuerdo con otro objeto de la invención se proporcionan productos, composiciones, procesos y métodos que utilizan los polipéptidos y polinucleótidos mencionados anteriormente, para fines que incluyen investigación, biológicos y de agricultura.

60 Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la siguiente descripción. Debe entenderse sin embargo, que la siguiente descripción y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solamente a modo de ilustración. Diversos cambios y modificaciones dentro el espíritu y alcance de la invención descrita serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la lectura de la siguiente descripción y a partir de la lectura de las otras partes de la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

65 Esta solicitud reivindica prioridad de los documentos 35 U.S.C 120 a U.S. Ser. N° 60/053.37 presentado el 18 de julio de 1997; 60/053.944 presentado el 28 de julio de 1997; 60/055.526 presentado el 8 de agosto de 1997, 60/055.446 y 60/085.852 presentados el 18 de mayo de 1998.

La invención se refiere en parte, a polinucleótidos y polipéptidos identificados recientemente; variantes y derivados de estos polinucleótidos polipéptidos; procesos para fabricar estos polinucleótidos y estos polipéptidos y sus variantes y derivados y antagonistas de los polipéptidos; y usos de estos polinucleótidos, polipéptidos, variantes, derivados y antagonistas. En particular, en este y en otros aspectos, la invención se refiere a polinucleótidos y polipéptidos de la ruta metabólica del fitato, más particularmente mio-inositol 1-fosfato sintasa y genes que la codifican.

Glosario

Las siguientes explicaciones ilustrativas se proporcionan para facilitar la comprensión de algunos términos usados con frecuencia en este documento, particularmente en los Ejemplos. Las explicaciones se proporcionan por motivos de comodidad y no son limitantes de la invención.

Molécula de unión a enzima biosintética de fitato, como se usa en este documento, se refiere a molécula o iones que se unen o interactúan específicamente con polipéptidos o polinucleótidos de enzimas biosintéticas de fitato de la presente invención, incluyendo por ejemplo, sustratos enzimáticos, componentes de la membrana celular y receptores convencionales. La unión entre polipéptidos de la invención y dichas moléculas, incluyendo moléculas de unión o interacción pueden ser exclusiva de polipéptidos de la invención, lo que se prefiere, o puede ser altamente específica para los polipéptidos de la invención, lo que también se prefiere, o puede ser altamente específica de un grupo de proteínas que incluye polipéptidos de la invención, lo que se prefiere, o puede ser específica de varios grupos de proteínas de los cuales al menos uno incluye un polipéptido de la invención. Las moléculas de unión también incluyen anticuerpos y reactivos obtenidos de anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de la invención.

Elemento genético, como se usa en este documento, significa de forma general un polinucleótido que comprende una región que codifica un polipéptido o una región del polinucleótido que regula la replicación, transcripción o traducción u otros procesos importantes para la expresión del polipéptido en una célula hospedadora, o un polinucleótido que comprende una región que codifica un polipéptido y una región unida de forma operativa a la misma que regula la expresión. Los elementos genéticos pueden estar incluidos en un vector que se replica como elemento episomal; esto es, una molécula físicamente independiente del genoma de la célula hospedadora. Pueden estar incluidos dentro de plásmidos. Los elementos genéticos también pueden incluirse en el genoma de una célula hospedadora; no en su estado natural, sino en su lugar, después de una manipulación tal como aislamiento, clonación e introducción en una célula hospedadora en forma de ADN purificado o en un vector, entre otros.

Célula hospedadora, como se usa en este documento, es una célula que se ha transformado o transfectado o es capaz de transformación o transfección con una secuencia de polinucleótidos exógena. La secuencia de polinucleótidos exógena significa una secuencia que no está de forma natural en la célula. Esto incluye una transformación para incorporar copias adicionales de un polinucleótido endógeno.

Identidad y similitud, como se usa en este documento, y como se conocen en la técnica, son relaciones entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos, como se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos, según se determina mediante el emparejamiento entre dos tramos de dichas secuencias. La identidad y la similitud pueden calcularse fácilmente (*Computation Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I. Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o la similitud entre dos secuencias incluyen, aunque sin limitación los que se describen en el documento Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar el mayor emparejamiento posible entre las dos secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas informáticos. Los métodos de programas informáticos típicos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, el paquete del programa GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA y TFASTA (Atschul, S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (1990)).

Para los fines de la definición de la presente invención, se usa el programa Gap. El algoritmo usado para el programa Gap es el de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443-453 [1970]). Los parámetros usados son los siguientes: para la comparación de nucleótidos la penalización de creación de huecos es = 50, la penalización de extensión de huecos = 3; para las comparaciones de aminoácidos la penalización de creación del hueco es = 12, la penalización de extensión de hueco = 4.

Aislado, como se usa en este documento, significa alterado “por la mano del hombre” de su estado natural, es decir, que si se produce de forma natural, se ha cambiado o retirado de su entorno original o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido de origen natural o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo en su estado natural no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales co-existentes de su estado natural está “aislado”, como se emplea el término en este documento. Por ejemplo, con respecto a polinucleótidos, el término aislado significa que éste se ha separado del cromosoma y de la células en los que se produce de forma natural. Como parte de o después del aislamiento, dichos polinucleótidos pueden unirse a otros polinucleótidos, tales como ADN para mutagénesis, para formar proteínas de fusión y para la propagación o expresión en un hospedador,

por ejemplo. Los polinucleótidos aislados, en solitario o unidos a otros polinucleótidos tales como vectores, pueden introducirse en células hospedadoras, en cultivos o en organismos completos. Al introducirse en células hospedadoras en cultivos o en organismos completos, dichos ADN seguirían estando aislados, como se usa el término en este documento, ya que no estarían en su forma de origen natural o en su entorno natural. Análogamente, los polinucleótidos y polipéptidos pueden producirse en una composición, tal como formulaciones de medios, soluciones para la introducción de polinucleótidos o polipéptidos, por ejemplo en células, composiciones o soluciones para reacciones químicas o enzimáticas, por ejemplo, que no son composiciones de origen natural y en su interior permanecen los polinucleótidos o polipéptidos aislados con el significado de este término como se emplea en este documento.

10 *Ligamiento*, como se usa en este documento, se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos o más polinucleótidos, que de forma más común son ADN de doble cadena. Las técnicas para el ligamiento se conocen bien en la técnica y los protocolos para el ligamiento se describen en manuales de laboratorio convencionales y en referencias tales como por ejemplo Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) y Maniatis *et al.*, pág. 146, como se
15 mencionan a continuación.

Oligonucleótido(s), como se usa en este documento, se refiere a polinucleótidos de cadena corta. A menudo el término se refiere a desoxirribonucleótidos de cadena sencilla, pero también puede referirse a ribonucleótidos de cadena sencilla o doble, híbridos de ARN:ADN y ADN de cadena doble, entre otros. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de una sonda de ADN de cadena sencilla, se sintetizan a menudo mediante métodos químicos, tales como los implementados en sintetizadores de oligonucleótidos automatizados. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden prepararse mediante diversos métodos diferentes, incluyendo técnicas mediadas por ADN recombinante *in vitro* y mediante la expresión de ADN en células y organismos. Inicialmente, los ADN sintetizados químicamente se obtienen típicamente sin un fosfato 5'. Los extremos 5' de dichos oligonucleótidos no son sustratos para la formación de enlace fosfodiéster mediante reacciones de ligamiento que emplean ADN ligasas típicamente usadas para formar moléculas de ADN recombinantes. Cuando se desea el ligamiento de dichos oligonucleótidos puede añadirse un fosfato mediante técnicas convencionales, tales como las que emplean una quinasa y ATP. El extremo 3' de un oligonucleótido sintetizado químicamente tiene generalmente un grupo hidroxilo libre y en presencia de una ligasa, tal como ADN ligasa T4, formará fácilmente un enlace fosfodiéster con un fosfato 5' de otro polinucleótido, tal como otro oligonucleótido.
30 Como se sabe bien, esta reacción puede evitarse de forma selectiva, cuando se desee, retirando los fosfatos 5' de los otros polinucleótidos antes del ligamiento.

Plásmidos, como se usa en este documento, se designan generalmente en este documento mediante una letra p precedida y/o seguida por letras en mayúscula y/o cifras, de acuerdo con las convenciones de nomenclatura convencionales que son familiares para los especialistas en la técnica. Los plásmidos de partida descritos en este documento están disponibles en el mercado, disponibles para el público o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles mediante la aplicación rutinaria de procedimientos publicados bien conocidos. Muchos plásmidos y otros vectores de clonación y de expresión que pueden usarse de acuerdo con la presente invención se conocen bien y están fácilmente disponibles para los especialistas en la técnica. Además, los especialistas en la técnica pueden construir fácilmente cualquier cantidad de plásmidos adecuada para su uso en la invención. Las propiedades, la construcción y el uso de dichos plásmidos, así como de otros vectores, en la presente invención serán muy evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la presente descripción.

Polinucleótido(s), como se usa en este documento, se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por lo tanto, por ejemplo, polinucleótidos como se usa en este documento se refiere a entre otros, ADN de cadena sencilla y de cadena doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble o de regiones de cadena sencilla, doble y triple, ARN de cadena sencilla y doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena sencilla o más típicamente, de cadena doble o de cadena triple o una mezcla de regiones de cadena sencilla y de cadena doble. Además, polinucleótido como se usa en este documento se refiere a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o ARN y ADN. Las cadenas en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solamente una región de alguna de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. Como se usa en este documento, el término polinucleótido incluye ADN o ARN como se ha descrito anteriormente que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, los ADN o ARN con estructuras modificadas para potenciar la estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" como se usa este término en este documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases no habituales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son polinucleótidos tal como se usa el término en este documento. Se entenderá, que se han realizado muchas modificaciones al ADN y al ARN para muchos fines útiles conocidos por los especialistas en la técnica. El término polinucleótido como se emplea en este documento abarca dichas formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de los polinucleótidos, así como las formas químicas del ADN y del ARN características de virus y de células, incluyendo entre otros células simples y complejas.

65 *Polipéptidos*, como se usa en este documento, incluye todos los polipéptidos que se describen a continuación. La estructura básica de los polipéptidos se conoce bien y se ha descrito en innumerables libros de texto y en otras publicaciones en la técnica. En este contexto, el término se usa en este documento para referirse a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí en una cadena lineal mediante enlaces peptídicos. Como se usa

en este documento, el término se refiere a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las que existen muchos tipos. Se entenderá que los polipéptidos contienen a menudo aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos denominados comúnmente como los 20 aminoácidos de origen natural, y que muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales pueden modificarse en un polipéptido dado, mediante procesos naturales tales como el procesamiento y otras modificaciones post-traduccionales, pero también mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Incluso las modificaciones comunes que se producen de origen natural en los polipéptidos son demasiado numerosas para enumerarlas de forma exhaustiva en este documento, pero se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en la amplia bibliografía de investigación y son bien conocidas por los especialistas en la técnica. Entre las modificaciones conocidas que pueden estar presentes en los polipéptidos de la presente invención están, por nombrar solo unas pocas, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de lípido, unión covalente de fosfatidil inositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuros, desmetilación, formación de reticulación covalente, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia, tales como arginilación y ubiquitinación. Dichas modificaciones las conocen bien los especialistas en la técnica y se han descrito con gran detalle en la bibliografía científica. Varias modificaciones particularmente comunes, por ejemplo glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación del ADP, se describen en textos más básicos tales como por ejemplo PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993). A este respecto están disponibles muchas revisiones detalladas, tales como por ejemplo las proporcionadas por Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospect, págs. 1-12 en POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Jonson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seiffer *et al.*, Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990) y Rattan *et al.*, Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992). Se entenderá, como se conoce bien y se ha indicado anteriormente, que los polipéptidos no son siempre completamente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser ramificados como el resultado de la ubiquitinación y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente como resultado de sucesos post-traduccionales, incluyendo sucesos del procesamiento natural y sucesos como consecuencia de la manipulación humana que no se producen de forma natural. Los polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados pueden sintetizarse mediante procesos naturales no de la traducción y también mediante métodos totalmente sintéticos. Las modificaciones pueden producirse en cualquier punto del polipéptido, incluyendo la estructura peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. De hecho, el bloqueo del grupo amino o carboxilo en un polipéptido o de ambos, mediante una modificación covalente es común en polipéptidos de origen natural y sintéticos y dichas modificaciones pueden estar presentes también en polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, el resto amino terminal de los polipéptidos preparados en *E. coli* o en otras células, antes del procesamiento proteolítico, será casi invariablemente N-formilmetionina. Durante la modificación post-traducciona del péptido, puede delecionarse un resto de metionina del extremo NH₂. Por consiguiente, esta invención contempla el uso de las variantes que contienen metionina y las que no contienen metionina de la proteína de la invención. Las modificaciones que se producen en un polipéptido estarán a menudo en función de su modo de preparación. Para polipéptidos preparados expresando un gen clonado en un hospedador, por ejemplo, la naturaleza y el grado de modificaciones se determinarán en gran parte por la capacidad de modificación post-traducciona de la célula hospedadora y las señales de modificación presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, como se sabe bien, la glicosilación no se produce a menudo en hospedadores bacterianos tales como por ejemplo, *E. coli*. Por consiguiente, cuando se desea glicosilación, el polipéptido debe expresarse en un hospedador glicosilante, generalmente una célula eucariota. Se aplican consideraciones similares a otras modificaciones. Se entenderá que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o en un grado variable en varios puntos de un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. En general, como se usa en este documento, el término polipéptido abarca todas estas modificaciones, particularmente aquellas que están presentes en polipéptidos sintetizados expresando un polinucleótido en una célula hospedadora.

Transformación, como se usa en este documento, es el proceso mediante el que una célula se “transforma” mediante ADN exógeno cuando dicho ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. El ADN exógeno puede estar o no integrado (unido de forma covalente) en el ADN cromosómico modificando el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse en un elemento episomal, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas superiores, una célula transformada o transfectada de forma estable es una en la que el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de modo que se hereda por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones constituidos por una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

Variante(s), como se usa en este documento, de polinucleótidos o polipéptidos, como se usa el término en este documento, son polinucleótidos o polipéptidos que difieren de un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente. Las variantes en este sentido se describen a continuación y en cualquier otro lugar de la presente descripción con gran detalle. En referencia a polinucleótidos, en general, las diferencias se limitan de modo que las secuencias de nucleótidos de referencia y la variante son estrechamente similares en general y en muchas regiones, idénticas. Como se indica a continuación, los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden ser silenciosos. Es decir, pueden no alterar los aminoácidos codificados por el polinucleótido. Cuando las alteraciones se limitan a cambios si-

lenciosos de este tipo, una variante codificará un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que la referencia. Como se indica también a continuación, los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Dichos cambios en los nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se describe a continuación. En referencia a polipéptidos en general, las diferencias se limitan de modo que las secuencias de la referencia y de la variante sean estrechamente similares en general y en muchas regiones idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación.

Germoplasma, como se usa en este documento, significa un conjunto de entidades genéticas que pueden usarse en un programa de cultivo convencional para desarrollar nuevas variedades de plantas.

Alto contenido en fósforo transgénico, como se usa en este documento, significa una entidad que como resultado de la manipulación genética recombinante, produce una semilla con una disminución heredable en el porcentaje de ácido fítico y/o un aumento en el porcentaje de fósforo no de fitato.

Ácido fítico, como se usa en este documento, significa ácido mio-inositol tetrafosfórico, ácido mio-inositol penta-fosfórico y ácido mio-inositol hexafosfórico. Como sal con cationes, el ácido fítico es "fitato".

Fósforo no de fitato, como se usa en este documento, significa el fósforo total menos el fósforo de fitato.

Animal no rumiante, significa un animal con un único estómago dividido en las regiones esofágicas, cardíaca, de fondo y del píloro. Un animal no rumiante implica además una especie de un animal sin un rumen funcional. Un rumen es una sección del sistema digestivo donde el alimento o la comida se empapa y se somete a una digestión por parte de microorganismos antes de pasar al tracto digestivo. Este fenómeno no se produce en un animal no rumiante. La expresión animal no rumiante incluye aunque sin limitación seres humanos, cerdos, aves de corral, gatos y perros.

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a nuevos polipéptidos y polinucleótidos del metabolismo del ácido fítico que lo codifican, entre otras cosas, como se describirá con gran detalle a continuación. Entre los polipéptidos particularmente útiles para la práctica de esta invención se incluyen aunque sin limitación D-mio-inositol-3-fosfato sintasa, mio-inositol 1-fosfato sintasa (denominada también INO1), fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa, inositol polifosfato-5-fosfatasa de señalización (SIP-110), mio-inositol monofosfatasa-3, mio-inositol 1,3,4 trifosfato 5/6 quinasa, 1D-mio-inositol trisfosfato 3-quinasa B, mio-inositol monofosfatasa-1, inositol polifosfato 5-fosfatasa, 1D-mio-inositol trifosfato 3-quinasa, fosfatidilinositol 3-quinasa, fosfatidilinositol 4-quinasa, fosfatidilinositol sintasa, proteína de transferencia de fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 5-fosfatasa, transportador de mio-inositol, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol y fitasa del maíz.

Los ácidos nucleótidos y fragmentos de los mismos que codifican las enzimas mencionadas anteriormente son útiles para generar plantas transgénicas deficientes en enzima. Por ejemplo, puede incorporarse un único gen o fragmento génico (o combinaciones de varios genes) en una casete de expresión apropiada (usando por ejemplo el promotor de globulina I para la expresión preferida en embriones del promotor nativo asociada con el gen que codifica la enzima) y transformarse en maíz junto con un marcador seleccionable apropiado (tal como el herbicida PAT) de modo que silencie la expresión de los genes endógenos.

La bibliografía relevante que describe la aplicación de silenciación de genes dependiente de la homología incluye: Jorgensen, *Trends Biotechnol* 8 (12): 340-344 (1990); Clavel, *proa. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 3490-3496 (1994); Finnegan *et al.*, *Bio/Technology* 12: 883-888 (1994); Neuhuber *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 244: 230-241 (1994). Como alternativa, otro enfoque para la silenciación de genes puede ser el uso de tecnología antisentido (Rothstein *et al.*, en *Osf. Surv. Plant Mol. Cell. Biol.* 6: 221-246 (1989).

En particular la invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos de nuevos genes de enzimas biosintéticas de fitato. La invención se refiere especialmente a enzimas biosintéticas de fitato de *Zea mays* que tienen las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que se muestran a continuación respectivamente.

Polinucleótidos

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican las enzimas biosintéticas de fitato que tienen la secuencia de aminoácidos deducida a continuación.

Usando la información que se proporciona en este documento, tal como las secuencias de polinucleótidos que se muestran a continuación, puede obtenerse un polinucleótido de la presente invención que codifica polipéptidos de la enzima biosintética de fitato usando procedimientos de clonación y selección convencionales. Para obtener el polinucleótido que codifica la proteína usando las secuencias de ADN que se proporcionan a continuación, pueden sintetizarse cebadores de oligonucleótidos que sean complementarios con la secuencia de polinucleótidos conocida. Estos cebadores pueden usarse después en PCR para amplificar el polinucleótido a partir de una plantilla obtenida de ARNm o de ADN genómico aislado del material vegetal. Los productos amplificados resultantes pueden clonar-

se después en vectores de clonación disponibles en el mercado, tales como la serie TA de vectores de InVitrogen. Secuenciando los clones individuales identificados de este modo con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia original, es posible a continuación prolongar la secuencia en ambas direcciones para determinar la secuencia génica completa. Dicha secuenciación se realiza usando ADN de doble cadena desnaturalizado preparado a partir de un clon del plásmido. Las técnicas adecuadas se describen por Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. en MOLECULAR CLONING, A Laboratory Manual (2ª edición 1989 Cold Spring Harbor Laboratory. Véase, Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70) que ilustra la invención, los polinucleótidos que se muestran a continuación se ensamblan a partir de una biblioteca de ADNc obtenida por ejemplo, a partir de semillas de maíz en germinación.

