



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 748**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98123051 .9**

86 Fecha de presentación : **20.12.1991**

87 Número de publicación de la solicitud: **0921191**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.1999**

54 Título: **Promotor específico en tubérculos de la patata.**

30 Prioridad: **21.12.1990 SE 9004096**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **BASF Plant Science GmbH**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es: **Hofvander, Per;**
Persson, Per;
Tallberg, Anneli y
Wikström, Olle

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Promotor específico en tubérculos de la patata.

5 La presente invención se refiere a un promotor específico en tubérculos del gen de la sintasa de almidón unida a gránulo (GBSS, por sus siglas en inglés) de la patata. Además, la presente invención se refiere a la modificación mediante ingeniería genética de la patata, dando lugar a la formación de prácticamente solo almidón tipo amilopectina en la patata. La modificación por ingeniería genética implica la inserción de fragmentos de genes en la patata, comprendiendo dichos fragmentos de gen partes de la secuencia líder, el inicio de la secuencia, el final de la secuencia y la secuencia de enganche, así como las partes codificantes y no codificantes (es decir, exones en intrones) del gen para la sintasa de almidón unida a gránulo, insertada en la dirección antisentido.

Antecedentes de la invención

15 El almidón en diversas formas es de gran importancia en la industria de alimentos y de papel. En el futuro, el almidón también será de gran importancia para producir polímeros capaces de degradarse en la naturaleza, por ejemplo para uso en material de empaque. Muchos productos diferentes de almidón que se conocen se producen mediante derivación de almidón nativo originario, entre otros, de maíz y patata. El almidón de patata y maíz, respectivamente, está compitiendo en la mayoría de las áreas de mercado.

20 En el tubérculo de patata, el almidón es la mayor parte de la materia sólida. Cerca de 1/4 hasta 1/5 del almidón en la patata es amilosa, mientras que el resto del almidón es amilopectina. Estos dos componentes del almidón tienen diferentes campos de aplicación y por lo tanto lo más interesante es la posibilidad de producir ya sea amilosa pura o amilopectina pura. Los dos componentes de almidón se pueden producir de un almidón común, que requiere un número de pasos de proceso y, consecuentemente, es caro y complicado.

25 Se ha probado ahora que mediante ingeniería genética es posible modificar la patata para que los tubérculos simplemente produzcan de manera principal almidón de uno o de otro tipo. Como resultado, se obtiene una calidad de almidón que puede competir en las áreas donde el almidón de patata normalmente no se usa hoy en día. El almidón de una patata así, que haya sido modificada mediante ingeniería genética, tiene un gran potencial como un aditivo alimenticio, puesto que no se ha sometido a ningún proceso de modificación química.

Síntesis de almidón

35 La síntesis de almidón y la regulación del mismo están siendo estudiadas en la actualidad con gran interés, tanto a nivel de investigación básica como para aplicación industrial. Aunque se conoce mucho sobre la ayuda de ciertas enzimas en la transformación de sacarosa en almidón, la biosíntesis de almidón aún no ha sido dilucidada. Investigando por sobre todo en maíz ha sido posible, sin embargo, dilucidar parte de las rutas de síntesis y las enzimas que participan en estas reacciones. Las enzimas más importantes de síntesis de almidón para producir gránulos de almidón son la sintasa y la enzima que se ramifica. En el maíz hasta ahora se han demostrado y estudiado tres formas de sintasa de almidón, dos de las cuales son solubles y una está asociada de manera insoluble con los gránulos de almidón. También la enzima que se ramifica consta de tres formas que probablemente se codifiquen por tres genes diferentes (Mac Donald & Preiss, 1985; Preiss, 1988).

El gen ceroso en maíz

45 La síntesis del componente de almidón amilosa esencialmente ocurre mediante la acción de la sintasa de almidón alfa-1,4-D-glucano-4-alfa-glucosilo transferasa (EC 2.4.1.21) que se asocia con los gránulos de almidón en la célula de crecimiento. El gen codificante para esta enzima unida a gránulo se llama "waxy" o ceroso (= wx+), mientras que la enzima se llama, por sus siglas en inglés, "GBSS" (Sintasa de almidón unida a gránulo).

50 El locus ceroso en el maíz ha sido caracterizado minuciosamente tanto genética como bioquímicamente. El gen ceroso en el cromosoma 9 controla la producción de amilosa en endosperma, polen y el saco embrional. El almidón formado en endosperma en maíz normal con el alelo wx+ consiste hasta en un 25% de amilosa y hasta un 75% de amilopectina. Una forma mutante de maíz se ha encontrado en la cual la endosperma contiene una mutación localizada en el gen wx+ y por lo tanto se sintetiza GBSS que no funciona. La endosperma de este maíz mutante contiene por lo tanto simplemente amilopectina como componente de almidón. Este tal llamado mutante ceroso no contiene ni GBSS ni amilosa (Echt & Schwartz, 1981).

60 La proteína GBSS se codifica por el gene wx+ en el núcleo celular pero se transporta hacia y se activa en el amiloplasto. La preproteína por lo tanto consiste de dos componentes, a saber un péptido transitorio 7kD que transfiere la proteína a través de la membrana de amiloplasto y la proteína real que es 58 kD. La región codificante del gen wx+ en maíz es de 3,7 kb de largo y comprende 14 exones y 13 intrones. Se conoce una cantidad de señales de regulación en la región promotora y se han descrito dos secuencias diferentes que hacen poli-adenilos (polyadenilating) (Klösgen *et al*, 1986; Schwartz-Sommer *et al*, 1984; Shure *et al*, 1983).

Enzima de amilosa en patata

Se ha identificado una proteína 60 kD en patata, la cual constituye la principal proteína unida a gránulo. Puesto que los anticuerpos contra esta enzima de patata reaccionan de forma cruzada con GBSS de maíz, se supone que ésta es la sintasa unida a gránulo (Vos-Scheperkeuter *et al.*, 1986). El gen para la GBSS de patata no ha sido, sin embargo, caracterizada hasta el mismo punto que el gen ceroso, ni con respecto a la locación ni a la estructura.

Los mutantes cerosos que tienen lugar naturalmente han sido descritos para cebada, arroz y sorgo además de maíz. No se ha encontrado un mutante natural en la patata, pero se ha producido un mutante mediante radiación X de hojas de una planta monohaploide ($n = 12$) (Visser *et al.*, 1987). El almidón aislado de tubérculos de este mutante no contiene la proteína GBSS ni la amilosa. El mutante se condiciona mediante un gen recesivo y se llama amf. Se puede comparar con mutantes cerosos de otras especies de plantas puesto que la proteína GBSS y la amilosa están ausentes. La estabilidad del número de cromosoma, sin embargo se debilita puesto que se cuadruplica a un número natural ($n = 48$), el cual da efectos negativos en las plantas de patata. (Jacobsen *et al.*, 1990).

Inhibición de producción de amilosa

La síntesis de amilosa se puede reducir drásticamente por inhibición de sintasa de almidón unida a gránulo, GBSS, que cataliza la formación de amilosa. Esta inhibición da lugar a que el almidón sea principalmente amilopectina.

La inhibición de la formación de enzima se puede llevar a cabo de diversas maneras, por ejemplo mediante:

- Tratamiento mutagénico que da lugar a una modificación de la secuencia genética codificante para la formación de la enzima
- Incorporación de una transposona en la secuencia genética codificante para la enzima
- Modificación mediante ingeniería genética para que no se exprese el gen codificante para la enzima, por ejemplo inhibición de gen antisentido.

La figura 1 ilustra una supresión específica de una expresión normal de gen en la cual se permite que un nucleótido antisentido complementario hibridice con un mRNA para un gen objetivo. De esa manera, el nucleótido antisentido es ARN antisentido que se transcribe *in vivo* a partir de una secuencia genética “reversada” (Izant, 1989).

Usando la técnica antisentido se han inhibido diversas funciones genéticas en plantas. Se ha usado construcción antisentido para sintasa charcona, poligalacturonasa y acetiltransferasa de fosfonotricina para inhibir la enzima correspondiente en las especies de las plantas petunia, tomate y tabaco.

Inhibición de amilosa en patata

Previamente se han hecho experimentos en patata para inhibir la síntesis de sintasa de almidón unida a gránulo (proteína GBSS) con una construcción antisentido correspondiente al gen codificante para GBSS (este gen se llamará de aquí en adelante “gen de GBSS”). Hergersberger (1988) describe un método mediante el cual se ha aislado un clon de cADN para el gen de GBSS en patata por medio de un clon de cADN para el gen wx+ en maíz. Una construcción antisentido basada en el clon de cADN entero se transfirió a discos de hoja de patata por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. En microtubérculos inducidos *in vitro* a partir de retoños de patata regeneradas, se observó una reducción variante y muy débil de contenido de amilosa y mostrada en un diagrama. No se ha proporcionado una caracterización completa del gen GBSS.

Se ha descrito la inhibición de la expresión del gen para sintasa de almidón unida a gránulo en patata con construcciones antisentido heterólogo (GBSS de maíz) (Feenstra *et al.* (1989). Resumen en el Manual del Taller Europeo sobre “Productos de Ingeniería de Almacenamiento para la Agroindustria”, 15-18/04/89, Bad Soden, Germany). La reducción máxima en el contenido de amilosa de almidón de reserva obtenida por este método fue de 22%, es decir una reducción de un total de 18% a 14%. No todos los transformantes con la misma construcción anti-sentido mostraron la misma respuesta.