La mio-inositol 1-fosfato sintasa de la presente invención se relaciona de forma estructural con otras proteínas de la familia de la mio-inositol fosfato sintasa, como se muestra comparando la presente secuencia que codifica mio-inositol 1-fosfato sintasa con secuencias presentadas en la bibliografía. Una secuencia de ADN preferida se muestra a continuación. Ésta contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de aproximadamente 510 restos de aminoácidos con un peso molecular deducido de aproximadamente 59,7 (calculado como el número de restos de aminoácidos X 117) kDa. La proteína muestra una mayor homología con la mio-inositol 1-fosfato sintasa. La presente mio-inositol 1-fosfato sintasa tiene aproximadamente el 88% de identidad y aproximadamente el 92% de similitud con la secuencia de aminoácidos de la mio-inositol 1-fosfato sintasa de *Mesembryanthemum crystallinum* y el 78,7% de identidad a nivel de ácido nucleico (estos porcentajes se basan solamente en la comparación de la secuencia codificante de longitud completa es decir, desde ATG hasta el codón de terminación).

La mio-inositol monofosfatasa-3 se relaciona estructuralmente con otras proteínas de la familia de mio-inositol monofosfatasa-3, como se demuestra comparando la presente secuencia que codifica mio-inositol monofosfatasa-3 con la de la secuencia presentada en la bibliografía. Una secuencia de ADN se presenta a continuación. Ésta contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de aproximadamente 267 restos de aminoácidos con un peso molecular deducido de aproximadamente 31,2 kDa (calculado como el número de restos de aminoácidos X 117). A continuación se presentan nuevas inositol monofosfatasa-3 identificadas mediante homología entre la secuencia de aminoácido que se muestra a continuación y secuencias de aminoácidos conocidas de otras proteínas tales como mio-inositol monofosfatasa-3 de *Lycopersicon esculentum* con el 76,1% de identidad/el 81,1% de similitud a nivel de aminoácidos y el 67,9% de identidad a nivel de ácido nucleico (estos porcentajes se basan solamente en la comparación de la secuencia codificante de longitud completa, de ATG hasta el codón de terminación).

La mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa se relaciona estructuralmente con otras proteínas de la familia de mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa, como se muestra comparando la secuencia que codifica la presente inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa con la de la secuencia que se presenta en la bibliografía. Una secuencia de ADN se presenta a continuación. Ésta contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de aproximadamente 353 restos de aminoácidos con un peso molecular deducido de aproximadamente 41,3 kDa (calculado como el número de aminoácidos X 117). La proteína muestra una mayor homología con la mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa de *Homo sapiens*. La mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa a continuación tiene aproximadamente el 34% de identidad y aproximadamente el 43,4% de similitud con la secuencia de aminoácidos de mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa de *Homo sapiens* (los porcentajes descritos a continuación se basan solamente en la comparación de la secuencia codificante de longitud completa es decir, de ATG hasta el codón de terminación).

A continuación se presenta una secuencia de fosfatidilinositol 3-quinasa. Esta contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de aproximadamente 803 restos de aminoácidos con un peso molecular deducido de aproximadamente 94,1 kDa (calculado como el número de restos de aminoácidos X 117). La proteína muestra una mayor homología con fosfatidilinositol 3-quinasa de *Glycine max*. La homología entre las secuencias de aminoácidos que se muestran en las siguientes secuencias y las secuencias de aminoácidos conocidas de otras proteínas tales como fosfatidilinositol 3-quinasa de *Glycine max* con el 78% de identidad/el 84% de similitud a nivel de aminoácidos y el 73% de identidad en el nivel de ácido nucleico (estos porcentajes se basan solamente en la comparación de la secuencia codificante de longitud completa es decir, de ATG hasta el codón de terminación) en base al programa Gap que se define a continuación.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm o en forma de ADN, incluyendo por ejemplo ADNc y ADN genómico obtenido clonando o producido mediante técnicas de síntesis química o mediante una combinación de las mismas. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla. El ADN de cadena sencilla puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena sentido o puede ser la cadena no codificante, también conocida como la cadena antisentido.

La secuencia codificante que codifica al polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante de los polinucleótidos que se muestran a continuación. También puede ser un polinucleótido con una secuencia diferente, que como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, codifica los polipéptidos que se muestran a continuación. Como se describe más en detalle a continuación, estas secuencias codificantes alternativas son una fuente importante de secuencias para la optimización de codón.

Los polinucleótidos de la presente invención que codifican los polipéptidos que se presentan a continuación pueden incluir, aunque sin limitación, las secuencias codificantes del polipéptido maduro, en sí mismo; la secuencia codificante del polipéptido maduro y las secuencias codificantes adicionales, tales como las que codifican una secuencia líder o

secretora, tales como una secuencia de proteínas pre- o pro- o prepro-; la secuencia codificante del polipéptido maduro, con o sin las secuencias codificantes adicionales mencionadas anteriormente, junto con secuencias no codificantes adicionales, incluyendo por ejemplo aunque sin limitación secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas y no traducidas que juegan un papel en la transcripción (incluyendo por ejemplo señales de terminación), de unión al ribosoma, elementos de estabilidad de ARNm y la secuencia codificante adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales.

El ADN también puede comprender regiones promotoras que funcionan para dirigir la transcripción del ARNm que codifica enzimas biosintéticas de fitato de esta invención. Dichos promotores pueden ser independientemente útiles para dirigir la transcripción de genes heterólogos en sistemas de expresión recombinantes. Heteróloga se define como una secuencia que no es de origen natural junto con la secuencia promotora. Aunque la secuencia de nucleótidos es heteróloga a la secuencia promotora, puede ser homóloga, o nativa o heteróloga o extraña al hospedador vegetal.

Además, el polipéptido puede fusionarse a una secuencia marcadora, tal como un péptido, que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y la serie pET de vectores (Novagen) entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en el documento Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina posibilita la purificación conveniente de la proteína de fusión. La marca HA también puede usarse para crear proteínas de fusión y corresponde a un epítipo obtenido de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe, que se ha descrito por Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), por ejemplo.

De acuerdo con lo anterior, la expresión “polinucleótido que codifica a un polipéptido” como se usa en este documento abarca polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica a un polipéptido de la presente invención, particularmente vegetal y más particularmente enzimas biosintéticas de fitato de *Zea mays* que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra a continuación. La expresión abarca polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, interrumpidas por fagos integrados o secuencias de inserción o para editar) junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

La presente invención también se refiere a variantes de los presentes polinucleótidos que codifican fragmentos, análogos y derivados de los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos deducida a continuación. Una variante del polinucleótido puede ser una variante de origen natural tal como una variante alélica de origen natural o puede ser una variante de la que no se conoce su origen natural. Dichas variantes de origen no natural del polinucleótido pueden prepararse mediante técnicas de mutagénesis, incluyendo las que se aplican a polinucleótidos células u organismos.

Entre las variantes a este respecto están las variantes que difieren de los polinucleótidos mencionados anteriormente por sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden alterarse en regiones codificantes no codificantes o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas.

Entre las realizaciones particularmente preferidas de la invención a este respecto están polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran a continuación; variantes, análogos, derivados y fragmentos de los mismos.

También preferidos particularmente a este respecto son los polinucleótidos que codifican variantes, análogos, derivados y fragmentos de enzimas biosintéticas de fitato y variantes, análogos y derivados de los fragmentos, que tienen las secuencias de aminoácidos a continuación en las que varios, unos pocos, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1 o ningún resto de aminoácidos se sustituyen, delecionan o añaden en cualquier combinación. Se prefieren especialmente entre éstas las sustituciones adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y las actividades de las enzimas biosintéticas de fitato. También se prefieren especialmente a este respecto las sustituciones conservativas. Los más preferidos son los polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos a continuación sin sustituciones.

Otras realizaciones preferidas de la invención son polinucleótidos que son al menos el 90% idénticos a un polinucleótido que codifica mio-inositol 1-fosfato sintasa, polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra a continuación y polinucleótidos que son complementarios con dichos polinucleótidos. Entre estos polinucleótidos particularmente preferidos, se prefieren especialmente los que tienen al menos el 95%, el 98% o al menos el 99%.

Además, son realizaciones particularmente preferidas a este respecto polinucleótidos que codifican polipéptidos que conservan sustancialmente la misma o incluso muestran una reducción en la función o en la actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por el polinucleótido que se muestra a continuación.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que hibridan con las secuencias descritas anteriormente en este documento. A este respecto, la presente invención se refiere especialmente a polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos descritos anteriormente en este documento. Como se usa en este documento, la expresión “condiciones rigurosas” significa que la hibridación solamente se producirá si existe al menos el 95% y preferiblemente al menos el 97% de identidad entre las secuencias.

Las expresiones “condiciones rigurosas” o “condiciones de hibridación rigurosas” incluyen la referencia a condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana, a un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos de 2 veces el fondo). Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Mediante el control de la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o de lavado, pueden identificarse secuencias diana que son el 100% complementarias con la sonda (sondado homólogo). Como alternativa, pueden ajustarse las condiciones de rigurosidad para permitir varios emparejamientos erróneos en secuencias, de modo que se detecten grados de similitud más bajos (sondado heterólogo). Generalmente, una sonda tiene menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal sea menos de aproximadamente 1,5 M de ión Na, típicamente entre aproximadamente 0,01 y 1,0 M de iones Na (o de otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura será al menos de 30°C para las sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Las condiciones de baja rigurosidad ejemplares incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS al 1% (dodecil sulfato sódico) a 37°C, y un lavado en 1X ó 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 3 M) de 50 a 55°C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen hibridación en formamida del 40 al 45%, en NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,5X o 1X SSC de 55 a 60°C. Las condiciones de rigurosidad alta ejemplares incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 0,1 X SSC de 60 a 65°C.

La especificidad está típicamente en función de los lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl, *Anal. Biochem.*, 138: 267-284 (1984); $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de CG}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/l$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, el % de CG es el porcentaje de nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y l es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente emparejada. T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de emparejamiento erróneo; por lo tanto, T_m , y las condiciones de hibridación y/o lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con $\geq 90\%$ de identidad, la T_m puede disminuirse 10°C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean 5°C más altas que el punto de desnaturalización térmica (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo las condiciones muy rigurosas pueden utilizar una hibridación y un lavado a 1, 2, 3, ó 4°C menos que el punto de desnaturalización térmica (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 ó 10°C menos que el punto de desnaturalización térmica (T_m); las condiciones poco rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 ó 20°C menos que el punto de desnaturalización térmica (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T_m deseada los especialistas en la técnica entenderán que se describen de forma implícita las modificaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de emparejamiento erróneo da como resultado una T_m de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida) se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que pueda usarse una temperatura superior. Una guía exhaustiva de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en el documento Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, Nueva York (1993); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel, *et al.*, Eds. Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1995).

Como se describe adicionalmente en este documento con respecto a ensayos de polinucleótidos de la invención, por ejemplo, polinucleótidos de la invención como se ha descrito anteriormente, pueden usarse como una sonda de hibridación para ARN, ADNc y ADN genómico para aislar ADNc de longitud completa y clones genómicos que codifican enzimas biosintéticas de fitato y para aislar ADNc y clones genómicos de otros genes que tengan una alta similitud de secuencia con los genes. Dichas sondas comprenderán generalmente al menos 15 bases. Preferiblemente, dichas sondas tendrán al menos 30 bases pueden tener al menos 50 bases. Las sondas particularmente preferidas tendrán al menos 30 bases y tendrán 50 bases o menos.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención pueden emplearse como reactivos y materiales para investigación para descubrir plantas de maíz transgénico con alto contenido en fósforo. Los polinucleótidos de la invención que son oligonucleótidos, obtenidos de las secuencias a continuación pueden usarse como cebadores de PCR en los procesos descritos en este documento para determinar si los genes identificados en este documento se transcriben o no en tejido que acumula ácido fítico.

Los polinucleótidos pueden codificar un polipéptido que es la proteína madura más aminoácidos amino o carboxilo terminales adicionales, o aminoácidos del interior del polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Dichas secuencias pueden jugar un papel en el procesamiento de una proteína a partir de un precursor hasta una forma madura, pueden permitir el transporte de proteínas, pueden alargar o acortar la vida media de la proteína o pueden facilitar la manipulación de una proteína para ensayo o producción, entre otras cosas. Como es el caso general *in vivo*, los aminoácidos adicionales pueden procesarse de forma independiente de la proteína madura mediante enzimas celulares.

Una proteína precursora, que tiene la forma madura del polipéptido fusionada a una o más prosequencias puede ser una forma inactiva del polipéptido. Cuando las prosequencias se retiran, dichos precursores inactivos generalmente se activan. Algunas o todas las prosequencias pueden retirarse antes de la activación. Generalmente, dichos precursores se denominan proproteínas.

5 En resumen, un polinucleótido de la presente invención puede codificar una proteína madura, una proteína madura más una secuencia líder (que puede denominarse preproteína), un precursor de una proteína madura que tiene una o más prosequencias que no son la secuencia líder de una preproteína, o una preproteína que un precursor de una proproteína, que tiene una secuencia líder y una o más prosequencias, que se eliminan generalmente durante etapas de procesamiento que producen formas activas y maduras del polipéptido.

Polipéptidos

15 La presente invención se refiere además a polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos deducidas a continuación.

La invención también se refiere a fragmentos, análogos y derivados de estos polipéptidos. Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo” cuando se refieren a los polipéptidos, significan un polipéptido que conserva esencialmente la misma función o actividad biológica que dicho polipéptido. Se prefieren los fragmentos, derivados y análogos que conservan al menos el 90% de la actividad de las enzimas biosintéticas de fitato nativas. Se prefieren los fragmentos, derivados y análogos que conservan al menos el 95% de la actividad de los polipéptidos nativos. Por lo tanto, un análogo incluye una proproteína que puede activarse mediante escisión de la porción de la proproteína para producir un polipéptido maduro activo.

25 El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético. En algunas realizaciones preferidas es un polipéptido recombinante.

El fragmento, derivado o análogo del polipéptido a continuación puede ser (i) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos se sustituyen con un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un resto de aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácidos sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente o (iii) uno en el que el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan con el polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Se pretende que dichos fragmentos derivados y análogos, los obtengan los especialistas en la técnica, a partir de las enseñanzas de este documento.

40 Entre las realizaciones particularmente preferidas de la invención, a este respecto, están polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de enzimas biosintéticas de fitato que se muestran a continuación, variantes, análogos, y derivados y fragmentos de las mismas y variantes análogos y derivados de los fragmentos.

Entre las variantes preferidas están las que varían de una referencia en sustituciones de aminoácidos conservativas. Dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido con otro aminoácido de similares características. Vistos típicamente como sustituciones conservativas están los reemplazos, uno o por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los restos hidroxilo, Ser y Thr, intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los restos de amida, Asn y Gln, intercambios de los restos básicos Lys y Arg y reemplazos entre los restos aromáticos Phe, Tyr.

50 Además se prefieren particularmente a este respecto variantes, análogos, derivados y fragmentos y variantes análogos y derivados de los fragmentos que tienen la secuencia de aminoácidos a continuación, en la que varios, unos pocos, de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1 o ningún resto de aminoácidos se sustituye, deleciona o añade en cualquier combinación. Se prefieren especialmente entre éstas las sustituciones, adiciones y delecciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades de las enzimas biosintéticas de fitato. También se prefieren específicamente a este respecto, las sustituciones conservativas. Las más preferidas son los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos a continuación sin sustituciones.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente se purifican hasta la homogeneidad.

60 Los polipéptidos de la presente invención incluyen el polipéptido de mio-inositol 1-fosfato sintasa (en particular el polipéptido maduro) así como polipéptidos que tienen más del 95% de identidad (98% de similitud) con el polipéptido, como se ha descrito anteriormente en Needleman y Wunsch, y más preferiblemente al menos el 98% de identidad y también incluyen porciones de dichos polipéptidos con dicha porción del polipéptido conteniendo generalmente al menos 30 aminoácidos y más preferiblemente al menos 50 aminoácidos.

Vectores, Células Hospedadoras, Expresión

La presente invención también se refiere a vectores que comprenden los polinucleótidos de la presente invención, a células hospedadoras que incorporan los vectores de la invención y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

Las células hospedadoras pueden manipularse genéticamente para incorporar los polinucleótidos y expresar los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden introducirse en células hospedadoras usando técnicas bien conocidas de infección, transducción, transfección, transvección y transformación. Los polinucleótidos pueden introducirse en solitario o junto con otros polinucleótidos. Dichos otros polinucleótidos pueden introducirse de forma independiente, co-introducirse o introducirse conjuntamente con los polinucleótidos de la invención.

Por lo tanto, por ejemplo, los polinucleótidos de la invención pueden transfectarse en células hospedadoras con otro polinucleótido diferente que codifica un marcador seleccionable, usando técnicas convencionales para co-transfección y selección por ejemplo en células vegetales. En este caso los polinucleótidos serán generalmente incorporados de forma estable en el genoma de la célula hospedadora.

Como alternativa, los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedador. La construcción de vector también puede introducirse en células hospedadoras mediante las técnicas mencionadas anteriormente. Generalmente, un vector de plásmidos se introduce como ADN en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio o en un complejo con un lípido cargado. También puede usarse electroporación para introducir polinucleótidos en un hospedador. Si el vector es un virus, puede envasarse *in vitro* o introducirse en una célula de envasado y el virus envasado puede transducirse a las células. Una amplia diversidad de técnicas adecuadas para preparar polinucleótidos y para introducir polinucleótidos en las células de acuerdo con este aspecto de la invención se conocen bien y son rutinarias para los especialistas en la técnica. Dichas técnicas se revisan ampliamente en el documento Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, que es ilustrativo de los muchos manuales de laboratorio que detallan estas técnicas.

Vectores

De acuerdo con este aspecto de la invención el vector puede ser, por ejemplo, un vector de plásmido, un vector de fago de cadena sencilla o doble, un vector viral de ARN o ADN de cadena sencilla o doble. Dichos vectores pueden introducirse en las células como polinucleótidos, preferiblemente ADN, mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en las células. Los vectores, en el caso de vectores de fago y virales también pueden introducirse y preferiblemente se introducen en las células como virus envueltos o dentro de una cápsida mediante técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. En el último caso, la propagación viral ocurrirá generalmente solamente en células hospedadoras complementarias.

En algunos aspectos, entre los vectores se prefieren aquellos para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención. Generalmente, dichos vectores comprenden regiones de control que actúan en posición *cis* eficaces para la expresión en un hospedador unido de forma operativa al polinucleótido a expresar. También se proporcionan por el hospedador factores que actúan en posición *trans* apropiados, suministrados por un vector complementario o suministrado por el propio vector después de la introducción en el hospedador.