El gen para la proteína GBSS en patata se ha caracterizado más allá en que un clon wx+ genómico se examinó mediante análisis de restricción. Sin embargo, no se ha determinado la secuencia de ADN del clon (Visser *et al.*, 1989).

Han sido reportados otros experimentos con una construcción antisentido correspondiente al gen de GBSS en patata. La construcción antisentido que se basa en un clon de cADN junto con el promotor de CaMV 35S ha sido transformada por medio de *Agrobacterium rhizogenes*. De acuerdo con la información, la transformación dio lugar a un contenido más bajo de amilosa en la patata, pero no se ha hecho un conteo de valores (Flavell, 1990).

Ninguno de los métodos usados hasta ahora para modificación de patata por ingeniería genética ha dado lugar en patata con prácticamente nada de almidón de tipo amilosa.

Uno de los objetivos de la invención es por lo tanto suministrar una supresión prácticamente completa de la formación de amilosa en tubérculos de patata.

Resumen de la invención

De acuerdo con la invención, la función del gen de GBSS y, así, la producción de amilosa en patata se inhiben usando completamente nuevas construcciones antisentido. Para formar los fragmentos antisentido de acuerdo con la invención, el gen de GBSS genómico se usa como base para alcanzar una inhibición de GBSS y, consecuentemente, de la producción de amilosa, que es tan efectiva como sea posible. Las construcciones antisentido de acuerdo con la invención comprenden tanto partes codificantes como no codificantes del gen de GBSS que corresponden a secuencias en la región que comprende un promotor así como también como una secuencia líder, inicio de traducción, extremo de traducción y secuencia de enganche en la dirección antisentido. Para una expresión de tejido específico, es decir, la producción de amilosa debería inhibirse solo en los tubérculos de patata, se hace uso de promotores que son específicamente activos en el tubérculo de patata. Como resultado, no se afecta la composición de almidón en otras partes de la planta, lo cual de otra manera daría efectos laterales negativos.

Así, la invención comprende un fragmento que tiene esencialmente una de las secuencias nucleótidas declaradas en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 ó SEQ ID No. 3. Sin embargo, las secuencias se pueden desviar de aquellas declaradas por uno o más de pares base no adyacentes, sin afectar la función de los fragmentos.

La invención comprende un promotor específico para tubérculo de patata que comprende 987 bp que pertenece al gen de acuerdo con la invención, que codifica sintasa de almidón unida a gránulo. No se ha caracterizado previamente ni al promotor ni al gen correspondiente. La secuencia del promotor de 987 bp se declara en SEQ ID No. 4, mientras la secuencia de gene se declara en SEQ ID No. 5. También las secuencias de promotor y de gen se pueden desviar de aquellas declaradas por uno o más de los pares de base no adyacentes, sin afectar su función.

La invención comprende también vectores que incluyen los fragmentos antisentido y las construcciones antisentido de acuerdo con la invención.

En otros aspectos la invención comprende células, plantas, tubérculos, microtubérculos y semillas cuyo genoma contiene los fragmentos de acuerdo con la invención insertada en la dirección antisentido.

Finalmente, la invención comprende un método de suprimir formación de amilosa en patata, por lo cual se forma principalmente almidón tipo amilopectina en la patata.

La invención será descrita ahora con mayor detalle con referencia a las figuras acompañantes en las cuales

la figura 1 ilustra el principio de la inhibición antisentido de gene

la figura 2 muestra el resultado de análisis de restricción del gen de GBSS de patata

la figura 3 muestra dos nuevos vectores binarios pHo3 y pHo4,

la figura 4 muestra las construcciones antisentido pHoxwA, pHoxwB y pHoxwD,

la figura 5 muestra las construcciones antisentido pHoxwF y pHoxwG, y

la figura 6 muestra las construcciones antisentido pHoxwK y pHoxwL.

Por otra parte, las secuencias de los diferentes fragmentos de ADN de acuerdo con la invención se muestran en SEQ ID Nos 1, 2, 3, 4 y 5. Puede haber desviaciones de estas secuencias en uno o más de los pares de base no adyacentes.

Materiales

Al llevar a cabo la invención de manera práctica se usaron los siguientes materiales:

Cepas bacteriales: *E. coli* DH5alfa y DH5alfaFIQ(BRL). *E. coli* JM105 (Pharmacia). *A. tumefaciens* LBA4404 (Clontech).

Vectores: M13mp18 y mp19 (Pharmacia). pBI101 y pBI121 (Clontech). pBI240.7 (M. W. Bevan). pUC plasmidas (Pharmacia).

Enzimas: enzimas de restricción y enlazador (linker) EcoRI (BRL). UNION™ DNA kit de ligación (Clontech). Sequenase™ DNA kit de secuenciación (USB). T4-DNA ligasa (Pharmacia).

Los materiales mencionados arriba se usan de acuerdo con especificaciones declaradas por los fabricantes.

Biblioteca genómica

Ha sido producida una biblioteca genómica en EMBL3 por Clontech por cuenta del solicitante, al usar hojas de la patata Bintje como material de inicio.

Identificación y aislamiento del gen de GBSS

La biblioteca genómica ha sido tamizada para el gen GBSS de patata por medio de clones de cADN tanto para extremos 5' como 3' del gen (obteniéndose dichos clones de cADN de M Hergersberger, Max Plank Institute en Colonia) de acuerdo con un protocolo de Clontech.

Ha sido identificado y aislado un clon de total longitud del gen GBSS de patata, wx311, a partir de la biblioteca genómica. Se ha determinado el inicio del gen GBSS en un fragmento EcoRI que se llama fragmento w (3.95 kb). El extremo del gen GBSS también se ha determinado en un fragmento EcoRI que se llama fragmento x (5.0 kb). También se ha aislado un fragmento BglII-SpeI que se llama fragmento m (3.9 kb) y comparte secuencias tanto del fragmento w como del fragmento x. Los fragmentos w, m y x se han subclonado en pUC13 (Viera, 1982; Yanisch-Peron *et al*, 1985) y se llaman pSw, pSm y pSx, respectivamente (Fig. 2).

Caracterización del gen GBSS en patata

El gen GBSS en patata ha sido caracterizado mediante análisis de restricción y pruebas de cADN, donde se ha determinado más exactamente el extremo 5' y 3' del gen GBSS (fig. 2). La determinación de secuencia de acuerdo con Sanger *et al*, 1977 del gen GBSS se ha hecho en subclones de pSw y pSx en M13mp18 y mp19 así como también pUC19 iniciando alrededor del extremo 5' (ver SEQ ID No. 5).

La región del promotor ha sido determinada en un fragmento BglII-NsiI (ver SEQ ID No. 4). El inicio de transcripción y traducción se ha determinado en un fragmento de BglII-HindIII que se solapa. La región que termina se ha determinado a su vez en un fragmento SpeI-HindIII.

Construcciones antisentido para el gen GBSS en patata

Los fragmentos de gen GBSS de acuerdo con la invención (ver SEQ ID Nos 1, 2 y 3, y Fig. 2) han sido determinados de la siguiente manera.

La restricción de pSw con NsiI y HindIII da el fragmento I (SEQ ID No. 1) el cual subclonado en pUC19 se llama 19NH35. Una mayor restricción de 19 NH35 con HpaI-SstI da un fragmento que contiene 342 bp del gen GBSS de acuerdo con la invención. Este fragmento comprende una secuencia líder, inicio de traducción y los primeros 125 bp de la región codificante.

La restricción de pSm con HpaI y NsiI da un fragmento II (SEQ ID No. 2) el cual subclonado en pJRD184 (Heusterspreute *et al*, 1987) se llama pJRDmitt. Una mayor restricción de pJRDmitt con HpaI-SstI da un fragmento que contiene 2549 bp del gen GBSS de acuerdo con la invención. Este fragmento comprende exones e intrones de la mitad del gen.

La restricción de pSx con SstI y SpeI da el fragmento III (SEQ ID No. 3) el cual subclonado en pBluescript (Melton *et al*, 1984) se llama pBlue3'. Otra restricción de pBlue3' con BamHI-SstI da un fragmento que contiene 492 bp del gen GBSS de acuerdo con la invención. Este fragmento comprende el último intron y exon, extremo de traducción y 278 bp de secuencia de enganche.

Construcciones antisentido con fragmento I (figura 4): para la construcción antisentido pHoxwA, el fragmento de HpaI-SstI de 19NH35 ha sido insertado en la dirección antisentido adentro del vector binario pBI121 (Jefferson *et al*, 1987) penetrado con SmaI-SstI. La transcripción del fragmento antisentido se inicia entonces por el promotor CaMV 35S y se termina por el terminador NOS (NOS = sintasa de nopalina).

Para la construcción antisentido pHoxwB, el fragmento de HpaI-SstI de 19NH35 se ha insertado en la dirección antisentido adentro del vector binario pHo4 (Fig. 3) penetrado con SmaI-SstI. El promotor patatin I que es específico de tubérculos en patata proviene del vector pBI240.7 obtenido de M. Bevan, Institute of Plant Science Research, Norwich. La transcripción del fragmento antisentido se inicia luego por el promotor patatin I y se termina por el terminador NOS.

Para la construcción antisentido pHoxwD, el fragmento HpaI-SstI de 19NH35 se ha insertado en la dirección antisentido dentro del vector binario pHo3 (Fig. 3) penetrado con SmaI-SstI. pHo3 es un nuevo vector binario que se construye sobre la base de pBI101. Este vector que contiene el promotor de acuerdo con la invención ha sido penetrado con restricción con SmaI y SstI, el fragmento HpaI-SstI de 19NH35 que se inserta en la dirección antisentido. La transcripción del fragmento antisentido se inicia luego por su propio promotor GBSS y es terminado por el terminador NOS. Esto significa que el fragmento antisentido se transcribe solo en el tubérculo de patata, puesto que el promotor GBSS como el promotor patatin I es específico para tubérculo.

Las construcciones antisentido con el fragmento II (figura 5): para la construcción antisentido pHoxwF, el fragmento HpaI-SstI de pJRDmitt se ha insertado en la dirección antisentido dentro del vector binario pHo4 penetrado con SmaI-SstI. La transcripción del fragmento antisentido se inicia entonces mediante el promotor patatin I y se termina por el terminador NOS. Para la construcción antisentido pHoxwG, el fragmento HpaI-SstI de pJRDmitt se ha insertado en la dirección antisentido adentro del vector binario pHo3 penetrado con SmaI-SstI. La transcripción del fragmento antisentido se inicia luego por su propio promotor GBSS y se termina por el terminador NOS.

Construcciones antisentido con fragmento III (figura 6): para la construcción antisentido pHoxwK, el fragmento BamHI-SstI de pBlue3' se ha insertado en la dirección antisentido adentro del vector binario pHo4 penetrado con BamHI-SstI. La transcripción del fragmento antisentido se inicia entonces por el promotor patatin I y se termina por el terminador NOS.

Para la construcción antisentido pHoxwL, el fragmento BamHI-SstI de pBlue3' se ha insertado en la dirección antisentido adentro del vector binario pHo3 penetrado con BamHI-SstI. La transcripción del fragmento antisentido se inicia entonces por su propio promotor GBSS y se termina por su terminador NOS.

Las construcciones antisentido formadas (figuras 4, 5, 6) se han transformado en cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mediante transformación directa con el método de "congelar-deshelar" (Hoekema *et al.*, 1983; An *et al.*, 1988).

Transformación

Las construcciones antisentido se transfieren a bacterias, adecuadamente mediante el método de "congelar-deshelar" (An *et al.*, 1988). La transferencia de la bacteria recombinante al tejido de patata por incubación del tejido de patata con la bacteria recombinante en un medio adecuado después de algún tipo de daño que se haya infligido al tejido de la patata. Durante la incubación, el T-ADN de la bacteria entra al ADN de la planta anfitrión. Después de la incubación, se matan las bacterias y el tejido de la patata se transfiere a un medio sólido para inducción de callo y se incuba para crecimiento de callo.

Después de pasar por otros medios adecuados, se forman retoños que se cortan del tejido de la patata.

Se levantan a cabo verificaciones para probar la expresión de las construcciones antisentido y la transferencia de las mismas al genoma de patata mediante, por ejemplo, hibridación sur y norte (Maniatis *et al.* (1982)). El número de copias de la construcción antisentido que ha sido transferido se determina mediante hibridación Southern.

La prueba de la expresión a nivel proteína se lleva a cabo de manera conveniente sobre microtubérculos inducida *in vitro* en retoños o brotes transformados, permitiendo así que la prueba se realice tan rápido como sea posible.

Caracterización de la proteína GBSS

El efecto de las construcciones antisentido sobre la función del gen GBSS con respecto a la actividad de la proteína GBSS se examina extrayendo almidón de los microtubérculos y analizándola con respecto a la presencia de la proteína GBSS. En electroforesis sobre gel de poliacrilamida (Havenkamp-Hermelink *et al.*, 1987), la proteína GBSS forma una banda distintiva en 60 kD, cuando el gen GBSS funciona. Cuando el gen GBSS no se expresa, es decir cuando el gen GBSS antisentido se expresa totalmente, inhibiendo de esa manera la formación de proteína GBSS, no se demuestra una banda en 60 kD sobre el gel.

Caracterización de almidón

La composición del almidón en microtubérculos es idéntica con aquella de tubérculos de patata ordinarios y por lo tanto el efecto de las construcciones antisentido sobre la producción de amilosa se examina en microtubérculos. La proporción de amilosa a amilopectina se puede determinar mediante un método espectrofotométrico (por ejemplo, de acuerdo con Havenkamp-Hermelink *et al.*, 1988).

Extracción de amilopectina de patata de amilopectina

Se extrae amilopectina de la así llamada patata de amilopectina (patata en la cual la formación de amilosa se ha suprimido insertando la construcción antisentido de acuerdo con la invención) de una manera conocida.

La invención se describirá con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Producción de microtubérculos con construcciones antisentido insertadas de acuerdo con la invención

Las construcciones antisentido (ver figuras 4, 5 y 6) se transfieren a *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 mediante el método de "congelamiento - deshielo" (An *et al.*, 1988). La transferencia a tejido de patata se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo modificado de Rocha-Sosa *et al.* (1989).

ES 2 268 748 T3

Los discos de las hojas de las plantas de patata cultivadas *in Vitro* se incuban en la oscuridad en un medio de MS líquido (Murashige & Skoog; 1962) con sacarosa al 3% y MES al 0,5% junto con 100 µl de una suspensión de *Agrobacterium* recombinante por 10 ml de medio durante dos días. Después de esos dos días se matan las bacterias, los discos de hoja se transfieren a un medio sólido por inducción callosa y se incuban por 4-6 semana, dependiendo del crecimiento del callo. El medio sólido se compone como sigue:

MS + 3% sacarosa

10	2 mg/l	Zeatina ribosida
	0.02 mg/l	“NAA”
	0.02 mg/l	“GA3”
	500 mg/l	“Claforan”
15	50 mg/l	kanamycin
	0.25%	“Gellan”

Posteriormente los discos de hoja se transfieren a un medio que tiene una composición diferente de hormonas, que comprende:

MS + 3% sacarosa

25	5 mg/l	“NAA”
	0.1 mg/l	“BAP”
	500 mg/l	“Claforan”
	50 mg/l	kanamycin
30	0.25%	“Gellan”

Los discos de hoja se almacenan en este medio por alrededor de 4 semanas, después de lo cual se transfieren a un medio en el cual la concentración “Claforan” se ha reducido a 250 mg/l. Si se requiere, los discos de hoja se mueven luego a un medio fresco cada 4 o 5 semanas. Después de la formación de retoños o brotes, éstos se cortan de los discos de hoja y se transfieren a un medio idéntico.

La condición de que una construcción antisentido ha sido transferida a los discos de hoja se verifica primero analizando extractos de hoja de los retoños regenerados con respecto de la actividad de glucuronidasa por medio de los sustratos descritos por Jefferson *et al* (1987). La actividad se demuestra mediante evaluación visual.

Otras pruebas de la expresión de las construcciones antisentido y la transferencia de las mismas al genoma de patata se llevan a cabo mediante hibridización de sur y de norte de acuerdo con Maniatis *et al* (1981). El número de copias de las construcciones antisentido que ha sido transferido se determina mediante hibridización Southern.

Cuando se ha establecido que la construcción antisentido han sido transferidas a y expresadas en el genoma de patata, inicia la prueba o verificación de la expresión a nivel proteínico. La prueba se lleva a cabo en micro tubérculos que se han inducido *in vitro* en los retoños transformados, evitando así la necesidad de esperar el desarrollo de una planta completa de patata con tubérculos de patata.

Las partes de tallo de los retoños de patata se cortan en los nudos y se colocan en un medio modificado de MS. Allí ellos forman microtubérculos después de 2-3 semanas de incubación en la oscuridad a 19°C (Bourque *et al*, 1987). El medio se compone como sigue

MS + 6% sacarosa

60	2.5 mg/l	kinetina
	2.5 mg/l	“Gellan”

El efecto de las construcciones antisentido en la función del gen de GBSS con respecto a la actividad de la proteína GBSS se analiza por medio de electroforesis sobre gel de poliacrilamida (Hovenkamp-Hermelink *et al*, 1987). Se extrae almidón de los microtubérculos y se analiza con respecto a la presencia de la proteína GBSS. En un gel de poliacrilamida, la proteína de GBSS forma una banda distintiva en 60 kD, cuando el gen de GBSS funciona. Si el gen de GBSS no se expresa, es decir, cuando el gen de GBSS antisentido se expresa totalmente para que la formación de GBSS se inhiba, no se puede ver 60 kD sobre el gel.

ES 2 268 748 T3

La composición del almidón, es decir la proporción entre amilosa y amilopectina se determina mediante un método espectrofotométrico de acuerdo con Hovenkamp-Hermetink *et al* (1988), siendo determinado el contenido de cada componente de almidón con base en un gráfico estándar.

5 Ejemplo 2

Extracción de amilopectina de patata de amilopectina

10 La patata cuyo principal componente de almidón es amilopectina, llamada abajo patata de amilopectina, modificada de la manera de ingeniería genética de acuerdo con la invención, se ralla, liberando así el almidón de las paredes celulares.

15 Las paredes celulares (fibras) se separan del jugo o zumo de fruta y almidón en mallas centrífugas. El jugo de fruta se separa del almidón en dos pasos, a saber: primero en hidroclones y posteriormente en filtros de vacío tipo banda especialmente diseñados.

Luego se lleva a cabo un refinamiento de acabado en hidroclones en los cuales se separa el remanente del jugo de fruta y fibras.