En algunas realizaciones preferidas a este respecto, los vectores posibilitan la expresión preferida. Dicha expresión preferida puede ser expresión inducible o expresión predominante en ciertos tipos de células o tanto inducible como preferida en algunas células. Los vectores particularmente preferidos entre los vectores inducibles son vectores que pueden inducirse para la expresión por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como temperatura y aditivos de los nutrientes. Diversos vectores adecuados para este aspecto de la invención, incluyendo vectores de expresión constitutiva e inducible para su uso en hospedadores procariotas y eucariotas, se conocen bien y se emplean de forma rutinaria por los especialistas en la técnica. Dichos vectores incluyen entre otros, vectores cromosómicos, episomales y obtenidos de virus, por ejemplo vectores obtenidos de plásmidos bacterianos, de bacteriofagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, virus papota, tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus y vectores obtenidos de combinaciones de los mismos, tales como los obtenidos de plásmidos y elementos genéticos del bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos y binarios usados para transformaciones mediadas por *Agrobacterium*. Todos estos pueden usarse para la expresión de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Generalmente, cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos para expresar un polipéptido en un hospedador puede usarse para la expresión a este respecto.

Los siguientes vectores, que están disponibles en el mercado, se proporcionan a modo de ejemplo. Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias están pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, disponibles de Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Los vectores vegetales binarios útiles incluyen BIN19 y sus derivados disponibles de Clontech. Estos vectores se

presentan solamente a modo de ilustración de los muchos vectores disponibles en el mercado y bien conocidos que están disponibles para los especialistas en la técnica para su uso de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Se entenderá que puede usarse en este aspecto de la invención cualquier otro plásmido o vector adecuado para, por ejemplo, introducción, mantenimiento, propagación o expresión de un polinucleótido o polipéptido de la invención en un hospedador.

En general las construcciones de expresión contendrán sitios para el inicio y para la terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirá un AUG de inicio de la traducción al comienzo y un codón de terminación situado apropiadamente al final del polipéptido a traducir.

Además, las construcciones pueden contener regiones de control que regulan así como suscitan la expresión. Generalmente, de acuerdo con muchos procedimientos realizados comúnmente, dichas regiones funcionarán controlando la transcripción, tales como factores de transcripción, sitios de unión a un represor y de terminación, entre otros. Para la secreción de la proteína traducida al lumen del retículo endoplásmico, al espacio periplásmico o al entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser heterólogas.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación, un promotor obtenido de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo y un marcador seleccionable para permitir el aislamiento de células que contienen el vector después de la exposición al vector.

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención mediante eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en posición cis, normalmente entre 10 y 300 pb que actúa para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula hospedadora dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que sitúa en el extremo final del origen de replicación entre los pb 100 y 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, cadena abajo del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. Los potenciadores adicionales útiles en la invención para aumentar la transcripción del segmento de ADN introducido, incluyen entre otros, potenciadores virales tales como los que están dentro del promotor 35S, como se muestra por Odell *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 10: 263-72 (1988), y un potenciador de un gen de opines de Fromm *et al.*, *Plant Cell* 1: 977 (1989).

Entre los promotores eucariotas conocidos adecuados a este respecto están el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("RSV"), promotores de metalotioneina, tales como el promotor de metalotioneina-I de ratón y diversos promotores vegetales, tales como globulina-1. Cuando están disponibles, pueden usarse los promotores nativos de los genes de las enzimas biosintéticas de fitato.

Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia de ADN en el vector de expresión se une de forma operativa a secuencia(s) de control de la expresión apropiada(s), incluyendo, por ejemplo un promotor para dirigir la transcripción del ARNm. Ejemplos representativos de promotores procariotas incluyen el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli* por nombrar sólo unos pocos de los promotores bien conocidos.

Con respecto a las plantas, los ejemplos de promotores específicos de semillas incluyen promotores de proteínas de almacenamiento en la semilla que expresan estas proteínas en semillas de manera altamente regulada (Thompson, *et al.*, *BioEssays*; 10, 108; (1989)), tales como plantas dicotiledóneas, un promotor de β -faseolina del frijol, un promotor napin, un promotor de β -conglicina y un promotor de lectina de soja. Para plantas monocotiledóneas, los promotores útiles en la práctica de la invención incluyen, aunque sin limitación un promotor de zeína de 15 kD de maíz, un promotor de zeína de 22 kD, un promotor de γ -zeína, un promotor ceroso, un promotor shrunken 1, un promotor de globulina 1, y un promotor shrunken 2. Sin embargo, los especialistas en la técnica conocen otros promotores útiles en la práctica de la invención.

Otros ejemplos de promotores adecuados son el promotor de la subunidad pequeña de ribulosa 1,5-bis-fosfato carboxilasa, promotores de plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como los promotores de nopalina sintasa y octopina sintasa y promotores virales tales como los promotores 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el promotor de 35S del virus del mosaico de la escrofularia.

Se entenderá que muchos promotores no mencionados son adecuados para su uso en este aspecto de la invención y se conocen y pueden emplearse fácilmente por los especialistas en la técnica de la forma ilustrada mediante la descripción y los ejemplos de este documento. Por ejemplo, esta invención contempla el uso de promotores de enzimas biosintéticas de fitato nativos para impulsar la expresión de la enzima en un entorno recombinante.

Los vectores para la propagación y expresión incluirán generalmente marcadores seleccionables. Dichos marcadores también pueden ser adecuados para la amplificación o los vectores pueden contener marcadores adicionales para este fin. A este respecto, los vectores de expresión contienen preferiblemente uno o más genes de marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células hospedadoras transformadas. Los marcadores preferidos incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa o a neomicina para el cultivo de células eucariotas

y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otros procariontes. Los genes de resistencia a kanamicina y herbicidas (PAT y BAR) son generalmente útiles en sistemas vegetales.

5 Los genes de marcadores seleccionables, cercanos físicamente al segmento de ADN introducido, se usan para permitir recuperar las células transformadas mediante selección genética positiva o exploración. Los genes de marcadores seleccionables también permiten el mantenimiento de una presión selectiva sobre una población de plantas transgénicas, para asegurar que el segmento de ADN introducido y sus promotores y potenciadores que lo controlan, se conservan en la planta transgénica.

10 Muchos de los genes de marcador seleccionable positivos usados comúnmente para la transformación de plantas se han aislado a partir de bacterias y codifican enzimas que detoxifican metabólicamente un agente químico selectivo que puede ser un antibiótico o un herbicida. Otros genes de marcador seleccionable positivos codifican una diana alterada que es insensible al inhibidor.

15 Un gen de marcador de selección preferido para la transformación en plantas es el gen BAR o PAT, que se usa con el agente de selección bialaphos. Spencer *et al.*, T. Thero. *Appl'd Genetics* 79, 625-631, (1990). Otro gen de marcador de selección útil es el gen de neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), aislado a partir de Tn5, que otorga resistencia a kanamicina cuando se coloca bajo el control de las señales reguladoras vegetales. Fraley *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 80: 4803 (1983). El gen de higromicina fosfotransferasa, que otorga resistencia al antibiótico higromicina, es otro ejemplo de un marcador seleccionable útil. Vanden Elzen *et al.*, *Plant. Mol. Biol.* 5: 299 (1985). Los genes de marcadores seleccionables positivos adicionales de origen bacteriano que otorgan resistencia a antibióticos incluyen gentamicina acetil transferasa, estreptomycin fosfotransferasa, aminoglicósido-3'-adenil transferasa y el determinante de resistencia a bleomicina. Hayford *et al.*, *Plant Physiol.* 86: 1216 (1988); Jones *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210: 86 (1987); Svab *et al.*, *Plant. Mol. Biol.* 14: 197 (1990); Hille *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 7: 171 (1986).

25 Otros genes de marcador seleccionable positivos para la transformación de plantas no son de origen bacteriano. Estos genes incluyen la dihidrofolato reductasa de ratón, 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa vegetal y acetolactato sintasa vegetal. Eichholtz *et al.*, *Somatic Cell Mol. Genet.* 13: 67 (1987); Shah *et al.*, *Science* 233: 478 (1986); Charest *et al.*, *Plant Cell Rep.* 8: 643 (1990).

30 Otra clase de genes marcadores útiles para la transformación de plantas con la secuencia de ADN requiere la selección de células vegetales presuntamente transformadas en lugar de la selección genética directa de células transformadas para la resistencia a una sustancia tóxica tal como un antibiótico. Estos genes son particularmente útiles para cuantificar o visualizar el patrón espacial de expresión de la secuencia de ADN en tejidos específicos y se denominan frecuentemente genes informadores ya que pueden fusionarse a un gen o a una secuencia reguladora del gen para la investigación de la expresión génica. Los genes usados comúnmente para seleccionar células presuntamente transformadas incluyen β -glucuronidasa (GUS), β -galactosidasa, luciferasa, y cloramfenicol acetiltransferasa. Jefferson, *Plant Mol Biol. Rep.* 5: 387 (1987), Teeri *et al.*, *EMBO J.* 8: 343 (1989); Koncz *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 84: 131 (1987); De Block *et al.*, *EMBO J.* 3: 1681 (1984). Otro enfoque para la identificación de sucesos de transformación relativamente extraños es el uso de un gen que codifica un regulador constitutivo dominante de la ruta de pigmentación de antocianina de *Zea mays* (Ludwig *et al.*, *Science* 247: 449 (1990)).

45 La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector mediante cualquiera de diversas técnicas bien conocidas y rutinarias. En general, una secuencia de ADN para la expresión se une a un vector de expresión escindiendo la secuencia de ADN y el vector de expresión con una o más endonucleasas de restricción y después uniéndolos conjuntamente los fragmentos de restricción usando ligasa de ADN de T4. Las secuencias pueden insertarse en orientación directa o inversa. Los procedimientos para restricción y ligamiento que pueden usarse con este fin se conocen bien y son rutinarios para los especialistas en la técnica. Los procedimientos adecuados a este respecto, y para construir vectores de expresión usando técnicas alternativas, que también se conocen bien y son rutinarios para los especialistas en la técnica, se muestran con gran detalle en el documento Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

55 Los polinucleótidos de la invención, que codifican la secuencia estructural heteróloga de un polipéptido de la invención se insertarán generalmente en el vector usando técnicas convencionales de modo que este se una de forma operativa a un promotor de expresión. El polinucleótido se situará de modo que el sitio de inicio de la transcripción se coloque apropiadamente en posición 5' con respecto a un sitio de unión al ribosoma. El sitio de unión al ribosoma estará en posición 5' con respecto al AUG que inicia la traducción del polipéptido a expresar. Generalmente no habrá otros marcos de lectura abiertos que comiencen con un codón de inicio, normalmente AUG, y estén entre el sitio de unión al ribosoma y el codón de inicio. Además, generalmente, habrá un codón de terminación de la traducción al final del polipéptido y será una señal de poliadenilación en construcciones para su uso en hospedadores eucariotas. También puede incluirse en la construcción de polinucleótidos una señal de terminación de la transcripción dispuesta apropiadamente en el extremo 3' de la región transcrita.

65 El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se describe también en este documento, así como un promotor apropiado, y otras secuencias de control apropiadas, puede introducirse en un hospedador apropiado usando diversas técnicas bien conocidas adecuadas para la expresión en su interior de un polipéptido deseado. La presente invención también se refiere a células hospedadoras que contienen las construcciones analizadas descritas anteriormente. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero o

vegetal o una célula de eucariota inferior, tal como una célula de levadura o la célula hospedadora puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana.

La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede realizarse mediante transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, transfección con raspador, introducción balística, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (1986) y Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).

Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como estreptococos, estafilococos, *E. coli*, streptomyces y células de *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como células CHO, COS y células de melanoma Bowes y células vegetales. Los hospedadores para una gran diversidad de construcciones de expresión se conocen bien, y los especialistas en la técnica serán capaces gracias a la presente descripción de seleccionar fácilmente un hospedador para expresar un polipéptido de acuerdo con este aspecto de la presente invención.

La célula hospedadora manipulada puede cultivarse en medios nutrientes convencionales, que pueden modificarse según sea apropiado para, entre otros, activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, usadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión serán generalmente adecuadas para la expresión de polipéptidos de la presente invención como será evidente para los especialistas en la técnica.

Pueden usarse las construcciones en células hospedadoras de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse de forma sintética mediante sintetizadores de péptidos convencionales.

Las proteínas maduras pueden expresarse en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir dichas proteínas usando ARN obtenidos de construcciones de ADN de la presente invención.

Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el cultivo de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, en la que el promotor seleccionable es inducible, éste se induce mediante los medios apropiados (por ejemplo, cambio de la temperatura o exposición a un inductor químico) y las células se cultivan durante un periodo adicional.

Después se recogen típicamente las células mediante centrifugado, se rompen mediante medios físicos o químicos y el extracto en bruto resultante se conserva para una purificación adicional. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo un ciclo de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o el uso de agentes de lisis celular, dichos métodos los conocen bien los especialistas en la técnica.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona vectores capaces de expresar enzimas biosintéticas de fitato bajo el control de promotores adecuados. En general, los vectores deben ser funcionales en células vegetales. En algunos momentos, puede ser preferible tener vectores que son funcionales en *E. coli* (por ejemplo, producción de proteínas para generar anticuerpos, análisis de la secuencia de ADN, construcción de insertos, obtener cantidades de ácidos nucleicos y proteínas). Los vectores y los procedimientos para clonar y expresar en *E. coli* se describen a continuación y por ejemplo en el documento Sambrook *et al.*, (*supra*) y en Ausubel *et al.*, (*supra*).

Los vectores que son funcionales en plantas son preferiblemente plásmidos binarios obtenidos a partir de plásmidos de *Agrobacterium*. Dichos vectores son capaces de transformar células vegetales. Estos vectores contienen secuencias de borde a la izquierda y la derecha que son necesarias para la integración en el cromosoma del hospedador (planta). Como mínimo, entre estas secuencias de borde está el gen a expresar bajo el control de un promotor. En realizaciones preferidas, también se incluyen un marcador seleccionable y un gen informador. Para facilitar la obtención de suficientes cantidades del vector, se prefiere un origen bacteriano que permite la replicación en *E. coli*.

En algunas realizaciones preferidas, el vector contiene un gen informador y los genes estructurales de esta invención. El gen informador debe permitir la determinación rápida de la transformación y la expresión. Se prefiere el gen GUS (β -glucuronidasa) (Patente de Estados Unidos N° 5.268.463). Otros genes informadores, tales como β -galactosidasa, luciferasa, GFP y similares también son adecuados en el contexto de esta invención. Los métodos y sustratos para ensayar la expresión de cada uno de estos genes se conocen bien en la técnica. El gen informador debe estar bajo el control de un promotor que es funcional en vegetales. Dichos promotores incluyen el promotor CaMV 35S, el promotor de manopina sintasa, el promotor de ubiquitina y el promotor J de ADN.

Preferiblemente, el vector contiene un marcador seleccionable para identificar transformantes. El marcador seleccionable puede otorgar una ventaja de crecimiento en condiciones apropiadas. Generalmente, los marcadores seleccionables son genes de resistencia a fármacos, tales como neomicina fosfotransferasa. Los especialistas en la técnica

conocen otros genes de resistencia a fármacos que pueden sustituirse fácilmente. El marcador seleccionable tiene un promotor constitutivo o inducible unido y una secuencia de terminación, incluyendo una secuencia de señal de poliadenilación.

- 5 Además, preferiblemente en el vector se incluyen un origen de replicación bacteriano y un marcador seleccionable para bacterias. De los diversos orígenes (por ejemplo, coIE1, fago fd), se prefiere un origen de replicación coIE1. El más preferido es el origen de los plásmidos pUC, que permite un alto número de copias.

10 Un vector general adecuado para su uso en la presente invención se basa en pBI121 (Patente de Estados Unidos N° 5.432.081) un derivado de pBIN19. Se han descrito otros vectores (Patente de Estados Unidos N° 4.536.475) o pueden construirse en base a las directrices que se presentan en este documento. El plásmido pBI121 contiene una secuencia de borde a la izquierda y a la derecha para la integración en el cromosoma del hospedador vegetal. Estas secuencias de borde flanquean dos genes. Uno es un gen de resistencia a kanamicina (neomicina fosfotransferasa) controlado por un promotor de nopalina sintasa y que usa un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa. El segundo es el gen GUS de *E. coli* bajo el control de promotor 35S de CaMV y que se poliadenila usando un sitio de poliadenilación de nopalina sintasa. El plásmido pBI121 también contiene un origen de replicación bacteriano y un marcador seleccionable.

15 En algunas realizaciones, el vector puede contener los genes estructurales identificados en este documento bajo el control de un promotor. El promotor puede ser los promotores nativos asociados con los propios genes estructurales o un promotor constitutivo y potente, tal como un promotor 35S de CaMV. También pueden incluirse otros elementos que se prefieren para la expresión óptima (por ejemplo, un sitio de terminación de la transcripción, un potenciador, un sitio de corte y empalme). Como alternativa, los genes pueden expresarse como proteínas de fusión con un gen informador, por ejemplo.

25 *Métodos de Transformación de Plantas*

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención también proporciona métodos para producir una planta que expresa un gen extraño, que comprende las etapas de (a) introducir un vector como se ha descrito anteriormente, en una célula vegetal embriogénica, en el que el vector contiene un gen extraño en una forma expresable y (b) producir una planta a partir de la célula vegetal embriogénica, en la que la planta expresa el gen extraño.

30 Pueden introducirse vectores en células vegetales mediante cualquiera de varios métodos. Por ejemplo, puede introducirse el ADN como un plásmido mediante *Agrobacterium* en co-cultivo o mediante bombardeo. Otros métodos de transformación incluyen electroporación, transfección mediada por CaPO_4 y similares. Preferiblemente, el ADN se transfecta en primer lugar en *Agrobacterium* y posteriormente se introduce en las células vegetales. Más preferiblemente, la infección se consigue mediante co-cultivo. En parte, la elección de los métodos de transformación depende de la planta a transformar.

40 Los polipéptidos biosintéticos de fitato pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxapatita, y cromatografía de lectina. Más preferiblemente, se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución (“HPLC”) para la purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para volver a plegar la proteína para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o la purificación.

45 Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos purificados de forma natural, productos de procedimientos de síntesis química y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procarionta o eucariota, incluyendo, por ejemplo células de bacterias, levaduras, plantas superiores y de insectos y mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden glicosilarse o no glicosilarse. Además, los polipéptidos de la invención pueden incluir también un resto de metionina modificado inicial y en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador.

50 Se entiende que el gen que expresa el polipéptido de interés puede tener que “optimizarse con el codón” para realizar la expresión eficaz de un hospedador particular. Por lo tanto, esta invención contempla seleccionar entre las secuencias a continuación, la secuencia optimizada con el codón particular para la célula hospedadora particular de interés.

55 Otros genes de interés pueden “apilarse” durante los mismos sucesos de transformación. Por ejemplo, otros genes de interés pueden otorgar resistencia a enfermedad, plagas o herbicidas o mejorar la calidad nutritiva y alimentaria de la planta o semilla, como aumentando o alterando la expresión de aceites o alterando la expresión de proteínas o hidratos de carbono.

60 *Regeneración de Plantas Transformadas*

65 Después de la transformación, está implicada regeneración para obtener una planta completa a partir de las células transformadas. Las técnicas para regenerar plantas a partir de cultivo tisular tal como protoplastos transformados o líneas celulares de callos, se conocen en la técnica. Por ejemplo véase los documentos Phillips, *et al.*, *Plant Cell Tissue*

ES 2 296 337 T3

Organ Culture; Vol 1; p. 123 (1981); Patterson, *et al.*, *Plant Sci*; Vol. 42, p. 125; (1985); Wright, *et al.*, *Plant Cell Reports*; Vol. 6; pág. 83; (1987); y Barwale *et al.*, *Planta*; Vol. 167, pág. 473 (1986); cada uno incorporado en este documento en su totalidad como referencia. La selección del método apropiado está dentro del alcance de la técnica.

- 5 Se espera que las plantas transformadas se usen en programas de cultivo tradicionales, incluyendo sistemas de polinización TOPCROSS como se describe en los documentos US 5.706.603 y US 5.704.160.

Ensayo de Polinucleótidos

- 10 Esta invención también se refiere al uso de polinucleótidos de enzima biosintética de fitato en marcadores para ayudar en el programa de cultivo, como se describe por ejemplo en la publicación PCT US89/00709. El ADN puede usarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente usando PCR antes del análisis. PCR (Saiki *et al.*, *Nature* 324; 163-166 (1986)). También puede usarse ARN o ADNc de la misma manera. Como ejemplo, pueden usarse cebadores de PCR complementarios al ácido nucleico que codifica las enzimas biosintéticas de fitato para
15 identificar y analizar la presencia y la expresión de enzimas biosintéticas de fitato. Usando la PCR, puede realizarse la caracterización del gen presente en un tejido o variedad vegetal particular mediante un análisis del genotipo del tejido o variedad. Por ejemplo, pueden detectarse deleciones e inserciones por un cambio del tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo de una secuencia de referencia. Pueden identificarse mutaciones puntuales hibridando ADN amplificado con ARN de enzima biosintética de fitato radiomarcado o como alternativa, secuencias de
20 ADN antisentido de la enzima bioestética de fitato radiomarcadas. Las secuencias emparejadas perfectamente pueden distinguirse de los dúplex emparejados erróneamente mediante digestión con ARNasa A o mediante diferencias en las temperaturas de desnaturalización.

- 25 Las diferencias de secuencia entre un gen de referencia y los genes que tienen mutaciones también pueden mostrarse mediante secuenciación directa del ADN. Además, pueden emplearse seguimientos de ADN clonados como sondas para detectar segmentos de ADN específicos. La sensibilidad de dichos métodos puede potenciarse enormemente mediante el uso apropiado de PCR o de otro método de amplificación. Por ejemplo, se usa un cebador de secuenciación con un producto de PCR de doble cadena o con una molécula plantilla de cadena sencilla generada mediante una PCR modificada. La determinación de las secuencias se realiza mediante procedimientos convencionales con nucleótidos radiomarcados o mediante procedimientos de secuenciación automáticos con marcas fluorescentes.
30

- La tipificación genética de diversas variedades de plantas basada en diferencias de la secuencia de ADN puede conseguirse mediante la detección de la alteración en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles, con o sin agentes desnaturalizantes. Las pequeñas deleciones e inserciones de secuencias pueden visualizarse mediante
35 electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de diferentes secuencias pueden distinguirse en geles con gradiente de formamida desnaturalizante en los que las movilidades de diferentes fragmentos de ADN se retardan en el gel en diferentes posiciones de acuerdo con sus temperaturas específicas de desnaturalización o desnaturalización parcial (véase por ejemplo, Myers *et al.*, *Science*, 230: 1242 (1985)).

- 40 Los cambios de secuencia en ubicaciones específicas también pueden mostrarse mediante ensayos de protección con nucleasa, tales como la protección de ARNasa y S1 o el método de escisión química (por ejemplo Cotton *et al.*, *Prot. Nat'l. Acad. Sci.*, (USA), 85: 4397-4401 (1985)).

- 45 Por lo tanto, la detección de una secuencia de ADN específica puede conseguirse mediante métodos tales como hibridación, protección con ARNasa, escisión química, secuenciación directa de ADN o el uso de enzimas de restricción (por ejemplo polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción ("RFLP") y transferencia de Southern del ADN genómico.

- 50 Además de los métodos más convencionales de electroforesis en gel y secuenciación del ADN, las mutaciones también pueden detectarse mediante análisis *in situ*.

- Una mutación puede evaluarse por ejemplo, mediante un ensayo de secuenciación de ADN. Las muestras se procesan mediante métodos conocidos en la técnica para capturar el ARN. Primero se sintetiza la cadena de ADNc a partir de las muestras de ARN añadiendo un cebador de oligonucleótidos constituido por secuencias que hibridan
55 con una región del ARNm. Se añaden transcriptasa inversa y desoxinucleótidos para permitir la síntesis de la primera cadena de ADNc. Las secuencias de los cebadores se sintetizan de acuerdo con las secuencias de ADN de las enzimas biosintéticas de fitato de la invención. La secuencia del cebador está constituida generalmente por al menos 15 bases consecutivas y puede contener al menos 30 o incluso 50 bases consecutivas.

- 60 Las células que tienen mutaciones o polimorfismos en el gen de la presente invención también pueden detectarse a nivel del ADN mediante diversas técnicas. El ADN puede usarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente usando PCR (Saiki *et al.*, *Nature*, 324: 163-166 (1986)) antes del análisis. También puede usarse RT-PCR para detectar las mutaciones. Se prefiere particularmente usar RT-PCR junto con sistemas de detección automatizados, tales como por ejemplo GeneScan. También puede usarse ARN o ADNc para el mismo fin, PCR o
65 RT-PCR. Como ejemplo, pueden usarse cebadores de PCR complementarios a los ácidos nucleicos que codifican las enzimas biosintéticas de fitato para identificar y analizar las mutaciones. Los ejemplos de cebadores representativos se muestran a continuación en la Tabla 1. Por ejemplo, pueden detectarse deleciones o inserciones mediante un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales pueden

ES 2 296 337 T3

identificarse hibridando ADN amplificado con ARN radiomarcado o como alternativa, secuencias de ADN antisentido radiomarcadas. Aunque las secuencias perfectamente emparejadas pueden distinguirse de los dúplex emparejados erróneamente mediante digestión con ARNasa A o mediante diferencias en las temperaturas de desnaturalización, preferiblemente se identifican las mutaciones puntuales mediante análisis de la secuencia.

5

Cebadores usados para la detección de mutaciones o polimorfismos en el gen de mio-inositol 1-fosfato sintasa

5' CTCGCTACCTCGCTTCGATTCCATT 3'

10

5' ACGCCACTTGGCTCACTTGTACTCCA 3'

Cebadores usados para la detección de mutaciones o polimorfismos en el gen de mio-inositol monofosfatasa-3:

5' ACGAGGTTGCGGGCGAACCGAAAAT 3'

15

5' TAGGGACCGTTGCCTCAACCTAT 3'

Cebadores usados para la detección de mutaciones o polimorfismos en el gen de mio-inositol 1,3,4-trisfosfato 5/6 quinasa:

20

5' TTCTCTCGGTCGCCGCTACTGG 3'

5' AGCATGAACAGTTAGCACCT 3'

25

Cebadores usados para la detección de mutaciones o polimorfismos en el gen de fosfatidilinositol-3-quinasa

5' CCGCTTCTCC TCACCTTCCT CT 3'

5' TGGCTTGTGA CAGTCAGCAT GT 3'

30

Los cebadores anteriores pueden usarse para amplificar ADNc de enzima biosintética de fitato o clones genómicos aislados a partir de una muestra obtenida de una planta individual. Los cebadores anteriores pueden tener 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos retirados del extremo 5' y/o del 3'. Los cebadores pueden usarse para amplificar el gen aislado del individuo de modo que el gen pueda someterse a diversas técnicas para la aclaración de la secuencia de ADN. De esta manera, pueden identificarse mutaciones de la secuencia de ADN.

35

Ensayos de Polipéptidos

40

La presente invención también se refiere a ensayos de diagnóstico tales como ensayos cuantitativos y de diagnóstico para detectar niveles de enzimas biosintéticas de fitato en células y en tejidos, incluyendo la determinación de niveles normales y anormales. Por lo tanto, por ejemplo, un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la invención para detectar la expresión de enzimas biosintéticas de fitato en comparación con muestras de tejido de control normales puede usarse para detectar niveles de expresión inaceptables. Las técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar los niveles de polipéptidos de la presente invención, en una muestra obtenida a partir de una fuente vegetal se conocen bien por los especialistas en la técnica. Dichos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia de Western y ensayos ELISA. Entre estos, se prefieren frecuentemente los ELISA. Un ensayo ELISA comprende inicialmente preparar un anticuerpo específico para el polipéptido, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Además se prepara generalmente un anticuerpo informador que se une al anticuerpo monoclonal. El anticuerpo informador se une a un reactivo detectable tal como un reactivo radioactivo, fluorescente o enzimático, en este ejemplo la enzima peroxidasa de rábano rusticano.

50

Para realizar un ELISA, se extrae una muestra de un hospedador y se incuba en un soporte sólido, por ejemplo, una placa de poliestireno, que se une a las proteínas en la muestra. Cualquier sitio de unión a la proteína libre en la placa se recubre después incubando con una proteína no específica tal como albúmina de suero bovino. A continuación, el anticuerpo monoclonal se incuba sobre la placa, periodo durante el cual los anticuerpos monoclonales se unen a cualquier enzima biosintética de fitato unida a la placa de poliestireno. El anticuerpo monoclonal no unido se lava con tampón. El anticuerpo informador unido a la peroxidasa de rábano rusticano se coloca en la placa dando como resultado la unión del anticuerpo informador a cualquier anticuerpo monoclonal unido a la enzima biosintética de fitato. A continuación se retira mediante lavado el anticuerpo informador no unido. Después se añaden a la placa reactivos para actividad peroxidasa, incluyendo un sustrato colorimétrico. La peroxidasa inmovilizada, unida a la enzima biosintética de fitato a través de los anticuerpos primario y secundario, produce un producto de reacción coloreado. La cantidad de color desarrollado en un periodo de tiempo dado indica la cantidad de enzima biosintética de fitato presente en la muestra. Los resultados cuantitativos se obtienen típicamente mediante referencia a una curva patrón.

65

Puede emplearse un ensayo competitivo en el que los anticuerpos específicos de enzimas biosintéticas de fitato unidas a un soporte sólido y una enzima marcada obtenida del hospedador se pasan sobre el soporte sólido y la cantidad de marca detectada unida al soporte sólido puede correlacionarse con una cantidad de enzima biosintética del fitato en la muestra.

Anticuerpos

Los polipéptidos, sus fragmentos u otros derivados o análogos de los mismos, o células que los expresan pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos contra ellos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención también incluye anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, y humanizados, así como fragmentos Fab o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de dichos anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos que corresponden a una secuencia de la presente invención pueden obtenerse mediante inyección directa de los polipéptidos en un animal o administrando los polipéptidos a un animal preferiblemente un animal no humano. El anticuerpo obtenido de este modo se unirá a continuación a los propios polipéptidos. De esta manera, puede usarse incluso una secuencia que codifica sólo un fragmento del polipéptido para generar anticuerpos que se unen a todo el polipéptido nativo. Dichos anticuerpos pueden usarse después para aislar el polipéptido del tejido que expresa este polipéptido.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* 256, 495-497 (1975)), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983)) y la técnica del hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, pg. 77-96 en *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY* Alan R. Liss, Inc., (1985)).

Las líneas celulares de hibridoma que secretan el anticuerpo monoclonal son otro aspecto de esta invención.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla para productos de polipéptidos inmunogénicos de esta invención. Además, pueden usarse ratones transgénicos y otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados para productos de polipéptidos inmunogénicos de esta invención.

Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido o purifican el polipéptido de la presente invención mediante la unión del anticuerpo a un soporte sólido para el aislamiento y/o purificación mediante cromatografía de afinidad.

Los derivados de polipéptidos incluyen derivados antigénica o inmunológicamente equivalentes que forman un aspecto particular de esta invención.

La expresión “derivado antigénicamente equivalente” como se usa en este documento abarca un polipéptido o su equivalente que será reconocido específicamente por algunos anticuerpos que cuando se generan para la proteína o polipéptido de acuerdo con la presente invención, impiden la interacción física inmediata entre el anticuerpo y su antígeno afín.

La expresión “derivado inmunológicamente equivalente” como se usa en este documento abarca un péptido o su equivalente que cuando se usa en una formulación adecuada para generar anticuerpos en un vertebrado, los anticuerpos actúan para evitar la interacción física inmediata entre el anticuerpo y su antígeno afín.

El polipéptido, tal como un derivado antigénica o inmunológicamente equivalente o una proteína de fusión del mismo, se usa como antígeno para inmunizar un ratón u otro animal tal como una rata, cobaya, cabra, conejo, oveja, vaca o pollo. La proteína de fusión puede proporcionar estabilidad al polipéptido. El antígeno puede asociarse, por ejemplo mediante conjugación, con una proteína transportadora inmunogénica, por ejemplo albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Como alternativa, un péptido antigénico múltiple que comprende múltiples copias de la proteína o polipéptido o un polipéptido antigénica o inmunológicamente equivalente del mismo puede ser lo suficientemente antigénico para mejorar la inmunogenicidad y evitar el uso de un vehículo.

Como alternativa puede utilizarse tecnología de presentación en fagos para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión con el polipéptido de repertorios de genes *v* amplificados por PCR de linfocitos de seres humanos seleccionados por la posesión de anti-Fbp o de bibliotecas sin tratamiento previo (McCafferty, J. *et al.*, (1990), *Nature* 348: 552-554; Marks, J. *et al.*, (1992), *Biotechnology* 10: 779-783). La afinidad de estos anticuerpos también puede mejorarse mediante reorganización de las cadenas (Clackson, T. *et al.*, (1991) *Nature* 352: 624-628).

El anticuerpo debe seleccionarse por alta afinidad con el polipéptido y/o la proteína de fusión.

Como se ha mencionado anteriormente, puede prepararse un fragmento del anticuerpo final.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto de M_r aproximadamente 150.000 o un derivado de este, por ejemplo un fragmento Fab o un fragmento Fv como se describe en el documento Sierra, A y Pluckthun, A, *Science* 240: 1038-1040 (1988). Si están presentes dos dominios de unión al antígeno, cada dominio puede dirigirse contra un epítopo diferente, denominándose anticuerpos “bienespecíficos”.

El anticuerpo, como se ha mencionado anteriormente, puede prepararse mediante medios convencionales por ejemplo mediante tecnología de anticuerpo monoclonal establecida (Kohler, G. y Milstein, C., *Nature*, 256: 495-497 (1975)) o usando medios recombinantes, por ejemplo bibliotecas combinatorias, por ejemplo como se describe en el documento Huse, W.D. *et al.*, *Science* 246: 1275-1281 (1989).

Preferiblemente, el anticuerpo se prepara mediante la expresión de un polímero de ADN que codifica dicho anticuerpo en un sistema de expresión apropiado tal como se ha descrito anteriormente para la expresión de polipéptidos de la invención. La elección del vector para el sistema de expresión se determinará en parte por el hospedador, que puede ser una célula procariota, tal como *E. coli* (preferiblemente la cepa B) o *Streptomyces* sp. o una célula eucariota, tal como una C127 de ratón, mieloma de ratón, HeLa de ser humano, de ovario de hámster chino, o una célula de hongo filamentoso o unicelular o de insecto. El hospedador también puede ser un animal transgénico o una planta transgénica por ejemplo como se describe en el documento Hiatt, A. *et al.*, *Nature* 340: 76-78 (1989). Los vectores adecuados incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y virus recombinantes obtenidos de por ejemplo baculovirus y virus vaccinia.

El fragmento Fab también puede prepararse a partir de su anticuerpo monoclonal parental mediante tratamiento enzimático, por ejemplo usando papaína para escindir la porción Fab de la porción Fc.

Moléculas y Ensayos de Unión a Enzima Biosintética de Fitato

Esta invención también se refiere a un método para identificar moléculas, tales como moléculas de unión, que se unen a las enzimas biosintéticas de fitato. Los genes que codifican proteínas que se unen a las enzimas, tales como proteínas de unión, puede identificarse mediante numerosos métodos conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo selección de ligandos y clasificación FACS. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio tales como por ejemplo Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology* 1(2): Capítulo 5 (1991).

Por ejemplo, puede emplearse para este fin la clonación y expresión. Con este fin, se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula que expresa las enzimas biosintéticas de fitato y se crea una biblioteca de ADNc a partir de este ARN, la biblioteca se divide en dos reservas y las reservas se transfectan individualmente a células que no expresan la enzima. Las células transfectadas se exponen después a la enzima marcada. La enzima puede marcarse mediante diversas técnicas bien conocidas incluyendo métodos convencionales de radio-yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de ese sitio. Después de la exposición, las células se fijan y la unión de la enzima se determina. Estos procedimientos se realizan convenientemente en portaobjetos de vidrio.

Se identifican reservas de ADNc que producían células de unión a enzimas biosintéticas de fitato. Se preparan sub-reservas a partir de estos positivos, se transfectan a células hospedadoras y se seleccionan como se ha descrito anteriormente. Usando un procedimiento de formación de sub-reservas y re-selección repetitivo, puede aislarse uno o más clones individuales que codifican la supuesta molécula de unión.

Como alternativa, puede unirse mediante fotoafinidad un ligando marcado a un extracto celular, tal como una membrana o un extracto de membrana, preparado a partir de células que expresan una molécula a la que se une, tal como una molécula de unión. El material reticulado se resuelve mediante una electroforesis en gel de poli(acrilamida) ("PAGE") y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene la unión al ligando puede escindirse, resolverse en fragmentos peptídicos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación puede usarse para diseñar sondas de oligonucleótidos únicos o degenerados para explorar bibliotecas de ADNc para identificar genes que codifican la supuesta molécula de unión.

Los polipéptidos de la invención también pueden usarse para evaluar la capacidad de unión a enzimas biosintéticas de fitato de las moléculas de unión a enzimas biosintéticas de fitato, tales como moléculas de unión, en células o en preparaciones sin células.

Los polipéptidos de la invención también pueden usarse para evaluar la unión de sustratos de moléculas pequeñas y ligandos en por ejemplo, células, preparaciones sin células, bibliotecas químicas y mezclas de productos naturales. Estos sustratos y ligandos pueden ser sustratos y ligandos naturales o pueden ser miméticos estructurales o funcionales.

Los anticuerpos anti-enzima de fitato representan una clase útil de moléculas de unión contempladas por la invención.

Antagonistas - Ensayos y Moléculas

La invención también se refiere a un método para seleccionar compuestos para identificar a los que potencian o bloquean la acción de enzimas biosintéticas de fitato sobre las células, tal como su interacción con las moléculas sustrato. Un antagonista es un compuesto que disminuye la función biológica natural de las enzimas.

Los antagonistas potenciales incluyen pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a un polipéptido de la invención y de este modo inhiben o anulan su actividad. Los antagonistas potenciales también pueden ser pequeñas moléculas orgánicas, un péptido, un polipéptido tal como una proteína o anticuerpo estrechamente relacionado que se une a los mismos sitios de una molécula de unión, tal como una molécula de unión,

sin inducir las actividades inducidas por la enzima biosintética de fitato, evitando de este modo la acción de la enzima al impedir que la enzima se una.