20 El producto de seca en dos pasos, primero mediante presecado en un filtro de vacío y posteriormente secando finalmente en una corriente de aire caliente.

Referencias

- 25 - Mac Donald, F. D. y Preiss, J., 1985, *Plant. Physiol.* 78: 849-852
- Preiss, J., 1988. En la Bioquímica de las plantas (The Biochemistry of Plants) 14 (Carbohidratos). Ed. J. Preiss, Academic Press; 181-254
- 30 - Echt, C. S. y Schwarz, D., 1981, *Genetics* 99: 275-284
- Klösgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. y Saedler, H., 1986, *Mol. Gen. Genet.* 203: 237-244
- Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Klösgen, R. B., Wienand, U., Peterson, P. A. y Saedler, H., 1984, *EMBO J.* 3(5): 1021-1028
- 35 - Shure, M., Wessler, S. y Fedoroff, N., 1983, *Cell* 35: 225-233
- Jacobsen, E., Krigsheld, H. T., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein, A. S., Witholt, B. y Feenstra, W. J., 1990, *Plant. Sci.* 67:177-182
- 40 - Visser, R. G. F., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein, A. S., Vos-Scheperkeuter, G. H., Jacobsen, E., Feenstra, W. J. y Witholt, B., 1987, Proc. 4th European Congress on Biotechnology (Memorias del 4º Congreso Europeo de Biotecnología) 1987, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam; 432-435
- 45 - Vos-Scheperkeuter, G. H., De Boer, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. y Witholt, B., 1986, *Plant. Physiol.* 82: 411-416
- Cornelissen, M., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17(18):7203-7209
- 50 - Izant, J. G., 1989, Movilidad celular y Citoesqueleto (Cell Motility and Cytoskeleton) 14:81-91
- Sheehy, R. E., Kramer, M., Hiatt, W. R., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(23):8805-8809
- 55 - Van der Krol, A. R., Mur, L. A., de Lange, P., Gerats, A. G. M., Mol, J. N. M. y Stuitje, A. R., 1960, *Mol. Gen. Genet.* 220:204-212
- Flavell, R. B., 1990, AgBiotech. News and Information (Noticias e Información) 2(5):629-630
- 60 - Hergersberger, M., 1988, Molekulare Analyse des waxy Gens aus *Solanum tuberosum* und Expression von waxy antisense RNA in transgenen Kartoffeln. (Análisis Molecular del Gen Ceroso a partir del Tubérculo Solanum y Expresión del ARN Ceroso Antisentido en Patata Transgénica) Tesis de doctorado de la Universidad de Colonia.
- Visser, R. G. F., Hergersberger, M., van der Leij, F. R., Jacobsen, E., Witholt, B. y Feenstra, W. J., 1989, *Plant. Sci.* 64:185-192 An, G., Ebert, P. R., Mitra, A. y Ha, S. B., 1987, *Plant Mol. Biol. Manual* A3:1-19
- 65 - Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A., 1983, *Nature* 303:179-180

ES 2 268 748 T3

- **Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W., 1987, *EMBO J.* 6:3201-3207**
- **Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467**
- 5 - **Viera, J. y Messing, J., 1982, *Gene* 19:259-268**
- **Yanisch-Perron, C., Viera, J. y Messing, J., 1985, *Gene* 33:103-119**
- **Heusterspreute et al (1987) *Gene* 53:294-300**
- 10 - **Melton, D. A. et al (1984). *Nucleic Acids Res.* 12:7035-7056 (la plasmida se vende por Stratagene)**
- **Murashige, T. y Skoog, F. 1962, *Physiol. Plant* 15:473-497.**
- 15 - **Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Shell, J. y Willmitzer, L., 1989, *EMBO J.*, 8 (1):23-29**
- **Jefferson, R. A., Kavanagh, R. A. y Bevan, M. W., 1987, *EMBO J.* 6:3901-3907**
- 20 - **Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J., 1982, Clonación Molecular, un Manual de Laboratorio (Molecular Cloning, A Laboratory Handbook), Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor***
- **Bourque, J. E., Miller, J. C. y Park, W. D., 1987, *In Vitro Cellular & Development Biology* 23(5):381-386**
- 25 - **Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B. J. & Feenstra, W. J., 1987, *Theor. Appl. Genet.* 75:217-221**
- **Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., de Vries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B. y Feenstra, W. J., 1988, *Potato Research* 31:241-246**
- 30 - **Modified starches: Properties and use D. B. Wurzburg**
- **Bevan, M. W., 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721.**

REIVINDICACIONES

1. Un promotor del gen de la sintasa de almidón unida a gránulo (GBSS) de patata en donde dicho promotor es
5 específico para tubérculos y consta de un fragmento de promotor HindIII-NsiI genómico que comprende la región
promotora en un fragmento BglII- NsiI tal como está contenido en SEQ ID No. 4.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG.1

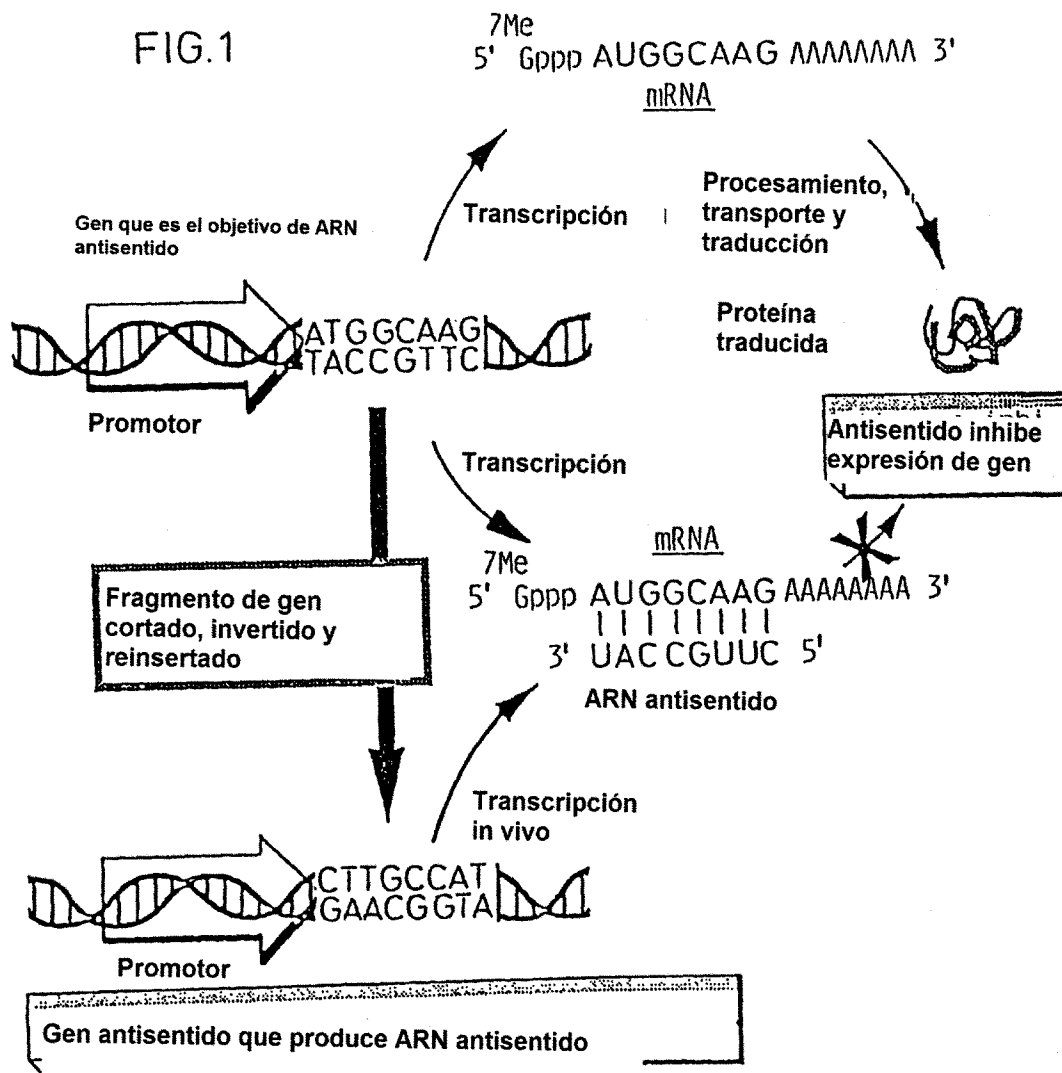


Fig.2 Resultado del análisis de restricción. Región codificadora GBSS que incluye los intrones se marca en un tono más oscuro.