Los antagonistas potenciales incluyen una pequeña molécula que se une a y ocupa el sitio de unión del polipéptido evitando de este modo la unión de moléculas de unión celular, tales como moléculas de unión, de modo que se evite la actividad biológica normal. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen aunque sin limitación pequeñas moléculas orgánicas, péptidos o moléculas similares a péptidos.

Otros antagonistas potenciales incluyen moléculas que afectan a la expresión del gen que codifica las enzimas biosintéticas de fitato (por ejemplo, inhibidores de la transactivación). Otros antagonistas potenciales incluyen moléculas antisentido. La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión génica a través de ARN o ADN antisentido o a través de la formación de dobles o triples hélices. Las técnicas antisentido se describen por ejemplo en Okano *J. Neurochem.* 56: 560 (1991); *OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION*, CRC Press Boca Raton, FL (1988). La formación de triple hélice se describe en Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241: 456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science* 251: 1360 (1991). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN complementario. Por ejemplo, la porción 5' codificante de un polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la presente invención puede usarse para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de entre aproximadamente 10 y 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para que sea complementario con una región del gen implicado en la transcripción evitando de este modo la transcripción y la producción de enzimas biosintéticas de fitato. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm en *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en enzimas biosintéticas de fitato. Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden suministrarse también a células de modo que el ARN o ADN antisentido pueda expresarse *in vivo* para inhibir la producción de enzimas biosintéticas de fitato.

Los antagonistas pueden emplearse por ejemplo para reducir los niveles de fitato y/o para aumentar el fósforo disponible en células vegetales.

Ejemplos

La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención con referencia a realizaciones específicas. Estas ejemplificaciones, aunque ilustran algunos aspectos específicos de la invención, no limitan ni restringen el alcance de la invención descrita.

Algunos de los términos usados en este documento se explican en el glosario anterior.

Todos los ejemplos se realizaron usando técnicas convencionales, que conocen bien y son rutinarias para los especialistas en la técnica, excepto donde se describa otra cosa con detalle. Las técnicas de biología molecular rutinarias de los siguientes ejemplos pueden realizarse como se describe en manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).

Todas las partes o cantidades que se presentan en los siguientes ejemplos están en peso, a menos que se especifique otra cosa.

A menos que se indique otra cosa, la separación por tamaño de fragmentos en los ejemplos de a continuación se realizó usando técnicas convencionales de electroforesis en gel de agarosa y de poli(acrilamida) ("PAGE") en Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) y muchas otras referencias tales como por ejemplo, por Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 8: 4057 (1980).

A menos que se describa otra cosa, los ligamientos se realizaron usando tampones, temperaturas de incubación y tiempos convencionales, cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ligar y aproximadamente 10 unidades de la ligasa de ADN de T4 ("ligasa") por 0,5 microgramos de ADN.

Ejemplo 1

Aislamiento del ADN que Codifica Nuevas Proteínas de Zea mays

El polinucleótido que tiene la secuencia de ADN de mio-inositol 1-fosfato sintasa se obtuvo a partir de la secuenciación de una biblioteca de clones de ADNc preparada a partir de embriones de maíz aislados 15 días después de la polinización. El polinucleótido que tenía la secuencia de ADN de mio-inositol monofosfatasa-3 se obtuvo a partir de la secuenciación de una biblioteca de clones de ADNc preparada a partir de mazorcas inmaduras de maíz. El polinucleótido que tenía la secuencia de ADN de mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5.6-quinasa se obtuvo a partir de la secuenciación de una biblioteca de clones de ADNc preparada a partir de brotes de panojas de maíz. El polinucleótido que tenía la secuencia de ADN de fosfatidilinositol-3-quinasa se obtuvo a partir de la secuenciación de una biblioteca de clones de ADNc preparada a partir de semillas de maíz en germinación. El ARN total se aisló a partir de este tejido usando protocolos convencionales y se enriqueció en ARNm mediante la selección con el oligo dT, de nuevo mediante protocolos convencionales. Este ARNm se usó a continuación como plantilla para sintetizar ADN comple-

mentario (ADNc) usando la enzima transcriptasa inversa mediante métodos convencionales. La cadena resultante de ADNc se convirtió después en fragmentos de ADNc de doble cadena y se ligó en el vector de clonación pSPORT usando métodos de ligamiento/transformación convencionales. Después se seleccionaron las colonias individuales y se preparó ADN de plásmido de cada una. Este ADN de plásmido se desnaturalizó después y se usó como plantilla en reacciones de secuenciación de dideoxinucleótidos. Al secuenciar los clones individuales identificados de este modo con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia original es posible prolongar la secuencia en ambas direcciones para determinar la secuencia génica completa. Las técnicas adecuadas se describen por Maniatis T., Fritsch, E. F. y Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). (Véase Screening By Hybridization 1.90 y Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). Las secuencias se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas (es decir, Genbank) para determinar las homologías/identificación de genes. En algunos casos los datos de secuenciación de dos o más clones que contenían segmentos de ADN solapantes se usaron para construir la secuencia de ADN contigua a continuación.

15 Ejemplo 2

Construcción de Casetes de Expresión para la Silenciación Dependiente de Homología de Genes de la Expresión de Enzimas Biosintéticas de Fitato

20 Para facilitar las manipulaciones de este rasgo en programas de cultivo convencionales, se usa la casete de expresión descrita anteriormente en la silenciación de gen homólogo (es decir, Knockout) de los polinucleótidos de la enzima biosintética de fitato endógenos usando el promotor preferido por los embriones globulina-1 para controlar la expresión de los genes.

25 Las casetes de expresión en plantas se preparan usando el promotor preferido por los embriones globulina-1 para controlar la expresión de los polinucleótidos de enzimas biosintéticas de fitato. Las secuencias de terminación de globulina-1 se incluyen en esta casete. Toda la casete de expresión se clona en un vector de plásmido basado en PCU para facilitar su manipulación en *E. coli*. Esta construcción se usa para transformación mediante bombardeo de partículas del maíz junto con otra construcción de expresión que incluye un marcador seleccionable (por ejemplo Pat, PHP8092 → Ubi::mo-PAT::ubi). Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, se desplaza un plásmido a un vector binario apropiado que contiene secuencias de borde izquierda y derecha para facilitar la transferencia de ADN al genoma diana.

35 Este polinucleótido, que codifica los polipéptidos de la invención, cuando se prepara para ser no funcional en plantas, da como resultado una reducción del ácido fítico y un aumento de los niveles de fósforo no de fitato. Esto puede demostrarse usando el elemento Mu transponible. Se confirma que las líneas de maíz tienen el elemento Mu insertado en la región codificante de los polinucleótidos de enzimas biosintéticas de fitato. Se realizan análisis genéticos exhaustivos de este fenotipo que demuestran que se transmite a la progenie como un rasgo recesivo homocigoto.

40 Ejemplo 3

Transformación del Maíz

45 Los polinucleótidos de la invención contenidos dentro de un vector se transforman al interior de callos de maíz embriogénico mediante bombardeo de partículas. Las plantas de maíz transgénicas se producen mediante el bombardeo de embriones inmaduros embriogénicamente sensibles con partículas de tungsteno asociadas a plásmidos de ADN. Los plásmidos están constituidos por un gen marcador seleccionable y uno no seleccionable.

Preparación de las Partículas

50 Se añaden quince mg de partículas de tungsteno (General Electric), de 0,5 a 1,8 μ , preferiblemente de 1 a 1,8 μ y más preferiblemente 1 μ , a 2 ml de ácido nítrico concentrado. Esta suspensión se sonicó a 0°C durante 20 minutos (Sonicador Branson Modelo 450, rendimiento del 40%, ciclo de trabajo constante). Las partículas de tungsteno se sedimentan mediante centrifugado a 10.000 rmp (Biofuge) durante 1 minuto y se elimina el sobrenadante. Se añaden 2 ml de agua destilada estéril al sedimento, y se usa una sonicación breve para resuspender las partículas. La suspensión se sedimenta, se añade al sedimento un mililitro de etanol absoluto y se usa una sonicación breve para resuspender las partículas. Se realiza un aclarado, sedimentación y resuspensión de las partículas dos veces más con agua destilada estéril y finalmente las partículas se resuspenden en dos mililitros de agua destilada estéril. Las partículas se subdividen en alícuotas de 250 μ l y se almacenan congeladas.

Preparación de la Asociación de Partículas-ADN del Plásmido

65 La reserva de partícula de tungsteno se sonica brevemente en un sonicador de baño de agua (Sonicador Branson Modelo 450, rendimiento del 20%, ciclo de trabajo constante) y se transfieren 50 ml a un tubo de microcentrífuga. Se añaden cantidades equimolares de ADN del plásmido seleccionable y no seleccionable a las partículas para una cantidad de ADN final de 0,1 a 10 mg en un volumen total de 10 ml, y se sonican brevemente. Preferiblemente, se usa 1 mg de ADN total. Específicamente, se añaden a la suspensión de partículas 4,9 ml de PHP 8092 (Ubiquitina::ubiquitina intrón::mo-PAT::35S CaMV, 6,329 kbp) más 5,1 ml de (globulina1::mi1ps::globulina1), donde cualquier polinucleó-

ES 2 296 337 T3

tido de enzima biosintética de fitato puede sustituir a mil ips, ambos a 0,1 mg/ml en tampón TE. Se añaden cincuenta microlitros de CaCl₂ 2,5 M acuoso estéril y la mezcla se sonica brevemente y se agita en vórtice. Se añaden veinte microlitros de espermidina 0,1 M acuosa estéril y la mezcla se sonica y se agita en vórtice brevemente. La mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos con sonicación breve intermitente. La suspensión de partículas se centrifuga y el sobrenadante se retira. Se añaden doscientos cincuenta microlitros de etanol absoluto al sedimento, seguido de sonicación breve. La suspensión se sedimenta, el sobrenadante se retira y se añaden 60 ml de etanol absoluto. La suspensión se sonica brevemente antes de introducir la aglomeración de partículas-ADN en macrovehículos (proyectiles).

10 Preparación del Tejido

Los embriones inmaduros de la variedad High Type II del maíz son el objetivo de la transformación mediada por bombardeo de partículas. Este genotipo es la F₁ de dos líneas genéticas puras, progenitores A y B, obtenidas del cruce de dos líneas de maíz conocidas, A188 y B73. Los dos progenitores se seleccionan por su alta competencia de embriogénesis somática, de acuerdo con Armstrong *et al.*, *Maize Genetics Coop. News* 65: 92 (1991).

Las mazorcas de las plantas de la F₁ se cruzaron entre sí o con sus hermanos y los embriones se diseccionan de forma aséptica para desarrollar cariopsis cuando el escutelo se vuelve opaco en primer lugar. Esta etapa se produce aproximadamente 9-13 días después de la polinización y en general aproximadamente 10 días después de la polinización, dependiendo de las condiciones de cultivo. Los embriones son de aproximadamente 0,75 a 1,5 milímetros de largo. Las mazorcas se esterilizan en su superficie con Clorox al 20-50% durante 30 minutos, seguido de tres aclarados con agua destilada estéril.

Los embriones inmaduros se cultivan con el escutelo orientado hacia arriba, en un medio de inducción embriogénica constituido por sales basales N6, vitaminas de Eriksson, 0,5 mg/l de tiamina HCl, 30 gm/l de sacarosa, 2,88 gm/l de L-prolina, 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2 gm/l de Gelrite y 8,5 mg/l de AgNO₃. Chu *et al.*, *Sci. Sin.* 18: 659 (1975); Eriksson, *Physiol. Plant* 18: 976 (1965). El medio se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dispensa en 100 placas de Petri de 25 mm. El AgNO₃ se filtra con un filtro estéril y se añade al medio después de esterilizar con el autoclave. Los tejidos se cultivan en completa oscuridad a 28°C. Después de aproximadamente 3 a 7 días, más habitualmente aproximadamente 4 días, el escutelo del embrión se hincha a aproximadamente el doble de su tamaño original y las protuberancias en la superficie de la coleoriza del escutelo indicaban el principio de tejido embriogénico. Hasta el 100% de los embriones mostraban esta respuesta, pero generalmente, la frecuencia de la respuesta embriogénica es de aproximadamente el 80%.

Cuando se observa la respuesta embriogénica, los embriones se transfieren a un medio constituido por medio de inducción modificado para contener 120 gm/l de sacarosa. Los embriones se orientan con el polo de la coleoriza, el tejido sensible embriogénicamente, hacia arriba del medio de cultivo. Se sitúan 10 embriones por placa de Petri en el centro de una placa de Petri en un área de aproximadamente 2 cm de diámetro. Los embriones se mantienen en este medio durante 3-16 horas, preferiblemente 4 horas, en completa oscuridad a 28°C antes del bombardeo con partículas asociadas con ADN de plásmido que contienen los genes marcadores seleccionables y no seleccionables.

Para realizar el bombardeo de partículas de los embriones, los aglomerados de partícula-ADN se aceleran usando un dispositivo de aceleración de partículas DuPont PDS-1000. La aglomeración de partícula-ADN se sonica brevemente y se depositaron 10 ml en macrovehículos y se deja evaporar el etanol. El macrovehículo se acelera en una pantalla de frenado de acero inoxidable mediante la ruptura de un diafragma de polímero (disco de ruptura). La ruptura se realiza mediante helio presurizado. La velocidad de la aceleración de partícula-ADN se determina en base a la presión de rotura del disco de ruptura. Se usan presiones del disco de ruptura de 200 a 1800 psi (1,38 a 12, 14 MPa), preferiblemente 650 a 1100 psi (4,48 a 7,58 MPa), y más preferiblemente de aproximadamente 900 psi (6,20 MPa). Se usan múltiples discos para realizar un intervalo de presiones de ruptura.

La balda que contiene la placa con embriones se coloca 5,1 cm por debajo del fondo de la plataforma del macrovehículo (balda N° 3). Para realizar el bombardeo de partículas de los embriones inmaduros, se instalan un disco de ruptura y un macrovehículo con aglomerados de partícula-ADN secos en el dispositivo. La presión de He suministrada al dispositivo se ajusta a 200 psi (1,38 MPa) por encima de la presión de rotura del disco de ruptura. Se coloca una placa de Petri con los embriones diana en la cámara de vacío y se sitúan en la ruta prevista de las partículas aceleradas. Se crea un vacío en la cámara, preferiblemente a aproximadamente 28 in Hg. Después del funcionamiento del dispositivo, se libera el vacío y la placa de Petri se retira.

Los embriones bombardeados permanecen en el medio osmóticamente ajustado durante el bombardeo y de 1 a 4 días después. Los embriones se transfieren a medio de selección constituido por sales basales N6, vitaminas de Eriksson, 0,5 mg/l de tiamina HCl, 30 gm/l de sacarosa, 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2 gm/l de Gelrite, 0,85 mg/l de AgNO₃ y 3 mg/l de bialaphos (Herbiace, Meiji). El bialaphos se añade después de filtrarlo con un filtro estéril. Los embriones se subcultivan en medio de selección recién preparado a intervalos de 10 a 14 días. Después de aproximadamente 7 semanas, el tejido embriogénico supuestamente transformado para genes marcadores seleccionables y no seleccionables, prolifera a partir de aproximadamente el 7% de los embriones bombardeados. El supuesto tejido transgénico se recupera y este tejido obtenido de los embriones individuales se considera como un suceso y se propaga independientemente en medio de selección. Se consiguen dos ciclos de propagación clonal mediante la selección visual de los fragmentos contiguos más pequeños del tejido embriogénico organizado.

ES 2 296 337 T3

Se procesa una muestra de tejido de cada suceso para recuperar el ADN. El ADN se restringe con una endonucleasa de restricción y se sondea con secuencias de cebador diseñadas para amplificar secuencias de ADN que se solapan con la porción de enzimas biosintéticas del fitato y de enzimas no biosintéticas de fitato del plásmido. El tejido embriogénico con una secuencia amplificable se lleva a la etapa de regeneración de la planta.

5 Para la regeneración de las plantas transgénicas, el tejido embriogénico se subcultiva en un medio que comprende sales MS y vitaminas (Murashige & Skoog, *Physiol. Plant* 15: 473 (1962)), 100 mg/l de mio-inositol, 60 gm/l de sacarosa, 3 gm/l de Gelrite, 0,5 mg/l de zeatina, 1 mg/l de ácido indol-3-acético, 26,4 ng/l de ácido cis-trans-abscísico y 3 mg/l de bialaphos en 100 placas de Petri de 25 mm y se incuba en la oscuridad a 28°C hasta que puede observarse el desarrollo de embriones somáticos maduros bien formados. Esto requiere aproximadamente 14 días. Los embriones somáticos bien formados son opacos y son de color crema y están constituidos de un escutelo y un coleoptilo identificables. Los embriones se sub-cultivan individualmente en un medio de germinación que comprende sales MS y vitaminas, 100 mg/l de mio-inositol, 40 gm/l de sacarosa y 1,5 gm/l de Gelrite en 100 placas de Petri de 25 mm y se incuban en un fotoperíodo de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad y 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ de tubos fluorescentes de color blanco frío. Después de aproximadamente 7 días, los embriones somáticos han germinado y han producido un brote y una raíz bien definidos. Las plantas individuales se sub-cultivan en medio de germinación en 125 tubos de vidrio de 25 mm para permitir el desarrollo posterior de la planta. Las plantas se mantienen en un fotoperíodo de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad y 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ de tubos fluorescentes blanco frío. Después de aproximadamente 7 días, las plantas están bien establecidas y se transplantan a un suelo de horticultura, se endurecen y se colocan en una mezcla de suelo de invernadero comercial y se cultivan hasta la madurez sexual en un invernadero. Se usa una línea de la misma estirpe de elite como macho para polinizar a las plantas transgénicas regeneradas.

Ejemplo 4

25 *Identificación de Líneas de Maíz Transgénicas con Alto Contenido en Fósforo*

Los transformantes resultantes se exploran para detectar niveles elevados de fósforo inorgánico usando un ensayo colorimétrico sencillo. Los granos transgénicos individuales se trituran en el fondo de una bandeja de cría megatiter usando una prensa hidráulica a 2000 psi. Los granos triturados se empapan después con 2 ml de H₂SO₄ 1 N durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se inicia el desarrollo del color mediante la adición de 4 ml de solución de desarrollo (1 parte de ácido ascórbico al 10%, 6 partes de molibdato de amonio al 0,42% en H₂SO₄ 1 N) a cada grano triturado. Los granos se valoran después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente como positivos (azul) o negativos (transparentes). Positivo en este caso se refiere a un alto nivel de fósforo inorgánico. Este protocolo es una versión modificada de lo que se describe en el documento Chen *et al.*, *Anal. Chem.* 28: 1756 (1956). Los transformantes que se seleccionan como positivos con el ensayo colorimétrico se someterán después a análisis más rigurosos que incluyen transferencias de Southern, Northern y Western y cuantificación de los niveles de ácido fítico.