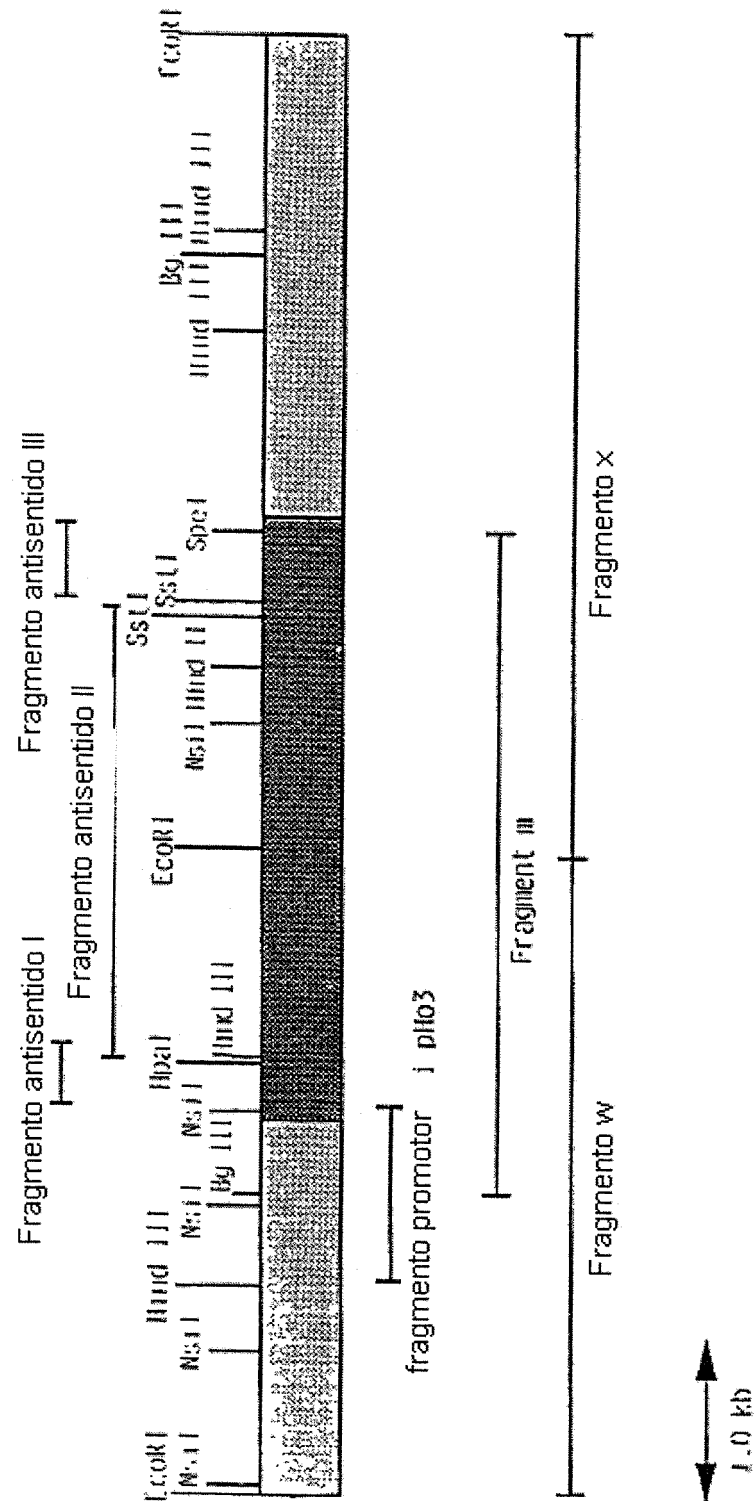


FIG.3

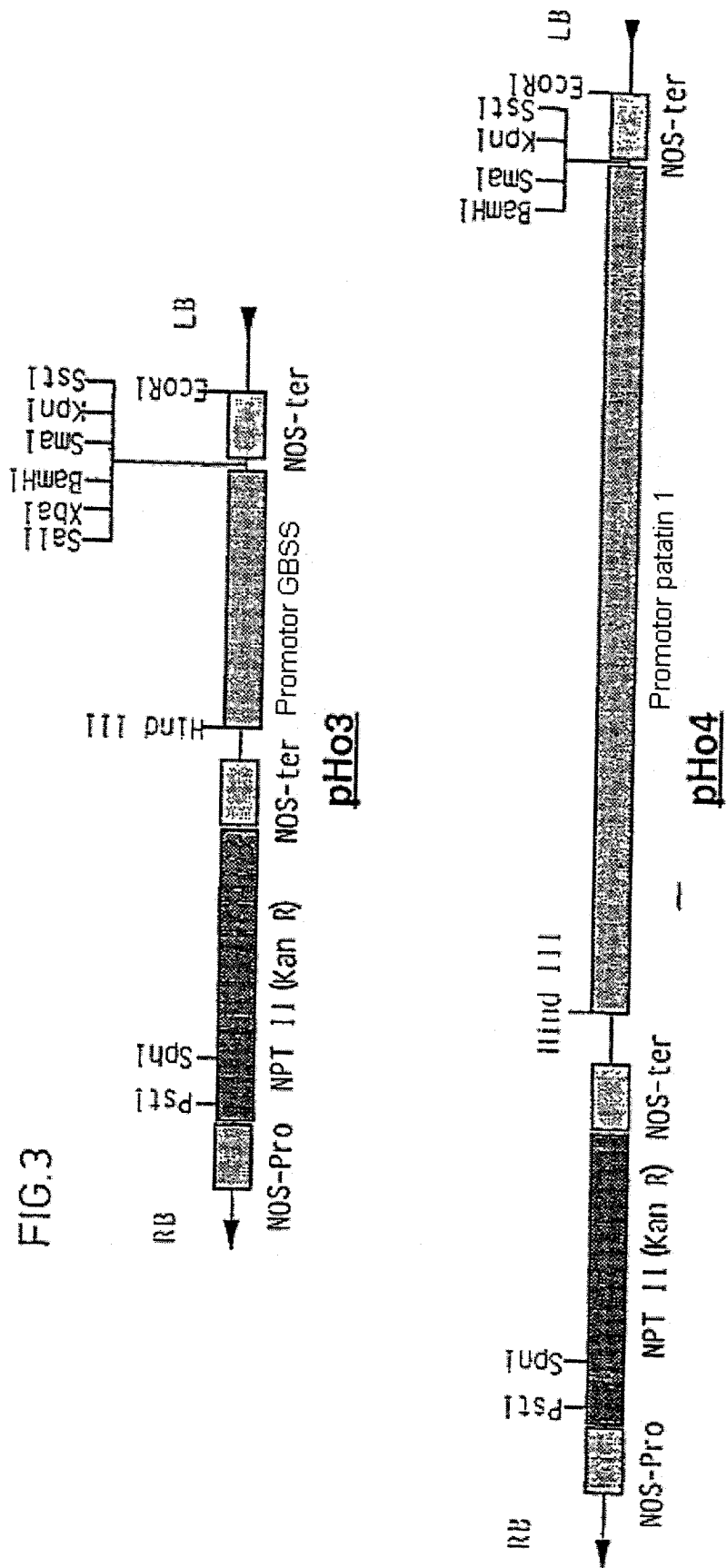


FIG. 4

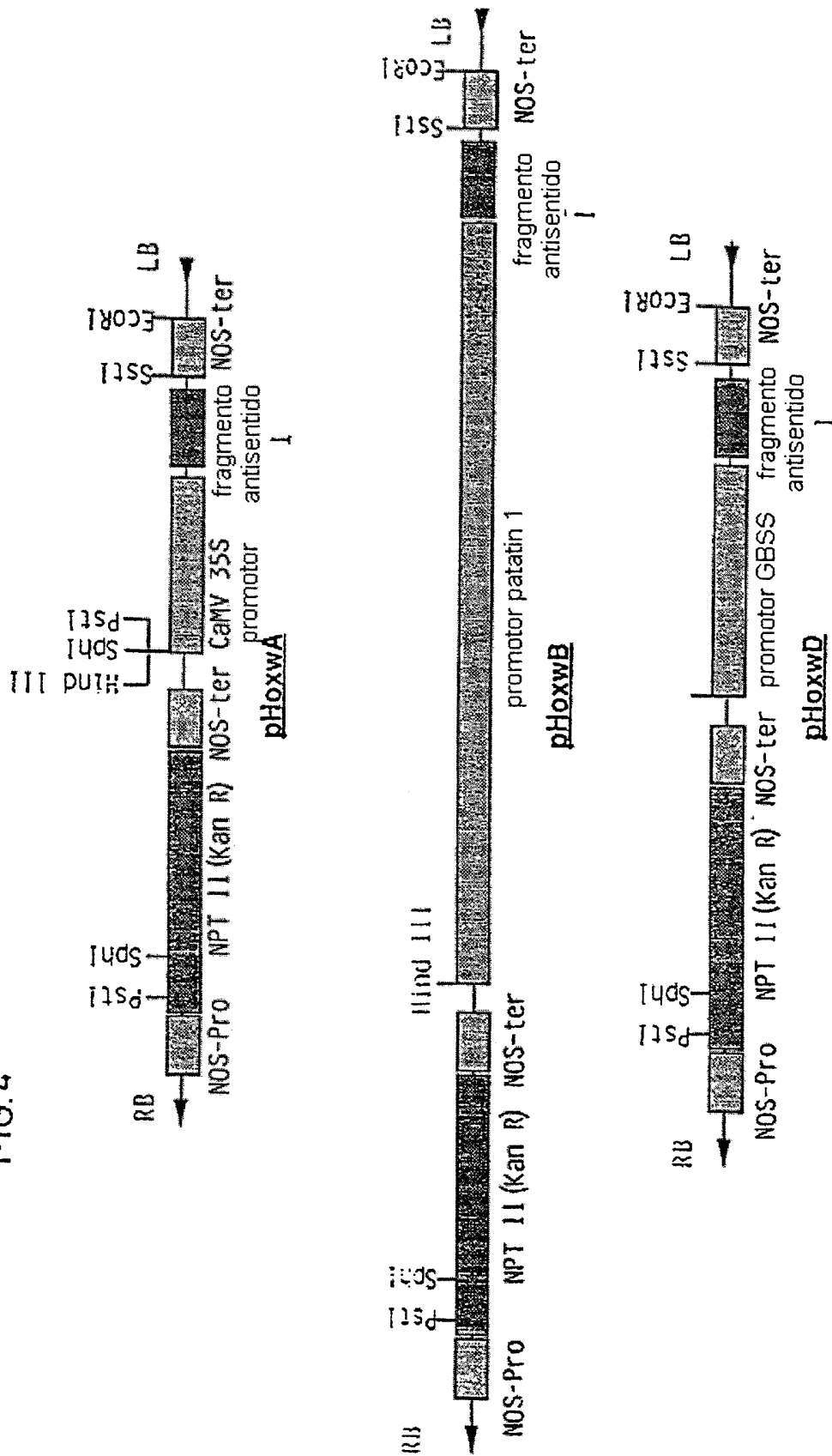


FIG.5

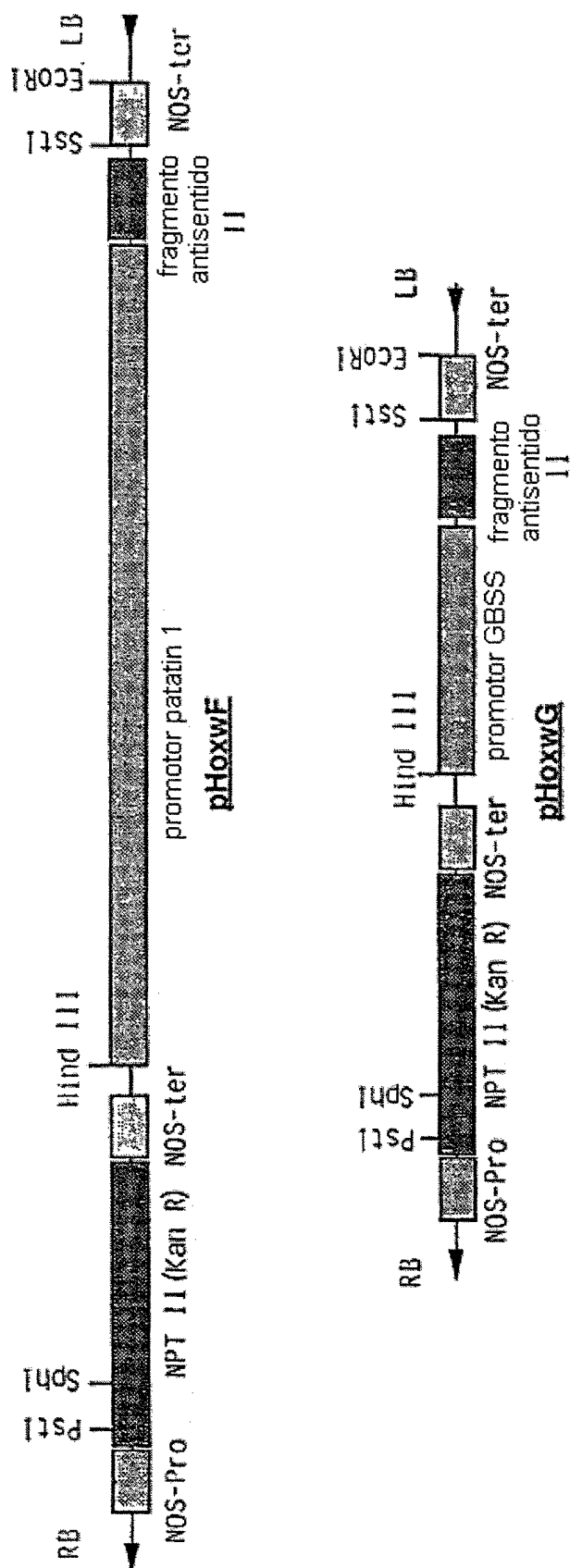
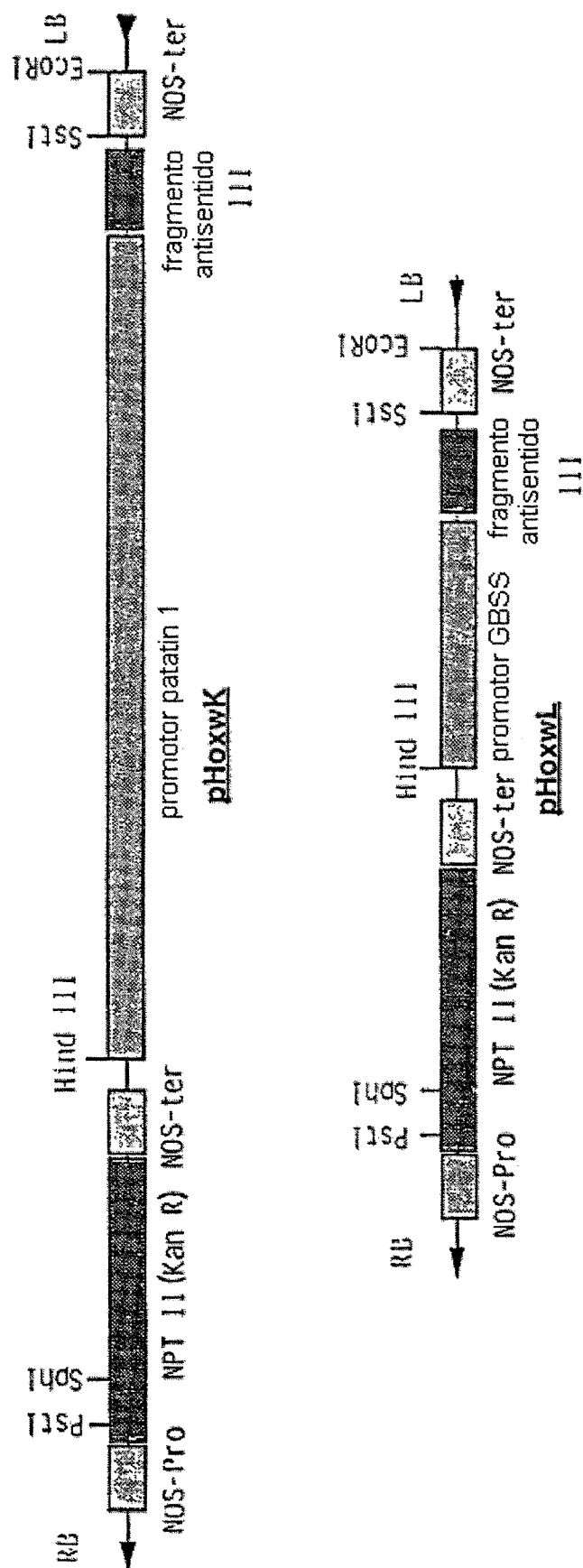


FIG.6



ES 2 268 748 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID No. 1

Molécula secuenciada: ADN genómico

Nombre : Fragmento de gen de GBSS de la patata

Longitud de secuencia: 342 bp

10	TGCATGTTTC CCTACATTCT ATTTAGAATC GTGTTGTGGT GTATAAACGT	50
	TGTTTCATAT CTCATCTCAT CTATTCTGAT TTTGATTCTC TTGCCTACTG	100
	TAAATCGGTGA TAAATGTGAA TGCTTCCTTT CTCTCAGAA ATCAATTTCT	150
	GTTTTGTTTT TGTTCACTCTG TAGCTTATTC TCTGGTAGAT TCCCCTTTTT	200
15	GTAGACCACA CATCAC ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC	243
	Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His	
	1 5	
20	TTT GTG TCA AGA AGC CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC	285
	Phe Val Ser Arg Ser Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr	
	10 15 20	
25	TTG TCA CAG ATA GGA CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT	327
	Leu Ser Gln Ile Gly Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn	
	25 30 35	
30	GGT TTA AGG GCT GTT	342
	Gly Leu Arg Ala Val	
	40	

ES 2 268 748 T3

SEQ ID No. 2

Molécula secuenciada: ADN genómico

Nombre : Fragmento de gen de GBSS de la patata

Longitud de secuencia: 2549 bp

10	AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val 45 50 55	42
15	ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly 60 65 70	84
20	TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile 75 80	126
25	TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly 85 90 95	168
30	CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala 100 105 110	207
35	GTAAGTCITT CTITCATTIG GTTACCTACT CATTCAATTAC TTATTTTGTT TAGTTAGITT CTACTGCATC AGTCTTTTTA TCATTTAG GCC CGC GGA Ala Arg Gly	257 304
40	CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys 115 120 125	346
45	GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu 130 135	386
50	CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTCCT GATTCAAGAA TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val 140 145	436 481
55	CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe 150 155 160	523
60	GTT GAG CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys 165 170	560

ES 2 268 748 T3

	TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT	610
	ATCTTTTAAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA	658
	Val Trp Gly Lys	175
5		
	ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT	700
	Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr	
	180 185	
10		
	CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA	736
	Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln	
	190 195 200	
15		
	GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT	786
	AATCGTTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT	832
	Ala Ala Leu Glu Ala Pro	205
20		
	AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA	874
	Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro	
	210 215 220	
25		
	TAT G GTAATTAAACA CATCCTAGTT TCAGAAAACT CCTTACTATA	918
	Tyr G	
30		
	TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTT GCCT ATTCCTGCAG GA GAG GAT	966
	ly Glu Asp	225
35		
	GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT	1008
	Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro	
	230 235	
40		
	TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG	1050
	Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu	
	240 245 250	
45		
	AAT GCC AAG GTAAATTTTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA	1089
	Asn Ala Lys	255
50		
	CGTTACCCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTTTCACA	1139
	TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA	1182
	Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln	260 265
55		
	GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT	1224
	Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro	
	270 275 280	
60		
	GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT	1263
	Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr	
	285 290	
65		
	GTAATTTATG TTAATATCAG AACTCCAACT TTTGAAAGCTG TTTTATATGCT	1313