Confirmación de Niveles de Fósforo no de Fitato Elevados

40 Las presentes plantas transgénicas preferiblemente tienen niveles de fósforo no de fitato en exceso con respecto a los niveles naturales de fósforo disponibles para las especies vegetales de interés. Con respecto al maíz se prefiere tener niveles de fósforo no de fitato de aproximadamente el 0,175%, más preferiblemente de aproximadamente el 0,2% y aún más preferiblemente de aproximadamente el 0,225% o superiores. Basándose estos porcentajes en el %p/p a una base de humedad del 13% para la semilla del maíz. Con respecto a la semilla de soja, se prefiere tener un nivel de fósforo no de fitato de aproximadamente el 0,47%, más preferiblemente de aproximadamente el 0,49% y aún más preferiblemente de aproximadamente el 0,51%. Basándose este último porcentaje en el peso del fósforo no de fitato/ (P no de fitato/gramos de alimento en una base de humedad del 13%).

50 Cada planta identificada como una planta transgénica potencial con alto contenido en fósforo se ensaya de nuevo para confirmar la lectura de fósforo elevado original. Algunas supuestas plantas transgénicas pueden no confirmar el rasgo de alto contenido en fósforo. Aquellas que lo confirman se seleccionan en base a uniformidad para el rasgo de elevado contenido de fósforo.

Confirmación de los Niveles Reducidos de Fitato

55 Para determinar si las plantas transgénicas con alto contenido en fósforo no de fitato se caracterizan también por niveles de fitato reducidos, se usa en siguiente método para cuantificar el nivel de ácido fítico en una muestra ensayada.

60 La muestra se tritura, se coloca en un tubo de centrifuga de plástico cónico y se trata con ácido clorhídrico. Se homogeneiza con polytron y se extrae a temperatura ambiente con agitación en vórtice. La muestra extraída se coloca en una centrifuga clínica a 2500 rpm durante 15 minutos. Se retiran 2,5 ml del sobrenadante y se añaden a 25 ml de agua. La muestra se lava a través de una columna SAX[®]. La columna se lava con HCl, se eluye y se evapora a sequedad. La muestra seca se resuspende en agua y se filtra a través de un filtro de punta de jeringa de 0,45 μm a un vial. Se preparan de 10 a 20 μl de muestra para inyectar en una columna de HPLC.

65 El disolvente de elución se prepara mezclando 515 ml de etanol, 485 ml de agua destilada doble, 8 ml de hidróxido de tetrabutil amonio al 40% (TBAH), 200 microlitros de ácido sulfúrico 10 N, (5 M), 0,5 ml de ácido fórmico y 1-3 mg de ácido fítico. El ácido fítico se prepara colocando 16 mg de fitato sódico en 5 ml de agua. Esta solución se coloca

ES 2 296 337 T3

5 en una resina de intercambio iónico Dowex (1 ml de forma ácida Dowex-50 en lana de vidrio en una punta de pipeta de 5 ml). Esto se aclara con 1-2 ml de agua y el filtrado se añade a 10 ml de agua. La concentración es 1 mg/ml de ácido fítico. Se usan 2 ml para 1 litro de disolvente. El pH del disolvente se ajusta a 4,10 +/- 0,05 con ácido sulfúrico 10 N. La cromatografía se realiza bombeando la muestra a través de una columna de HPLC de fase inversa Hamilton PRP-1 calentada a 40°C a un caudal de 1 ml por minuto. La detección del fosfato de inositol se realiza con un detector del índice de refracción (Waters), que se autocalibra al menos dos (2) minutos antes de cada paso.

10 Las plantas transgénicas con alto contenido en fósforo confirmadas se ensayan de esta manera. Algunas, aunque no todas de las plantas mutantes evaluadas de esta manera se confirman como de bajo contenido en fitato.

10 *Descripción de las secuencias*

SEC ID Nº: 1	ADNc DE FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA
15 SEC ID Nº: 2	POLIPÉPTIDO DE FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA
SEC ID Nº: 3	CEBADOR DE FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA
20 SEC ID Nº: 4	CEBADOR DE FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA
SEC ID Nº: 5	ADNc DE MIO-INOSITOL 1,3,4-TRIFOSFATO 5/6-QUINASA
SEC ID Nº: 6	POLIPÉPTIDO DE MIO-INOSITOL 1,3,4-TRIFOSFATO 5/6-QUINASA
25 SEC ID Nº: 7	MIO-INOSITOL 1,3,4-TRIFOSFATO 5/6-QUINASA GENÉRICO
SEC ID Nº: 8	CEBADOR DE MIO-INOSITOL 1,3,4-TRIFOSFATO 5/6-QUINASA
30 SEC ID Nº: 9	CEBADOR DE MIO-INOSITOL 1,3,4-TRIFOSFATO 5/6-QUINASA
SEC ID Nº: 10	ADNc DE MIO-INOSITOL 1-FOSFATO SINTASA
SEC ID Nº: 11	POLIPÉPTIDO DE MIO-INOSITOL 1-FOSFATO SINTASA
35 SEC ID Nº: 12	CEBADOR DE MIO-INOSITOL 1-FOSFATO SINTASA
SEC ID Nº: 13	CEBADOR DE MIO-INOSITOL 1-FOSFATO SINTASA
40 SEC ID Nº: 14	MIO-INOSITOL 1-FOSFATO SINTASA GENÓMICO
SEC ID Nº: 15	MIO-INOSITOL 1-FOSFATO SINTASA GENÓMICO
45 SEC ID Nº: 16	ADNc DE MIO-INOSITOL MONOFOSFATO-3
SEC ID Nº: 17	POLIPÉPTIDO DE MIO-INOSITOL MONOFOSFATO-3
SEC ID Nº: 18	CEBADOR DE MIO-INOSITOL MONOFOSFATO-3
50 SEC ID Nº: 19	CEBADOR DE MIO-INOSITOL MONOFOSFATO-3.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad de *mio*-inositol 1-fosfato sintasa y que comprende:
- a) una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11; o un complemento de la misma;
 - 10 b) una secuencia de polinucleótidos que tiene una secuencia de un ácido nucleico amplificada a partir de una biblioteca de ácido nucleico de *Zea mays* usando los cebadores de la SEC ID N°: 12-13;
 - 15 c) un polinucleótido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 10, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se basa en toda la región codificante y se determina mediante el programa GAP donde la penalización de creación de hueco = 50 y la penalización de extensión de hueco = 3;
 - 20 d) una secuencia de polinucleótidos que codifica un fragmento de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, teniendo el fragmento una delección de 1 a 10 aminoácidos;
- o un complemento de (a) o (c).
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido es ADN o ARN.
- 25 3. Un polinucleótido de ADN de la reivindicación 2, que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 10 o un complemento de la misma.
4. Un polinucleótido aislado de maíz que codifica *mio*-inositol 1-fosfato sintasa.
- 30 5. Un vector que comprende la secuencia de ADN de la reivindicación 2.
6. Una casete de expresión que comprende un polinucleótido de la reivindicación 1 unido de forma operativa a un promotor.
- 35 7. Una casete de expresión de la reivindicación 6, en la que el ácido nucleico se une de forma operativa en orientación antisentido al promotor.
8. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 5.
- 40 9. Un proceso para producir un polipéptido de *mio*-inositol 1-fosfato sintasa que comprende: cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 8 en condiciones suficientes para la expresión del polipéptido codificado por la célula hospedadora y recuperar el polipéptido producido de este modo.
- 45 10. Un proceso para producir una célula que expresa un polipéptido de *mio*-inositol 1-fosfato sintasa que comprende transformar o transfectar la célula con el vector de la reivindicación 5 de modo que la célula exprese el polipéptido codificado por el ADNc contenido en el vector.
- 50 11. Un polipéptido aislado que tiene actividad de *mio*-inositol 1-fosfato sintasa y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 11, en el que el % de identidad de secuencia se basa en toda la secuencia y se determina mediante el programa GAP donde la penalización de la creación de hueco = 12 y la penalización de extensión de hueco = 4.
- 55 12. Un polipéptido aislado de la reivindicación 11 que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 11 y un peso molecular deducido de aproximadamente 59,7 kDa.
13. Un polipéptido aislado de la reivindicación 12 que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11.
14. Una planta o célula vegetal transgénica transformada con el ADN de la reivindicación 2, o una semilla transgénica producida por dicha planta.
- 60 15. Una planta de acuerdo con la reivindicación 14 que tiene un nivel reducido de ácido fítico; o un nivel aumentado de fósforo no de ácido fítico; cuando se compara con una planta parental sin transformar.

ES 2 296 337 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.
- 5 <120> Genes que Controlan el Metabolismo del Fitato en Plantas y Usos de los Mismos
- <130> 0706
- 10 <150> 60/055.446
<151> 11-08-1997
- <150> 60/055.526
- 15 <151> 08-08-1997
- <150> 60/053.944
<151> 28-07-1997
- 20 <160> 19
- <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- 25 <210> 1
<211> 3252
<212> ADN
- 30 <213> *Zea mays*
- <220>
- 35 <221> CDS
<222> (258)...(2666)
- <400> 1
- 40
- ```
gtcgacccac gcgtccgctc gccgeggag tcacgcaacc gccgtctcct cgccggcacg 60
cttcgccgcc gccgcctctc tcctctctcgt ctcaaccgcc gcctgcacac gcagaaaagg 120
agggagaata agaggatcag caaaccccaa gccctccact cgtegccccc tgctgcaatc 180
gccccacccg cctccgcccg ccgccgcttc tcctcacctt cctctcccgc gacatctcag 240
ttcttcatca ccaaaag atg gtc ggc ggc ggc aac gag ttc cgt ttc ttc 290
 Met Val Gly Gly Gly Asn Glu Phe Arg Phe Phe
 1 5 10
```
- 45
- ```
ttg tcc tgc gac atc agc cac ccg ctt gcc ttc cgt gtt ctc cac gca      338
Leu Ser Cys Asp Ile Ser His Pro Leu Ala Phe Arg Val Leu His Ala
                               15           20           25
```
- 50
- ```
gaa cat atc ttg ttg acc gac caa aaa gtc cca gag ctc ttt gtt gag 386
Glu His Ile Leu Leu Thr Asp Gln Lys Val Pro Glu Leu Phe Val Glu
 30 35 40
```
- 55
- 60
- 65







ES 2 296 337 T3

cgg ttg gat ctg gac gac gag gag gct ata cat ttc ttc cag gat ctt 2594  
 Arg Leu Asp Leu Asp Asp Glu Glu Ala Ile His Phe Phe Gln Asp Leu  
 765 770 775

5 atc aac gat agc gtg agt gct ctg ttc cct caa atg gtt gag acc atc 2642  
 Ile Asn Asp Ser Val Ser Ala Leu Phe Pro Gln Met Val Glu Thr Ile  
 780 785 790 795

10 cat aga tgg gct caa tat tgg cgg taacacaagc taatgtcgtg gaagcaagtg 2696  
 His Arg Trp Ala Gln Tyr Trp Arg  
 800

15 tgaatctgta catgctgact gtcacaagcc acggtattaa gcgagaaacg acacttgatg 2756  
 gatggaagct taggcgctta gcatttgggg ttcaagctgc nccgcactcg cgaattgatt 2816  
 gggtgatgc agggcatggg caatcttctt cgtgccggtg acaccagga attcgggttg 2876  
 tcagttgtca cttgtgatag tagaattccg tcacgcactg ctgtagacct atgggcattc 2936  
 gtcagatgta tatatgcgtt aatgtataaa atcaacttca gtagcaaat tgtgaatacc 2996  
 ggaatacgtg atggtttagg qcctgtttgt ttaccccatg gattatataa tctggattat 3056  
 ttttgaggga ttatataatc tggattatat aatctqaqta gttctgtttg tttaccaga 3116  
 ttatttgagt tgttaatagg attcttttgt atgaggaaga caagaatgcc ctctatatt 3176  
 gtactaggtt gaaactcau latgagatga acaatgtaac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3236  
 aaaaaaaggg cggccg 3252

<210> 2

<211> 803

25 <212> PTR

<213> *Zea mays*

<400> 2

30

Met Val Gly Gly Gly Asn Glu Phe Arg Phe Phe Leu Ser Cys Asp Ile  
 1 5 10 15  
 Ser His Pro Leu Ala Phe Arg Val Leu His Ala Glu His Ile Leu Leu  
 20 25 30  
 35 Thr Asp Gln Lys Val Pro Glu Leu Phe Val Glu Cys Lys Leu Tyr Ile  
 35 40 45  
 Asp Gly Ile Gln Phe Gly Leu Pro Val Lys Thr Arg Leu Glu Pro Ser  
 50 55 60  
 40 Gly Pro Lys Tyr Cys Trp Asn Glu Leu Ile Thr Leu Ser Thr Lys Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Asp Leu Thr Ser Leu Ser Gln Leu Ala Phe Thr Val Trp Asp Val  
 85 90 95  
 Ser Ser Gly Glu Asn Pro Glu Val Val Gly Ala Thr Ile Phe Leu  
 100 105 110  
 45 Phe Asn Ser Lys Arg Gln Leu Lys Thr Gly Arg Gln Lys Leu Arg Leu  
 115 120 125  
 Trp Pro Thr Lys Glu Ala Asp Gly Gly Val Pro Thr Thr Thr Pro Gly  
 130 135 140  
 Lys Val Pro Arg Asn Glu Arg Gly Glu Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu  
 145 150 155 160  
 50 Val Asn Lys Tyr Glu Arg Gly Gln Ile Gln His Val Asp Trp Leu Asp  
 165 170 175  
 Arg Leu Ala Phe Ser Ala Met Asp Lys Ala Met Glu Lys Glu Cys Glu  
 180 185 190  
 Arg Lys Ala Asn Leu Tyr Pro Ser Leu Val Val Glu Leu Cys Ser Phe  
 195 200 205  
 55 Glu His Arg Ile Val Phe Gln Glu Ser Gly Ala Asn Phe Tyr Thr Pro  
 210 215 220  
 Ala Pro Val Ser Leu Ser Asn Glu Leu Val Thr Val Trp Asp Pro Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Arg Thr Asn Pro Ser Glu His Lys Gln Leu Lys Leu Ala Lys  
 245 250 255

60

65

ES 2 296 337 T3

Ser Leu Thr Arg Gly Ile Val Asp Arg Asp Leu Lys Pro Ser Ser Asn  
 260 265 270  
 Glu Arg Lys Leu Leu Gln Thr Ile Ile Lys Phe Pro Pro Thr Arg Thr  
 275 280 285  
 5 Leu Glu Val Asp Glu Lys Gln Leu Val Trp Lys Phe Arg Phe Ser Leu  
 290 295 300  
 Met Ser Glu Lys Lys Ala Leu Thr Lys Phe Val Arg Ser Val Asp Trp  
 305 310 315 320  
 Ser Asp Asn Gln Glu Ala Lys Gln Ala Val Glu Leu Ile Gly Lys Trp  
 325 330 335  
 10 Glu Met Ile Asp Val Ala Asp Ala Leu Glu Leu Leu Ser Pro Asp Phe  
 340 345 350  
 Glu Ser Asp Glu Val Arg Gly Tyr Ala Val Ser Val Leu Glu Arg Ala  
 355 360 365  
 Asp Asp Glu Glu Leu Gln Cys Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Ala Leu  
 370 375 380  
 15 Arg Phe Glu Arg Ser Asp Lys Ser Arg Leu Ala Leu Phe Leu Val Asn  
 385 390 395 400  
 Arg Ala Leu Ser Asn Ile Glu Ile Ala Ser Phe Leu Arg Trp Tyr Ile  
 405 410 415  
 Leu Val Glu Leu His Ser Pro Ala Tyr Ala Arg Arg Tyr Tyr Gly Thr  
 420 425 430  
 20 Tyr Asp Met Leu Glu Asn Ser Met Met Lys Leu Val Gly Arg Glu Asp  
 435 440 445  
 Gly Asp Glu Asp Gly Phe Arg Leu Trp Gln Ser Leu Thr Arg Gln Thr  
 450 455 460  
 Asp Leu Thr Ala Gln Leu Cys Ser Ile Met Lys Asp Val Arg Asn Val  
 465 470 475 480  
 25 Arg Gly Ser Ala Gln Lys Lys Ile Glu Lys Leu Arg Gln Leu Leu Ser  
 485 490 495  
 Gly Val Phe Ser Glu Leu Thr Asn Phe Asp Glu Pro Ile Arg Ser Pro  
 500 505 510  
 Leu Ala Pro Thr Leu Leu Leu Thr Gly Val Val Pro Gln Glu Ser Ser  
 515 520 525  
 30 Ile Phe Lys Ser Ala Leu Asn Pro Leu Arg Leu Thr Phe Lys Thr Ala  
 530 535 540  
 Asn Gly Gly Thr Ser Lys Ile Ile Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Leu Arg  
 545 550 555 560  
 35 Gln Asp Gln Leu Val Ile Gln Thr Val Ser Leu Met Asp Arg Leu Leu  
 565 570 575  
 Lys Leu Glu Asn Leu Asp Leu His Leu Thr Pro Tyr Arg Val Leu Ala  
 580 585 590  
 Thr Gly Gln Asp Glu Gly Met Leu Glu Phe Ile Ser Ser Ser Ser Leu  
 595 600 605  
 40 Ala Gln Ile Leu Ser Glu His Arg Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Gln Lys  
 610 615 620  
 Phe His Xaa Asp Glu Asp Gly Pro Phe Gly Ile Thr Ala Gln Cys Leu  
 625 630 635 640  
 Glu Thr Phe Ile Lys Ser Cys Ala Gly Tyr Ser Val Ile Thr Tyr Ile  
 645 650 655  
 45 Leu Gly Val Gly Asp Arg His Leu Asp Asn Leu Leu Leu Thr Asp Asp  
 660 665 670  
 Gly Arg Leu Phe His Val Asp Phe Ala Phe Ile Leu Gly Arg Asp Pro  
 675 680 685  
 Lys Pro Phe Pro Pro Pro Met Lys Leu Cys Lys Glu Met Val Glu Ala  
 690 695 700  
 50 Met Gly Gly Ala Glu Ser Gln Tyr Tyr Thr Arg Phe Lys Ser Tyr Cys  
 705 710 715 720  
 Cys Glu Ala Tyr Asn Ile Leu Arg Lys Ser Ser Ser Leu Ile Leu Asn  
 725 730 735  
 Leu Phe Lys Leu Met Glu Arg Ser Gly Ile Pro Asp Ile Ser Ala Asp  
 740 745 750  
 55  
 Glu Ser Gly Gly Leu Lys Leu Gln Glu Lys Phe Arg Leu Asp Leu Asp  
 755 760 765  
 Asp Glu Glu Ala Ile His Phe Gln Asp Leu Ile Asn Asp Ser Val  
 770 775 780  
 60 Ser Ala Leu Phe Pro Gln Met Val Glu Thr Ile His Arg Trp Ala Gln  
 785 790 795 800  
 Tyr Trp Arg