ES 2 268 748 T3

	AGTAAATTGA GTTTTAAAA TTTTGCAGAT ATGAG AAG CCT GTT AAG	1360
	Lys Pro Val Lys	
	295	
5	GGT AGG AAA ATC AAC TGG ATG AAG GCT GGG ATA TTA GAA TCA	1402
	Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser	
	300 305 310	
10	CAT AGG GTG GTT ACA GTG AGC CCA TAC TAT GCC CAA GAA CTT	1444
	His Arg Val Val Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Leu	
	315 320 325	
15	GTC TCT GCT GTT GAC AAG GGA GTT GAA TTG GAC AGT GTC CTT	1486
	Val Ser Ala Val Asp Lys Gly Val Glu Leu Asp Ser Val Leu	
	330 335 340	
20	CGT AAG ACT TGC ATA ACT GGG ATT GTG AAT GGC ATG GAT ACA	1528
	Arg Lys Thr Cys Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Thr	
	345 350	
25	CAA GAG TGG AAC CCA GCG ACT GAC AAA TAC ACA GAT GTC AAA	1570
	Gln Glu Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Tyr Thr Asp Val Lys	
	355 360 365	
	TAC GAT ATA ACC ACT GTAAGATAAG ATTTTCCGA CTCCAGTATA	1615
	Tyr Asp Ile Thr Thr	
	370	
30	TACTAAATTA TTTTGTATGT TTATGAAATT AAAGAGTTCT TGCTAATCAA	1665
	AATCTCTATA CAG GTC ATG GAC GCA AAA CCT TTA CTA AAG GAG	1708
	Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys Glu	
	375 380	
35	GCT CTT CAA GCA GCA GTT GGC TTG CCT GTT GAC AAG AAG ATC	1756
	Ala Leu Gln Ala Ala Val Gly Leu Pro Val Asp Lys Lys Ile	
	385 390 395	
40	CCT TTG ATT GGC TTC ATC GGC AGA CTT GAG GAG CAG AAA GGT	1792
	Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly	
	400 405 410	
45	TCA GAT ATT CTT GTT GCT GCA ATT CAC AAG TTC ATC GGA TTG	1834
	Ser Asp Ile Leu Ala Val Ala Ile His Lys Phe Ile Gly Leu	
	415 420 425	
50	GAT GTT CAA ATT GTA GTC CTT GTAAGTACCA AATGGACTCA	1875
	Asp Val Gln Ile Val Val Leu	
	430	
55	TGGTATCTCT CTGTTTGAGT TTACTTGTC CGAACTGAA ATTGACCTGC	1925
	TACTCATCTT ATGCATCAG GGA ACT GGC AAA AAG GAG TTT GAG	1968
	Gly Thr Gly Lys Lys Glu Phe Glu	
	435 440	
60		
65		

ES 2 268 748 T3

	CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala 445 450	2010
5	AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile 455 460 465	2052
10	ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu 470 475 480	2094
15	CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr 485 490 495	2136
20	GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTTA CTGAGTTTTT AAAAAAGAA TCATAAGACC TTGTTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC TGCAAGCAAGC TTTTCATTTC TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu 500 505	2186 2236 2266 2330
25	GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly 510 515 520	2372
30	GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG Ala Phe Asn Val Glu 525	2417
35	TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTGTGTGCAT AAACATTAAAC TTATPGCTTC TTGAATTTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT Cys Asp Val Val Asp Pro Ala 530	2467 2512
40	GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT C Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala 535 540	2549
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 268 748 T3

SEQ ID No. 3

Molécula secuenciada: ADN genómico

Nombre: Fragmento de gen de GBSS de patata

Longitud de secuencia: 492 bp

5	GAG CTC TCC TGG AAG	GTAAGTGTGA	ATTGATAAT	TTGCGTAGGT	45
10	Glu Leu Ser Trp Lys				
	565				
15	ACTTCAGTTT GTTGTTCCTCG TCAGCACTGA TGCATTCCAA CTGGTGTTCCT				95
	TGCAG	GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG			127
		Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu			
		570	575		
20	CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA				169
	Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu				
	580	585	590		
25	GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT				211
	Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr				
	595	600	605		
30	CCT TAA	ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATTA			257
	Pro ***				
	606				
35	AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCTATTA TGGGGTCTCA				307
	ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGTCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC				357
	TGTAAATCC TGGTTAATGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG				407
	TGGATCAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTA CTACGTTTG CAACTAAATA				457
	CTTAGTAATG TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGT				492

SEQ ID No. 4

Molécula secuenciada: ADN genómico

Nombre: Promotor para el gen GBSS de patata

Longitud de secuencia: 987 bp

45	AAGCTTTAAC GAGATAGAAA ATTATGTTAC TCCGTTTTGT TCATTACTTA	50
	ACAAATGCAA CAGTATCTTG TACCAATCC TTTCTCTCTT TTCAAACCTT	100
	TCTATTTGGC TGTTGACGGA GTAATCAGGA TACAAACCAC AAGTATTTAA	150
	TTGACTCCTC CGCCAGATAT TATGATTTAT GAATCCTCGA AAAGCCTATC	200
50	CATTAAGTCC TCATCTATGG ATATACTTGA CAGTATCTTC CTGTTTGGGT	250
	ATTTTTTTTT CCTGCCAAGT GGAACGGAGA CATGTTATGA TGTATACGGG	300
	AAGCTCGTTA AAAAAAATA CAATAGGAAG AAAAGTAACA AACATTGAAT	350
	GTTGTTTTTA ACCATCCTTC CTTTAGCAGT GTATCAATTT TGTAAATAGAA	400
	CCATGCATCT CAATCTTAAT ACTAAATGCA AACTTAATAT AGGCTAAACC	450
55	AAGATAAAGT AATGTATTCA ACCTTTAGAA TTGTGCATTC ATAATTAGAT	500
	CTTGTTTTGT GTAAAAAAT AGAAAAATA TTTACAGTAA TTTGGAATAC	550
	AAAGCTAAGG GGGAAAGTAA TAATATTCTA GTGGAGGGAG GGACCAGTAC	600
	CAGTACCTAG ATATTATTTT TAATTACTAT AATAATAATT TAATTAACAC	650
60	GAGACATAGG AATGTCAAGT GGTAGCGTAG GAGGGAGTTG GTTTAGTTTT	700
	TTAGATACTA GGAGACAGAA CCGGACGGCC CATTGCAAGG CCAAGTTGAA	750
	GTCCAGCCGT GAATCAACAA AGAGAGGGCC CATAATACTG TCGATGAGCA	800
	TTTCCCTATA ATACAGTGTC CACAGTTGCC TCTGCTAAG GGATAGCCAC	850
	CCGCTATCTT CTTGACACGT GTCACGAAA CCTGCTACAA ATAAGGCAGG	900
65	CACCTCCTCA TTCTCACTCA CTCACTCACA CAGCTCAACA AGTGGTAAC	950
	TTACTCACTC TCCTCCAAAT ATTTCTGACT TCAATGCA	987

ES 2 268 748 T3

SEQ ID No. 5

Molécula secuenciada: ADN genómico

Nombre: gen GBSS de patata

5 Longitud de secuencia: 4964 bp

	AAGCTTTAAC	GAGATAGAAA	ATTATGTTAC	TCCGTTTTGT	TCATTACTTA	50
	ACAAATGCAA	CAGTATCTTG	TACCAAATCC	TTTCTCTCTT	TTCAAACCTT	100
10	TCTATTTGGC	TGTTGACGGA	GTAATCAGGA	TACAAACCAC	AAGTATTTAA	150
	TTGACTCCTC	CGCCAGATAT	TATGATTTAT	GAATCCTCGA	AAAGCCTATC	200
	CATTAAGTCC	TCATCTATGG	ATATACTTGA	CAGTATCTTC	CTGTTTGGGT	250
	ATTTTTTTTT	CCTGCCAAGT	GGAA CGGAGA	CATGTTATGA	TGTATACGGG	300
	AAGCTCGTTA	AAAAAAAATA	CAATAGGAAG	AAATGTAACA	AACATTGAAT	350
15	GTTGTTTTTA	ACCATCCTTC	CTTTAGCAGT	GTATCAATTT	TGTAATAGAA	400
	CCATGCATCT	CAATCTTAAT	ACTAAAATGC	AACTTAATAT	AGGCTAAACC	450
	AAGATAAAGT	AATGTATTCA	ACCTTTAGAA	TTGTGCATTTC	ATAATTAGAT	500
	CTTGTTTGTC	GTA AAAAATT	AGAAATATA	TTTACAGTAA	TTTGAATAC	550
20	AAAGCTAAGG	GGGAAGTAAC	TAATATTCTA	GTGGAGGGAG	GGACCAGTAC	600
	CAGTACCTAG	ATATTATTTT	TAATTACTAT	ATAATAAATT	TAATTAACAC	650
	GAGACATAGG	AATGTCAAGT	GGTAGCGTAG	GAGGGAGTTG	GTTTAGTTTT	700
	TTAGATACTA	GGAGACAGAA	CCGGACGGCC	CATTGCAAGG	CCAAGTTGAA	750
	GTCCAGCCGT	GAATCAACAA	AGAGAGGGCC	CATAATACTG	TCGATGAGCA	800
25	TTTCCCTATA	ATACAGTGTC	CACAGTTGCC	TTCTGCTAAG	GGATAGCCAC	850
	CCGCTATTCT	CTTGACACGT	GTCACTGAAA	CCTGCTACAA	ATAAGGCAGG	900
	CACCTCCTCA	TTCTCACTCA	CTCACTCACA	CAGCTCAACA	AGTGGTAACT	950
	TTTACTCATC	TCCTCCAATT	ATTTCTGATT	TCATGCATGT	TTCCCTACAT	1000
	TCTATTATGA	ATCGTGTTGT	GGTGTATAAA	CGTTGTTTCA	TATCTCATCT	1050
30	CATCTATTCT	GATTTTGATT	CTCTTGCCCTA	CTGTAATCGG	TGATAAATGT	1100
	GAATGCTTCC	TTTCTTCTCA	GAAATCAATT	TCTGTTTTGT	TTTTGTTTCAT	1150
	CTGTAGCTTA	TTCTCTGGTA	GATTCCTCTT	TTTGTAGACC	ACACATCAC	1199
	ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC TTT GTG TCA AGA AGC					1241
35	Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His Phe Val Ser Arg Ser					
	1	5		10		
	CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC TTG TCA CAG ATA GGA					1283
40	Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr Leu Ser Gln Ile Gly					
	15	20		25		
	CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT GGT TTA AGG GCT GTT					1325
	Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn Gly Leu Arg Ala Val					
	30	35		40		
45	AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA					1367
	Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val					
	45	50		55		
50	ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA					1409
	Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly					
	60	65		70		
55	TGC TCA SCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC					1451
	Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile					
	75	80				
60	TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT COT TGG AGC AAA ACT GGT GGA					1493
	Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly					
	85	90		95		