<210> 3

65 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

# ES 2 296 337 T3

```

<220>
<223> cebador

5 <400> 3

 ccgcttctcc tcacctctct ct

10 <210> 4
 <211> 22
 <212>ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400>4

 tggcttgatga cagtcagcat gt

25 <210> 5
 <211> 1428
 <212> ADN
 <213> Zea mays

30 <220>

 <221> CDS
35 <222> (118)...(1176)

 <400> 5

40 cccgggtcga cccacgcgtc cgggtgcccg cccgcacaca ccacctgtcc ccgctccgct 60
 ccgctccgcg ttccttcttc tcggctgcgcg ctactggcct tcgctcggtc cgcgcg atg 120
 Met
 1

45 gtg tct ggc ggg tgc gtg ggg acg gag ggg gag gcg gac cgc gcg gcg 168
 Val Ser Gly Gly Cys Val Gly Thr Glu Gly Glu Ala Asp Arg Ala Ala
 5 10 15

50 gcg cct ccg gag gcc gcg gag gag ccg gtg gtg ccg gcg cct ccc gcg 216
 Ala Pro Pro Glu Ala Ala Glu Glu Pro Val Val Pro Ala Pro Pro Ala
 20 25 30

55 cgg gag gtc gtg gtg ggg tac gcg ctc acg acg aag aag gcc aag agc 264
 Arg Glu Val Val Val Gly Tyr Ala Leu Thr Thr Lys Lys Ala Lys Ser
 35 40 45

60 ttc ctc cag ccc aag ctc cgg ggg ctc gcc agg aaa aag gga atc ttg 312
 Phe Leu Gln Pro Lys Leu Arg Gly Leu Ala Arg Lys Lys Gly Ile Leu
 50 55 60 65

65

```

ES 2 296 337 T3

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | ttt gtt gct att gat cag aaa cgt cca ttg tct gat caa ggt cca ttt | 360  |
|    | Phe Val Ala Ile Asp Gln Lys Arg Pro Leu Ser Asp Gln Gly Pro Phe |      |
|    | 70 75 80                                                        |      |
| 5  | gac att gtt ctt cat aag ttg act gga aag ggg tgg cag caa ttg ctg | 408  |
|    | Asp Ile Val Leu His Lys Leu Thr Gly Lys Gly Trp Gln Gln Leu Leu |      |
|    | 85 90 95                                                        |      |
| 10 | gag gaa tat agg gag gct cac cca gaa gtt act gtt ctt gat cca cct | 456  |
|    | Glu Glu Tyr Arg Glu Ala His Pro Glu Val Thr Val Leu Asp Pro Pro |      |
|    | 100 105 110                                                     |      |
| 15 | ggc gca ata gca aac ttg cta gat cgc caa tct atg ctt caa gaa gta | 504  |
|    | Gly Ala Ile Ala Asn Leu Leu Asp Arg Gln Ser Met Leu Gln Glu Val |      |
|    | 115 120 125                                                     |      |
| 20 | tct gaa ttg gac tca ccg art grc atg ttc tct tct gca ggt aaa gta | 552  |
|    | Ser Glu Leu Asp Ser Pro Ile Val Met Phe Ser Ser Ala Gly Lys Val |      |
|    | 130 135 140 145                                                 |      |
| 25 | cgc gtg cct aaa cag cta ttc att aat act gat ccc tca tca ata cca | 600  |
|    | Arg Val Pro Lys Gln Leu Phe Ile Asn Thr Asp Pro Ser Ser Ile Pro |      |
|    | 150 155 160                                                     |      |
| 30 | gct gca gtt agg agg gcg ggt ctc tct ctc cca ttg gtg gca aaa ccc | 648  |
|    | Ala Ala Val Arg Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Val Ala Lys Pro |      |
|    | 165 170 175                                                     |      |
| 35 | ttg qtq qcq aag tcc cat qag cta tcc ctq qct tat gat cca act tca | 696  |
|    | Leu Val Ala Lys Ser His Glu Leu Ser Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Ser |      |
|    | 180 185 190                                                     |      |
| 40 | ctg acc aaa ctt gag ccc cct tta gtt ctt cag gaa ttt gtt aac cat | 744  |
|    | Leu Thr Lys Leu Glu Pro Pro Leu Val Leu Gln Glu Phe Val Asn His |      |
|    | 195 200 205                                                     |      |
| 45 | gtt ggt gtc atg ttc aag gtg tac att gtt ggg gat gca ata agg gtt | 792  |
|    | Val Gly Val Met Phe Lys Val Tyr Ile Val Gly Asp Ala Ile Arg Val |      |
|    | 210 215 220 225                                                 |      |
| 50 | gta cgt cgg ttt tca ctt cca aat gtt gat gaa ggt gat ctg tcg aat | 840  |
|    | Val Arg Arg Phe Ser Leu Pro Asn Val Asp Glu Gly Asp Leu Ser Asn |      |
|    | 230 235 240                                                     |      |
| 55 | aat gct ggg gta ttt cgg ttt cca agg gtc tct tgt gct gca gcc agc | 888  |
|    | Asn Ala Gly Val Phe Arg Phe Pro Arg Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser |      |
|    | 245 250 255                                                     |      |
| 60 | gca gat gat gca gat ctt gac cct ggt gtt gct gaa ctt cct ccg aga | 936  |
|    | Ala Asp Asp Ala Asp Leu Asp Pro Gly Val Ala Glu Leu Pro Pro Arg |      |
|    | 260 265 270                                                     |      |
| 65 | cca ttg ctt gag atc ttg gca cga gag ctg cgg cga cga ctg ggt ctt | 984  |
|    | Pro Leu Leu Glu Ile Leu Ala Arg Glu Leu Arg Arg Arg Leu Gly Leu |      |
|    | 275 280 285                                                     |      |
| 70 | aga cta ttc aac att gat atg att agg gag cac gga aca aga gac cgg | 1032 |
|    | Arg Leu Phe Asn Ile Asp Met Ile Arg Glu His Gly Thr Arg Asp Arg |      |
|    | 290 295 300 305                                                 |      |



## ES 2 296 337 T3

<210> 7

<211> 1059

<212> ADN

5 <213> *Zea mays*

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (1)...(1059)

<223> n = cualquier base; n, y, r, h son como se muestran en WIPO Standard ST.25 (1998), Apéndice 2, Tabla 1

<400> 7

15

|    |             |             |             |             |             |            |      |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
|    | atggtntcng  | gnggntgygt  | nggnacngar  | gnggargctng | aycngcngc   | ngcncncnc  | 60   |
|    | gargcngcng  | argarcngt   | ngtnccngcn  | ccncncngcnc | gngargtngt  | ngtnggntay | 120  |
|    | gcncnacna   | cnaaraargc  | naartcntty  | ctngarcna   | arctncngng  | nctngcncgn | 180  |
| 20 | aaraarggna  | thctnttygt  | ngcnathgay  | caraarcgnc  | cncntcnga   | ycarggnccn | 240  |
|    | ttygayathg  | tnctncayaa  | rcnacnggn   | aarggntggc  | arcarcctnct | ngargartay | 300  |
|    | cnggargcnc  | ayccngargt  | naengtnctn  | gayccncng   | gngcnathgc  | naayctnctn | 360  |
|    | gaycgncart  | cnatgctnca  | rggngtntcn  | garctngayt  | cnccnathgt  | natgttyten | 420  |
|    | tcngcnggna  | argtnccngt  | nccnaarcar  | ctnttyatha  | ayacngaycc  | ntcntcnath | 480  |
|    | ccngcngcng  | tnccngcngc  | nggncntnctn | ctnccnctng  | tngcnaarcc  | nctngtngcn | 540  |
| 25 | aartencayg  | arctntcnct  | ngcntaygay  | ccnactcnc   | tnacnaarct  | ngarccncn  | 600  |
|    | ctngtncctnc | argarttygt  | naaycaygtn  | gnggtnatgt  | tyaargtnta  | yathgtnggn | 660  |
|    | gaygcnahtc  | gngtngtncg  | ncgnttyten  | ctnccnaayg  | tngaygargg  | ngayctntcn | 720  |
|    | aayaaycng   | gngnttycg   | nttyccncgn  | gtntctgyg   | cngcngctc   | ngcngaygay | 780  |
|    | gcngayctng  | ayccnggngt  | ngcngarctn  | ccncncngcnc | cncntctnga  | rathctngcn | 840  |
|    | cnggarctnc  | gncgncgnc   | nggncctncgn | ctnttyaaya  | thgayatgat  | hcgngarcay | 900  |
| 30 | ggnacncng   | aycgnnttyta | ygtnathgay  | atgaaytayt  | tyccnggnta  | yggnaaratg | 960  |
|    | ccnggntayg  | arcaygtntt  | yacngaytty  | ctnctntcnc  | tngcncaraa  | rgartayaar | 1020 |
|    | cngcngcnc   | cntayctntc  | nctngcncn   | gnggarggn   |             |            | 1059 |

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> cebador

45

<400> 8

ttctcctcgt cgccgctact gg

50

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> cebador

60

<400> 9

agcatgaaca gttagcacct

65

<210> 10

<211> 1931

<212> ADN

ES 2 296 337 T3

<213> *Zea mays*

<400> 10

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35

```

ggcagagca ggcgctcct tctctctctc actctctctc ggcctgcct cgctacctcg 60
cttcgcatte cattcgaaaa gaggggagga aaggcaagat gttcctcgag agcttccgag 120
tcgagagccc ccacgtgagg tacggcccga tggagatcga gtcggagtac cggtagcaca 180
cgacggagct ggtacacgag ggcaaggacg gcgcctcacg ctgggtcgtc cgccccaggt 240
ccgtcaagta caactccgg accagaacog ccgtcccaa gctcgggggt atgcttgggt 300
ggtggggagg caacaacggg tccacgctga cggctgggtt cattgccaac agggagggga 360
tctcatgggc gaccaaggac aaggtgcagc aagccaacta ctacggctcc ctcaccacg 420
cctccaccat cagagtcggc agctacaacg gggaggagat ctatgcgccc ttcaagagcc 480
tccttccccat agtgaaccca gacgacattg tgttcggagg ctgggacatt agcaacatga 540
acctggccga ctccatgacc agggccaagg tgcctggatat tgacctgcag aagcagctca 600
ggccctacat ggagtcctat gtgccacttc ccggtatcta tgatccggac ttcctcggg 660
ctaaccaggg ctctcgcgcc aacagtgtca tcaagggcac caagaaaga caggtggagc 720
agatcatcaa qgatatcaqg qagtttaagg aqaagaaca agtggaacag atagttgtgt 780
tgtggactgc aaacactgaa aggtatagca atgtgtgcgc tggctcaac gacacgatgg 840
agaatctact ggcatctgtg gacaagaacg aagcggaggt atcaccatca acctatattg 900
ccattgcctg tgtcatgaa ggggtgccgt tcatcaatgg gagccccag aacacctttg 960
tgctggggt gattgatctt gctataaaaa acaactgctt gattgggtgt gacgacttca 1020
agagtgagca gaccaagatg aamtctgtct tggctgattt ccttgttggg gctggaataa 1080
agcccacctc aatcgtgagc tacaaccact tgggaaacaa cgatggcatg aacctgtctg 1140
cccccaaac attcaggctc aaggagatct ccaagagcaa cgtggggat gacatggtct 1200
cgagcaatgc catctctat gagcccggcg agcatccga tcatgtcgtt gtcataaagt 1260
atgtgccgta cgtgggagac agcaagaggg ctatggacga gtacacctca gagatcttca 1320
tgggcggcaa gaacaccatc gtgctgcaca acacctgtga ggactcgtc ctcccgccac 1380
ctatcatcct tgatctgggt ctcttggctg agctcagcac caggatccag ctgaaagctg 1440
agggagagga caaatccac tccctccacc cgtggccac catcttgagt tacttacca 1500
aggcacccct ggttccccct ggcaaccggg tggtagaacg tctggccaag cagagggcqa 1560
tgctggagaa catcatgagg gcctgcgttg gctggcccc agagaacaac atgatcttgg 1620
aylacaagtg ayccaagtgg cgtgccctgc agcggaggt tagctgctg aagggactc 1680
qaaaqccqag attagctgtg ggattgtgtt gggcttctc tgtttcttt tgcgttcttt 1740
cctagtcatt gctgttgcgc ttttgtattt gtcggaccgg taactaccag ggctctgcta 1800
ttagcggcac ggagcctgta attgtattgt atgataatgt gatcgggggt gctacttccc 1860
ctcggcattc ctagtgttgg ttaaaagtcg ttcgacagca acctatcgac ccaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaa a 1931

```

<210> 11

<211> 510

<212> PRT

<213> *Zea mays*

<400> 11

45  
 50  
 55  
 60  
 65

```

Met Phe Ile Glu Ser Phe Arg Val Glu Ser Pro His Val Arg Tyr Gly
 1 5 10 15
Pro Met Glu Ile Glu Ser Glu Tyr Arg Tyr Asp Thr Thr Glu Leu Val
 20 25 30
His Glu Gly Lys Asp Gly Ala Ser Arg Trp Val Val Arg Pro Lys Ser
 35 40 45
Val Lys Tyr Asn Phe Arg Thr Arg Thr Ala Val Pro Lys Leu Gly Val
 50 55 60
Met Leu Val Gly Trp Gly Gly Asn Asn Gly Ser Thr Leu Thr Ala Gly
 65 70 75 80
Val Ile Ala Asn Arg Glu Gly Ile Ser Trp Ala Thr Lys Asp Lys Val
 85 90 95
Gln Gln Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Leu Thr His Ala Ser Thr Ile Arg
 100 105 110
Val Gly Ser Tyr Asn Gly Glu Glu Ile Tyr Ala Pro Phe Lys Ser Leu
 115 120 125

```

ES 2 296 337 T3

5 Leu Pro Ile Val Asn Pro Asp Asp Ile Val Phe Gly Gly Trp Asp Ile  
 130 135 140  
 Ser Asn Met Asn Leu Ala Asp Ser Met Thr Arg Ala Lys Val Leu Asp  
 145 150 155 160  
 10 Ile Asp Leu Gln Lys Gln Leu Arg Pro Tyr Met Glu Ser Met Val Pro  
 165 170 175  
 Leu Pro Gly Ile Tyr Asp Pro Asp Phe Ile Ala Ala Asn Gln Gly Ser  
 180 185 190  
 Arg Ala Asn Ser Val Ile Lys Gly Thr Lys Lys Glu Gln Val Glu Gln  
 195 200 205  
 15 Ile Ile Lys Asp Ile Arg Glu Phe Lys Glu Lys Asn Lys Val Asp Lys  
 210 215 220  
 Ile Val Val Leu Trp Thr Ala Asn Thr Glu Arg Tyr Ser Asn Val Cys  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Leu Asn Asp Thr Met Glu Asn Leu Leu Ala Ser Val Asp Lys  
 245 250 255  
 20 Asn Glu Ala Glu Val Ser Pro Ser Thr Leu Tyr Ala Ile Ala Cys Val  
 260 265 270  
 Met Glu Gly Val Pro Phe Ile Asn Gly Ser Pro Gln Asn Thr Phe Val  
 275 280 285  
 Pro Gly Leu Ile Asp Leu Ala Ile Lys Asn Asn Cys Leu Ile Gly Gly  
 290 295 300  
 25 Asp Asp Phe Lys Ser Gly Gln Thr Lys Met Lys Ser Val Leu Val Asp  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Val Gly Ala Gly Ile Lys Pro Thr Ser Ile Val Ser Tyr Asn  
 325 330 335  
 His Leu Gly Asn Asn Asp Gly Met Asn Leu Ser Ala Pro Gln Thr Phe  
 340 345 350  
 30 Arg Ser Lys Glu Ile Ser Lys Ser Asn Val Val Asp Asp Met Val Ser  
 355 360 365  
 Ser Asn Ala Ile Leu Tyr Glu Pro Gly Glu His Pro Asp His Val Val  
 370 375 380  
 Val Ile Lys Tyr Val Pro Tyr Val Gly Asp Ser Lys Arg Ala Met Asp  
 385 390 395 400  
 Glu Tyr Thr Ser Glu Ile Phe Met Gly Gly Lys Asn Thr Ile Val Leu  
 405 410 415  
 His Asn Thr Cys Glu Asp Ser Leu Leu Ala Ala Pro Ile Ile Leu Asp  
 420 425 430  
 35 Leu Val Leu Leu Ala Glu Leu Ser Thr Arg Ile Gln Leu Lys Ala Glu  
 435 440 445  
 Gly Glu Asp Lys Phe His Ser Phe His Pro Val Ala Thr Ile Leu Ser  
 450 455 460  
 Tyr Phe Thr Lys Ala Pro Leu Val Pro Pro Gly Thr Pro Val Val Asn  
 465 470 475 480  
 40 Ala Leu Ala Lys Gln Arg Ala Met Leu Glu Asn Ile Met Arg Ala Cys  
 485 490 495  
 Val Gly Leu Ala Pro Glu Asn Asn Met Ile Leu Glu Tyr Lys  
 500 505 510

<210> 12

45 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> cebador

<400> 12

55

ctcgctacct cgcttcgcat tcatt

<210> 13

60 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> cebador

ES 2 296 337 T3

<400> 13

acgccacttg gctcacttgt actcca

5

<210> 14

<211> 3546

<212> ADN

10 <213> *Zea mays*

<400> 14

|    |             |             |             |             |             |             |      |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| 15 | ctcgctacct  | cgcttcgcat  | tccattcgag  | gagagcggtg  | agaggggagg  | aaaggcaaga  | 60   |
|    | tgftcatrga  | gagcttccgc  | gtcggagagc  | cccacgtgog  | gtacgggccc  | acgggagatcg | 120  |
|    | agtcggagta  | ccggtaacgac | acgacggagc  | tggtacacga  | gggcaaggac  | ggcgcctcac  | 180  |
|    | gctgggtcgt  | ccgccccaaq  | tccgtcaagt  | acaacttccg  | gaccagaacc  | gccgtcccca  | 240  |
|    | agctcgggta  | tgtaacggatg | caagcggcct  | agcctcactc  | tctgtgaacc  | ctcctcctcc  | 300  |
|    | cgtgctcagt  | caaatctctc  | gtcggatca   | actggtegge  | gtctcctcct  | aaatectaet  | 360  |
| 20 | gaaaaactta  | ctgctttgcc  | tgaagacgaa  | ccgtcgtaat  | tgttgacagc  | tacgcacaca  | 420  |
|    | cttgcccatc  | cggtatcgctc | aaatcagctc  | gatttgaat   | tcgattcgat  | ggtgcccttt  | 480  |
|    | tccataatctc | gatcatctct  | cgctactgt   | gcaatgatta  | cagaaacgtc  | cttttctct   | 540  |
|    | gaactttgtc  | ttaggctttt  | tgctctgtgc  | acgtgagctg  | gtatcaatt   | gttcatgtaa  | 600  |
|    | gatcaaatcc  | cagcagggac  | gatgagcagc  | agacagaact  | cattacacta  | gcaaatgat   | 660  |
|    | actaggatta  | ctggcaagt   | tgcatacggc  | gcaatctgce  | atectggacc  | ccctttgttt  | 720  |
| 25 | aatlccgtgt  | cctatgcatg  | tlgcttacyt  | gcagctcgtt  | gtgtgttatg  | gtgtcaggct  | 780  |
|    | gtcagccgct  | tgctctgtgc  | cgacggatga  | tqccaacttt  | tctgttctgg  | tggtgcaggg  | 840  |
|    | tgatgcttgt  | ggggtgggga  | ggcaacaacg  | ggtccacgct  | gaeggctggg  | gtcattgcca  | 900  |
|    | acagggagtg  | agtagtactt  | aatttgtcct  | atatgtcttt  | ccgttgtttt  | cagttattaa  | 960  |
|    | tqccctaaca  | gagaactgaa  | ttttgttgtt  | ggttqtttca  | gggatctca   | tgcccgacca  | 1020 |
|    | aggacaaggt  | gcagcaagcc  | aactactacg  | gtctctcacc  | caggcctcca  | ccatcagagt  | 1080 |
| 30 | cggcagctac  | aacggggagg  | agatctatgc  | gcccgttcaag | agcctccttc  | ccatggtaat  | 1140 |
|    | ctattataga  | cttgactaat  | actcttcttt  | ttactgaaac  | caaacataca  | taacaaagca  | 1200 |
|    | tattccgtaa  | gggtctagtt  | gatgttataa  | aatgaaacctg | tctttcagge  | cagtgtcttc  | 1260 |
|    | aagtaaacgg  | aatgttaatc  | attgggttga  | aaaaacaanq  | gttctaattt  | tgtgaaagga  | 1320 |
|    | aagttaaac   | tagcataatg  | aaaaggggaa  | gcactgtaag  | aaagggtgctg | aaacaatcga  | 1380 |
| 35 | ctcggctctgc | catgtttgtg  | tcctacttgc  | aagtcaaaag  | gttctgtggt  | tagcccaag   | 1440 |
|    | gttccagcat  | ctttggatta  | cactcgtgca  | gtattgacga  | tggtgctaac  | tggttcgaga  | 1500 |
|    | ttcgcagact  | cggtgtttgt  | tatcttcttt  | tcattgacca  | gtgttaaac   | ggtttccagg  | 1560 |
|    | tgaacccaga  | cgacattgtg  | ttcggaggct  | gggacattag  | caacatgaac  | ctggccgact  | 1620 |
|    | ccatggaccg  | ggccaaggtg  | ctggatatg   | acctgcagaa  | gcagctcagg  | ccctacatgg  | 1680 |
|    | agtcctaggt  | gccacttccc  | cggtatctat  | gactcggact  | tcactcgggc  | taaccagggc  | 1740 |
| 40 | tctcgcgcca  | acagtgtcat  | caagggcacc  | aagaagaac   | aggtggagca  | gatcatcaag  | 1800 |
|    | gatatacaggt | atatggatat  | ggatgtcaac  | gtgcttgggt  | gctaagggtgc | accagtgca   | 1860 |
|    | acctaaaaca  | aataaact    | actatgaatt  | tggtaaatat  | acatacatat  | cagagcatat  | 1920 |
|    | tgtttaaccg  | gtgcacttag  | gagctctgcat | ggtatgttgg  | acaatttgac  | attcगतata   | 1980 |
|    | cagtgaccgc  | tcacttgcac  | gaggactcca  | caaagaacta  | aaactactga  | aagcttaagc  | 2040 |
|    | aaclaltcgt  | agctaataat  | gtatlttyly  | gacatggttt  | gaagatctag  | atlaacgtgg  | 2100 |
| 45 | ttgaagaaat  | atgggttact  | agtataagta  | atccattaca  | gaagcaatgg  | cttatgtagc  | 2160 |
|    | taatgaaaca  | gggagtttag  | ggagaagaac  | aaagtggaca  | agatagttgt  | gttgtggact  | 2220 |
|    | gcaaacactg  | aaaggtatag  | caatgtgtgc  | gctggcttca  | acgacacgat  | ggagaatcta  | 2280 |
|    | ctggcatctg  | tggacaagaa  | cgaggcggag  | gtatcaccat  | caacactata  | tgccattgcc  | 2340 |
|    | tggtctcag   | aggggggtgce | gttcatcaat  | gggagceccc  | agaaacett   | tgtgectggt  | 2400 |
|    | gcgtggtttg  | gtgtgtttgc  | aaaagcctca  | tggtgttgca  | tttctgttcc  | aaagtttcat  | 2460 |
| 50 | gggtgttgtat | ttctgttcca  | aggettatta  | tacctgttgc  | atgttcgtag  | ggctgattga  | 2520 |
|    | tcttgcata   | aaaaaact    | gcttgattgg  | tggtgacgac  | ttcaagagtg  | gacagaccaa  | 2580 |
|    | gatgaaatct  | gtcttggtcg  | atcttcttgt  | tggtgctgga  | ataaagggtgg | gaacctagta  | 2640 |
|    | tctctcttct  | attaagatga  | agtgttttt   | tggcaaatga  | cgttattgca  | ataactcttc  | 2700 |
|    | tatattttca  | ttttcatgca  | gcccacctca  | atcgtgagct  | acaaccactt  | gggaaactaac | 2760 |
| 55 | galggcatga  | acctgtctgc  | cttcaaaaca  | tlcayylcca  | aggagatctc  | caagagcaac  | 2820 |
|    | gtgggtggatg | acatggcttc  | gagcaatgcc  | atcctctatg  | agcccggcga  | gcatcccgat  | 2880 |
|    | catgtcgttg  | tcatcaaggt  | ctgttagctg  | atctttcacc  | tcgttaaaag  | ttgacatag   | 2940 |
|    | caaggcagat  | ttacattgaa  | actttgcact  | ctttttgtgc  | agtatgtgcc  | gtacgtggga  | 3000 |
|    | gcagcaaga   | gggtctatgga | cgagtacacc  | tcagagatct  | tcattggcgg  | caagaacacc  | 3060 |
| 60 | atcgtgctgc  | acaaacacctg | tgaggactcg  | ctcctcggcg  | cacctatcat  | ccttgactctg | 3120 |
|    | gtgctcttgg  | ctgagctcag  | caccaggatc  | cagctgaaag  | ctgagggagg  | ggtaaagacc  | 3180 |
|    | ccccaaqta   | ttaacctgaa  | agcacgctgc  | acgctaggtg  | atatagcact  | tttaatacct  | 3240 |
|    | tctgtgtctc  | ctcttatgca  | ggacaaatcc  | cactccttcc  | accgggtggc  | caccatctctg | 3300 |
|    | agctacctca  | ccaaggcacc  | cttggttaagc | cttttctct   | gcatcccggc  | atcactgcac  | 3360 |
|    | tgcgttttgc  | ttcaatccag  | ccactgatcg  | tctctcttga  | aacctgaaca  | acaggttccc  | 3420 |
| 65 | cctggcacac  | cggtggtgaa  | cgctctggcc  | aagcagacgg  | cgatgctgga  | gaacatcatg  | 3480 |
|    | agggcctgcg  | ttgggctggc  | cccagagaac  | aacatgatcc  | tggagtacaa  | gtgagccaag  | 3540 |
|    | tggcgt      |             |             |             |             |             | 3546 |

ES 2 296 337 T3

<210> 15

<211> 3546

<212> ADN

5 <213> *Zea mays*

<400> 15

|    |             |              |             |             |             |             |      |
|----|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| 10 | ctcgctacct  | cgcttcgcat   | tccattcgag  | gagagcgggtg | agaggggagg  | aaaggcaaga  | 60   |
|    | tgttcatcga  | gagcttccgc   | gtcgagagcc  | cccacgtgcg  | gtacggcccg  | acggagatcg  | 120  |
|    | agtccggagta | ccggtagcagc  | acgacggagc  | tggtacacga  | gggcaaggac  | ggcgcctcac  | 180  |
|    | gctcgggtcgt | ccgccccaaag  | tccgtcaagt  | acaacttccg  | gaccagaacc  | gccgtcccca  | 240  |
|    | agctcgggta  | tgtaecggatg  | cagcggccct  | agcctcaact  | tctgtgaacc  | ctcctctcc   | 300  |
|    | cgtgctcagt  | caaatcctcc   | gtcgagatca  | actggtcggc  | gttccctcct  | aaatcctaata | 360  |
|    | gaaaatctta  | ctgctttgcc   | tgaagacgaa  | ccgtcgtaat  | tgttgacagc  | tacgcacaca  | 420  |
| 15 | cttgcccate  | cggatgcgtc   | aaatcagctc  | gatttgaaat  | tcgattcgat  | ggtgcctctt  | 480  |
|    | tccatatttc  | gatcatcctt   | cgctactgt   | gcaatgatta  | cagaaacgtc  | cccttcctct  | 540  |
|    | gaactttgtc  | ttaggctttt   | tgtcctgtgc  | acgtgactg   | qtatcaattt  | qttcatgtaa  | 600  |
|    | gatcaaatc   | cagcagggac   | gatgagcagc  | agacagaact  | cattacgcta  | gcaaattgat  | 660  |
|    | actagalla   | ctgycaagt    | tgcatacggc  | gcaatctgcc  | atcctggacc  | ccctttgttt  | 720  |
| 20 | aatcctqtt   | cctatgcag    | ttgctacgt   | gcagctcgtt  | gtgtgttatg  | gtgtgagcct  | 780  |
|    | gtcagccgct  | tgctctctgc   | tgacggatga  | tgccaacttt  | tctgttctgg  | tggtgcaggg  | 840  |
|    | tgatgcttgt  | gggggtggga   | ggcaacaacg  | ggtccacgct  | gacgctggg   | gtcattgcca  | 900  |
|    | qcagggagtg  | agtagtactt   | aatttgtcct  | atattgcttt  | ccgttgtttt  | cagttatata  | 960  |
|    | tggcctgaca  | gagaactgaa   | ttttgttgtt  | ggctgtttca  | ggggatctca  | tggccgacca  | 1020 |
|    | aggacaaggt  | gcagcaagcc   | aactactacg  | gctcctcacc  | caggcctcca  | ccatcagagt  | 1080 |
| 25 | cggcagctac  | aacggggagg   | agatctatgc  | gccgttcaag  | agcctccttc  | ccatggtaat  | 1140 |
|    | ctactataga  | cttgactaat   | actcttcttt  | ttactgaaac  | caaacataca  | taacaaaagca | 1200 |
|    | tattccgtaa  | ggtgctagtt   | gatgttataa  | agtgaacctg  | tctttcaggc  | cagtggctct  | 1260 |
|    | aagttaaaccg | aatgttaatc   | attgggttga  | aaaaacaaag  | gttcctaattt | tgtgaaagga  | 1320 |
|    | atgttaaact  | tagcataatg   | aaaaggggaa  | gcattgtaag  | aaaggtgctg  | aaacaatcga  | 1380 |
|    | ctcggctcgc  | catgttctga   | tcctacttgc  | aagtcaaaag  | gttctgtggt  | tagctcaag   | 1440 |
| 30 | gttccagcat  | cttttgatta   | cactcgtgca  | gtattgacga  | tggtgctaac  | tggttgcaag  | 1500 |
|    | ttcgcagact  | cggtgtttgt   | tatcttctct  | tcattgacaa  | gtgttgaact  | ggttttcagg  | 1560 |
|    | tgaacccaga  | cgacattgtg   | ttcggaggct  | gggacattag  | caacatgaac  | ctggccgact  | 1620 |
|    | ccatgaccag  | ggccaaggtg   | ctggatattg  | acctgcagaa  | gcagctcagg  | ccctacatgg  | 1680 |
|    | agtcctatgt  | gccacttccc   | cggtatctat  | gatccggact  | tcattcgggc  | taaccagggc  | 1740 |
|    | tctcgcgcca  | acagtgctcat  | caagggcacc  | aagaaagaac  | aggtggagca  | gatcatcaag  | 1800 |
| 35 | gatatcaagg  | acatggatat   | ggtatgctaac | gtgccttggt  | gctaagggtc  | accuagtgca  | 1860 |
|    | acctaaaaca  | aataaatact   | actatgaatt  | tggtaaatat  | acatacatat  | cagaacatat  | 1920 |
|    | tgtttaaccg  | gtgcacttag   | aagtctgcat  | ggtatgttgg  | acaattttgac | atcgatata   | 1980 |
|    | cagtgaaccg  | tcacttgcat   | gaggactcca  | caaagaacta  | aaactactga  | aagcttaagc  | 2040 |
|    | aactattctg  | agctaattgat  | gtatttggtg  | gacatggttt  | gaagatctag  | attaacgtgg  | 2100 |
| 40 | tcgaagaaat  | atgggttcaact | agcataagta  | atccattaca  | gaagctatgg  | cttatgtagc  | 2160 |
|    | taatgaaaca  | gggagtttaa   | ggagaagaac  | aaagtgagca  | agatagttgt  | gttgtggact  | 2220 |
|    | gcaaacactg  | aaaggtatag   | caatgtgtgc  | gctgtgtctca | acgacacgat  | ggagaatcta  | 2280 |
|    | ctggcatctg  | tggaacaagaa  | cgaggcggag  | gtatccaccat | caacactata  | tgccattgcc  | 2340 |
|    | tgtgtcatgg  | agggggtgcc   | gttcatcaat  | gggagcccc   | agaacacctt  | tgtgcctggt  | 2400 |
|    | gcgtggtttg  | gtgtgtttgc   | aaaagcttca  | tggtgttgca  | tttctgttcc  | aaagtttcat  | 2460 |
| 45 | ggtgttctat  | tcccgttcca   | aggcttatta  | tacctgttgc  | atgttctgtag | ggtgattga   | 2520 |

|    |             |             |             |            |             |             |      |
|----|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| 50 | tcttgctata  | aaaaacaact  | gcttgattgg  | tggtgacgac | ttcaagagtg  | gacagaccaa  | 2580 |
|    | gatgaaatct  | gtcttggctg  | atttccctgt  | tggtgctgga | ataaagggtg  | gaacctagta  | 2640 |
|    | tctctctctt  | attaaagatga | agtgtttttt  | tggcaaatga | cgttattgca  | ataactcttc  | 2700 |
|    | tatatattca  | ttttcatgca  | gcccacctca  | atcgtgagct | acaaccactt  | gggaaacaac  | 2760 |
|    | gatggcatga  | acctgtctgc  | ccttcaaaaca | ttcaggtcca | aggagatctc  | caagagcaac  | 2820 |
|    | gtggtggatg  | acatggtctc  | gagcaatgcc  | atcctctatg | agcccggcga  | gcattccgat  | 2880 |
|    | catgtcgttg  | tcattcaaggt | ctggttagctg | atctttcacc | tcgttaaaaag | ttgacatag   | 2940 |
|    | caaggcagat  | ttacattgaa  | actgttcact  | ctttgttgc  | agtatgtgcc  | gtacgtggga  | 3000 |
|    | gacagcaaga  | gggctatgga  | cgagtacacc  | tcagagatct | tcattggcgg  | caagaacacc  | 3060 |
| 55 | atcgtgctgc  | acaacacctg  | tgaggactcg  | ctcctcgccg | cacctatcat  | ccttgatctg  | 3120 |
|    | gtgctcttgg  | ctgagctcag  | caccaggatc  | cagctgaaag | ctgagggaga  | ggtaagagcc  | 3180 |
|    | ccccaaagtga | ttaacctgaa  | agcagctgc   | acgctagggt | ataatgacct  | tttaataacct | 3240 |
|    | tctggtgtct  | ctcttatgca  | ggacaaattc  | cactccttcc | acccggtggc  | caccatcctg  | 3300 |
|    | agctacctca  | ccaaggcacc  | cctggtaagc  | cttttctctc | gcattccggc  | atcactgcac  | 3360 |
|    | tgcgttttgc  | ttcaatccag  | ccactgatcg  | tctctctcga | aacctgaaaca | acaggttccc  | 3420 |
| 60 | cctggcacac  | cggtggtgaa  | cgctcggcc   | aagcagacgg | cgatgctgga  | gaacatcatg  | 3480 |
|    | agggcctgcg  | tgggctggc   | cccagagaaac | aacatgatcc | tggagtacaa  | gtgagccaa   | 3540 |
|    | tggcgt      |             |             |            |             |             | 3546 |

<210> 16

65 <211> 1070

<212> ADN

ES 2 296 337 T3

<213> *Zea mays*

<400> 16

5  
 10  
 15  
 20

```

cggcacgagg ttgcgggcca accgaaaatc acgggcgcga gagatcggag cacggcatgt 60
cggaggagca gttectcgcc gtggcggtgg aagccgcca gagcgccgc gagattatc 120
gcaagggatt ctaccagacc aagaacgtcc agcacaaggg ccagggtgat ttggtgacgg 180
agacggacaa ggcctgcgag gacctcatct tcaaccacct ccggaagcac tccccggacc 240
acaagttcat cggggaggag gaggccgcgg cgctcggggc caccgctgac ctcaccgacg 300
acccacctg gatcgtcgat cccctcgacg ggaccactaa tttcgtccat ggtttcccat 360
ttgtatgtgt ctccgttggc ctcaccattg ggaaaattcc cactgtcggg gtcgtcttca 420
acccatcat gaacgaactt ttcacggcgg ttcgtggaaa aggggctttc ctgaatgget 480
ctccaattaa agcatcatct caagatgagt tagtgaagc tttcttggtg acagaggctg 540
gaaccaatag agacaagacc actgtggatg atacaaccaa cagaatcaac aggctactat 600
acaagattcg atccatacgg atgtgtggat cattggcttt aaacatgtgt ggagtgcct 660
gtggtagact agatttgtgt tatgagatag gatttggtag tccatgggat gttgctgctg 720
gtgctgtaat tcttcaggaa gccggtggcc ttgttttga cccaagcggc ggagagtttg 780
atltgatgtc gcgaagaatg gcaggatcaa acagcttqct gaaggataag ttcgtcaagg 840
aactggggga tactaattga acaaatgtt agtattatc gtggaacaga ttaagacaat 900
aaggttgccc cgccgcatgg tgattaactt attgtttggg caacaaaatt ccatgtaatt 960
ctgcacctg acaactatgt tggacgcaga acattttatt gagttttgtg attacatggg 1020
aatacatagg ttgaggcaac ggtccctact ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1070

```

<210> 17

25 <211> 267

<212> PRT

<213> *Zea mays*

30 <400> 17

35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

```

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

Val His Gly Phe Pro Phe Val Cys Val Ser Val Gly Leu Thr Ile Gly
 100 105
Lys Ile Pro Thr Val Gly Val Val Phe Asn Pro Ile Met Asn Glu Leu
 115 120 125
Phe Thr Ala Val Arg Gly Lys Gly Ala Phe Leu Asn Gly Ser Pro Ile
 130 135 140
Lys Ala Ser Ser Gln Asp Glu Leu Val Lys Ala Leu Leu Val Thr Glu
 145 150 155 160
Ala Gly Thr Asn Arg Asp Lys Thr Thr Val Asp Asp Thr Thr Asn Arg
 165 170 175
Ile Asn Arg Leu Leu Tyr Lys Ile Arg Ser Ile Arg Met Cys Gly Ser
 180 185 190
Leu Ala Leu Asn Met Cys Gly Val Ala Cys Gly Arg Leu Asp Leu Cys
 195 200 205
Tyr Glu Ile Gly Phe Gly Gly Pro Trp Asp Val Ala Ala Gly Ala Val
 210 215 220
Ile Leu Gln Glu Ala Gly Gly Leu Val Phe Asp Pro Ser Gly Gly Glu
 225 230 235 240
Phe Asp Leu Met Ser Arg Arg Met Ala Gly Ser Asn Ser Leu Leu Lys
 245 250 255
Asp Lys Phe Val Lys Glu Leu Gly Asp Thr Asn
 260 265

```

65 <210> 18

<211> 25

<212> ADN

## ES 2 296 337 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> cebador

<400> 18

10 acgaggttgc ggcgaaccg aaaat

<210> 19

<211> 23

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 19

25 tagggaccgt tgcctcaacc tat

30

35

40

45

50

55

60

65