ES 2 268 748 T3

	CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala 100 105 110	1532
5	GTAAGTCTTT CTTTCATTTG GTTACCTACT CATTCATTAC TTATTTTGTT TAGTTAGTTT CTA CTGCAATC AGTCTTTTTA TCATTTAG GCC CGC GGA Ala Arg Gly	1582 1629
10	CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys 115 120 125	1671
15	GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu	1711
20	CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTTCT GATTCAAGAA TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val 140 145	1761 1806
25	CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe 150 155 160	1848
30	GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys	1885
35	TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT ATCTTTTAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTAAAG GTT TGG GGC AAA Val Trp Gly Lys 175	1935 1983
40	ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr 180 185	2025
45	CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln 190 195 200	2061
50	GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT AATCGTTTTT TTACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT Ala Ala Leu Glu Ala Pro 205	2111 2157
55	AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro 210 215 220	2199

ES 2 268 748 T3

	TAT G	GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAACT CCTTACTATA	2243
	Tyr G		
5		TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTTGCCCT ATTCCTGCAG GA GAG GAT	2291
		ly Glu Asp	225
10	GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT	2333	
	Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro	230	235
15	TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG	2375	
	Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu	240	245 250
20	AAT GCC AAG	GTAAAATTTT TTTGTATTCA CTCGATTGCA	2414
	Asn Ala Lys	255	
25	CGTTACCCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTTTACA	2464	
	TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA	2507	
	Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln	260	265
30	GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT	2549	
	Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro	270	275 280
35	GAT GAA BTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT	2588	
	Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr	285	290
40	GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCAACT TTTGAAGCTC TTTTGATGCT	2638	
	AGTAAATCGA GTTTTTTAAAA TTTTGCAGAT ATGAG AAG CCT GTT AAG	2685	
	Lys Pro Val Lys	295	
45	GGT AGG AAA ATC AAC TGG ATG AAG GCT GGG ATA TTA GAA TCA	2727	
	Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser	300	305 310
50	CAT AGG GTG GTT ACA GTG AGC CCA TAC TAT GCC CAA GAA CTT	2769	
	His Arg Val Val Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Leu	315	320 325
55	GTC TCT GCT GTT GAC AAG GGA GTT GAA TTG GAC AGT GTC CTT	2811	
	Val Ser Ala Val Asp Lys Gly Val Glu Leu Asp Ser Val Leu	330	335 340
60	CGT AAG ACT TGC ATA ACT GCG ATT GTG AAT GGC ATG GAT ACA	2853	
	Arg Lys Thr Cys Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Thr	345	350
65			

ES 2 268 748 T3

	CAA GAG TGG AAC CCA GCG ACT GAC AAA TAC ACA GAT GTC AAA Gln Glu Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Tyr Thr Asp Val Lys 355 360 365	2895
5	TAC GAT ATA ACC ACT GTAAGATAAG ATTTTCCGA CTCCAGTATA Tyr Asp Ile Thr Thr 370	2940
10	TACTAAATTA TTTTGTATGT TTATGAAATT AAAGAGTTCT TGCTAATCAA AATCTCTATA CAG GTC ATG GAC GCA AAA CCT TTA CTA AAG GAG Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys Glu 375 380	2990 3033
15	GCT CTT CAA GCA GCA GTT GGC TTG CCT GTT GAC AAG AAG ATC Ala Leu Gln Ala Ala Val Gly Leu Pro Val Asp Lys Lys Ile 385 390 395	3075
20	CCT TTG ATT GGC TTC ATC GGC AGA CTT GAG GAG CAG AAA GGT Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly 400 405 410	3117
25	TCA GAT ATT CTT GTT GCT GCA ATT CAC AAG TTC ATC GGA TTG Ser Asp Ile Leu Ala Val Ala Ile His Lys Phe Ile Gly Leu 415 420 425	3159
30	GAT GTT CAA ATT GTA GTC CTT GTAAGTACCA AATGGACTCA Asp Val Gln Ile Val Val Leu 430	3200
35	TGGTATCTCT CTTGTTGAGT TTACTTGTGC CGAAACTGAA ATTGACCTGC TACTCATCCT ATGCATCAG GGA ACT GGC AAA AAG GAG TTT GAG Gly Thr Gly Lys Lys Glu Phe Glu 435 440	3250 3293
40	CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala 445 450	3335
45	AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile 455 460 465	3377
50	ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu 470 475 480	3419
55	CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr 485 490 495	3461
60	GTAAGAACC GAAGAGCTTG TACCTTTTFA CTGAGTTTTT AAAAAAAGAA TCATAAGACC TTGTTTTCCA TCTAAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC TGCAGCAACC TTTTCATTTC TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT	3511 3561 3611

ES 2 268 748 T3

	CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT	3655
	Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu	
	500 505	
5	GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA	3697
	Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly	
	510 515 520	
10	GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG	3742
	Ala Phe Asn Val Glu	
	525	
15	TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC	3792
	TTATTGCTTC TTGAATTTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT	3837
	Cys Asp Val Val Asp Pro Ala	
	530	
20	GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT CTT GCA	3879
	Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala Leu Ala	
	535 540 545	
25	GTC TAT GGC ACC CTC GCA TTT GCT GAG ATG ATA AAA AAT TGC	3921
	Val Tyr Gly Thr Leu Ala Phe Ala Glu Met Ile Lys Asn Cys	
	550 555 560	
30	ATG TCA GAG GAG CTC TCC TGG AAG GTAAGTGTGA ATTTGATAAT	3965
	Met Ser Glu Glu Leu Ser Trp Lys	
	565	
35	TTGCGTAGGT ACTTCAGTTT GTTGTTCCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA	4015
	CTGGTGTTCCT TGCAG GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG	4057
	Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu	
	570 575	
40	CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA	4099
	Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu	
	580 585 590	
45	GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT	4141
	Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr	
	595 600 605	
50	CCT TAA ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATT	4187
	Pro ***	
	606	
55	AGCAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCCCTATTA TGGGGTCTCA	4237
	ATCATCTACA AAATGATGG TTTTGTCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC	4287
	TGTAAATGCC TGGTTAATGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG	4337
	TGGATCAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTA CTAAAGTTTG CAACTAAATA	4387
	CTTAAATAA TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGTAGCTA ATATATATGC	4437
	GTGAATTTGT TGTACCTTTT CTTGCATAAT TATTTGCAGT ACATATATAA	4487
	TGAATTTAG CCAAGGAATC AATGTTTCTT GCTCCGTCCT CCTTTGATGA	4537
	TTTTTTAACC AATACAGAGC TACTGTCTTA TGTATATAAT TTTGTTTAAA	4587
60	AGAAGTAATC AAATTCAAAT TAGTTGTTTG GTCATATGAA AGAAGCTGCC	4637
	AGGCTAACTT TGAGGAGATG GCTATTGAAT TTCAAAATGA TTATGTGAAA	4687
	ACAATGCAAC ATCTATGTCA ATCAACACTT AAATTATTGC ATTTAGAAAAG	4737
	ATATTTTGA GCCCATGACA CATTCAATTCA TAAAGTAAGG TAGTATGTAT	4787
	GATTGAATGG ACTACAGCTC AATCAAAGCA TCTCCTTTAC ATAACGGCAC	4837
	TGTCTCTTGT CTACTACTCT ATTGGTAGTA GTAGTAGTAA TTTTACAATC	4887
	CAAATTGAAT AGTAATAAGA TGCTCTCTAT TACTAAAGT AGTAGTATTA	4937
65	TTCTTTCGTT ACTCTAAAGC AACAAAA	4964