



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 808**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98961955 .6**

86 Fecha de presentación : **07.12.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1045632**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2000**

54 Título: **Planta de *Pisum sativum* sin almidón con niveles elevados de sacarosa.**

30 Prioridad: **08.12.1997 US 986616**
29.01.1998 US 15711

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: **Seminis Vegetable Seeds, Inc.**
2700 Camino del Sol
Oxnard, California 93030-7967, US

72 Inventor/es: **Webster, David y**
Burgess, Diane

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

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

Planta de *Pisum sativum* sin almidón con niveles elevados de sacarosa.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a una planta de *Pisum sativum* que contiene un gen recesivo que produce una semilla altamente rugosa que tiene un contenido bajo de almidón. Adicionalmente, la presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos para dicho gen recesivo y métodos para usar dichas secuencias de nucleótidos en la recombinação sitio específica.

10 **Antecedentes de la invención**

La arveja (*Pisum sativum* L.) es un cultivo alimenticio comercialmente importante y la semilla inmadura de la arveja (“guisantes”) son muy consumidos. Hay un gran número de genes que afectan a la síntesis del almidón o de carbohidratos en los guisantes. El primer gen proporcionado y mejor descrito es el gen *r* (ver White, O.E., *Proceedings of the American Philosophical Society*, 56: 487-588). Se cree que el mutante *r* se ha producido espontáneamente a principios del siglo diecisiete (ver Lamprecht, H., *Agri. Hortique Genetica* 14: 1-4 (1956)) y su semilla madura seca tiene una apariencia rugosa (por lo tanto “*r*”, derivada del latín, *rugosus* que significa “rugoso or seco”). La rugosidad de la semilla madura fue una de las características usadas por Mendel en los experimentos que lo llevaron a formular sus leyes hereditarias. (ver Mendel, G., *Verhandlungen des Naturforschenden Vereinds in Brünn* 4: 3-47 (1865)).

Alelos recesivos en el locus *r* no sólo tienen un efecto profundo en la forma de la semilla, sino que también tienen numerosos efectos en todos los niveles de desarrollo de la semilla. Wang, T.L., *et al.*, *Seed Science Research* 1:3-14 (1991). Específicamente, las semillas del mutante *r* contenían una proporción inferior de almidón que el tipo salvaje (aproximadamente el 30% peso en seco por oposición a aproximadamente el 50%) con la composición de almidón siendo alterada para contener una proporción más alta de amilosa y una proporción pequeña de amilopectina (con aproximadamente el 70% de peso en seco del almidón de las semillas mutantes siendo amilosa por oposición al 38% del almidón de tipo salvaje). Durante un largo periodo de tiempo, la base molecular de la mutación no estaba clara. La diferencia del nivel y composición del almidón en la semilla condujo a varios investigadores a examinar las distintas enzimas de la biosíntesis del almidón. *Id.* Estudios recientes indicaron que la mutación podía estar en la enzima ramificadora del almidón y esto fue confirmado cuando se demostró, usando un par de líneas casi-isogénicas salvo en los genes del locus *r* que los embriones *rr* carecían de una forma de la enzima ramificadora del almidón, a la cual se hace frecuentemente referencia como “SBE1”. Posteriormente, se demostró que el mutante fue provocado por una inserción del tipo transposón en el gen que codifica SBE1.

Un segundo locus *rugosus* recesivo denominado “*rb*” es también conocido. Los mutantes homocigotos recesivos en este locus muestran un fenotipo de semilla rugosa similar al de las plantas *rr*. No obstante, la cantidad de almidón y su composición en el mutante *rb* son diferentes a las del mutante *r*. Específicamente, la semilla del mutante *r* contiene aproximadamente el 30% peso en seco de almidón, del cual aproximadamente el 70% es amilosa. La semilla del mutante *rb* contiene aproximadamente el 36% peso en seco de almidón, del cual aproximadamente el 23% es amilosa. Se ha encontrado que la mutación *rb* resulta en una actividad reducida en la enzima ADP glucosa pirofosforilasa. La purificación de la enzima y los experimentos de Western blot han revelado la ausencia de una de las cuatro subunidades del polipéptido presentes en la enzima de tipo salvaje.

WO 98/01574 describe las variedades de *Pisum sativum* que contienen una mutación a la que se hace referencia como “*rug3*”. Las plantas que contienen la mutación *rug-3* producen semillas rugosas que tienen niveles bajos de almidón, altos niveles de sacarosa, al igual que un alto contenido proteico y lipídico. Se ha encontrado que la mutación *rug-3* está asociada con una reducción en la actividad de la enzima fosfoglucomutasa plástica (de ahora en adelante “PGM”). Según WO 98/01574, las semillas de guisante que contienen la mutación *rug-3* tienen un contenido de sacarosa superior al 6% en peso del peso total de la semilla según se obtiene en una lectura de tenderómetro que excede 120 unidades de tenderómetro.

La mutación *rug-3* descrita en WO 98/01574 fue inducida por medio de un programa de mutagénesis. Veinte mil semillas fenotípicamente redondas de tipo genéticamente salvaje (RR) (denominadas semilla “M1”) fueron tratadas con etilo metanosulfonato o N-metil-N-nitrosourea, que son mutágenos conocidos. La semilla M1 dio lugar a plantas M1 que contenían la semilla M2. La semilla M2 dio lugar a plantas M2 que contenían la semilla M3. La semillas M3 fueron analizadas por su contenido en producto de almacenamiento. Las semillas que mostraban una apariencia rugosa fueron seleccionadas de la generación M3. Se encontró que estas semillas contenían una gama amplia de almidón, de 0-60% como una proporción de peso en seco de la semilla madura. Dentro del almidón de estas semillas, el contenido de amilosa oscilaba entre 0-80%. También, el contenido lipídico de los guisantes oscilaba entre aproximadamente 1 y aproximadamente el 8% del peso en seco y la proteína oscilaba entre aproximadamente 24 y aproximadamente el 48%. WO 98/01574 no contiene ninguna información que caracterice al mutante *rug-3* excepto para describir cómo esta mutación fue inducida por medio de un programa mutagénico. Adicionalmente, WO 98/01574 no contiene ninguna información que distinga la secuencia de ADN del mutante *rug-3* de aquella del tipo salvaje y no contiene ninguna información sobre los efectos en el contenido de sólidos insolubles en alcohol.

WO 98/01574 también describe el aislamiento y caracterización de la secuencia de nucleótidos para la fosfoglucomutasa plástida del guisante de tipo salvaje. Según WO 98/01574, esta secuencia de nucleótidos puede ser introducida en una planta por medio de la tecnología del ADN recombinante para producir plantas transgénicas donde la expresión del gen PGM plástida es infrarregulada o inactivada en semillas en desarrollo.

El dulzor de los guisantes, asociado con un contenido de azúcar aumentado, es generalmente apreciado por los consumidores, que perciben que los guisantes más dulces tienen un mejor sabor. Por lo tanto, puesto que los guisantes son un cultivo alimenticio tan importante, hay una necesidad en la técnica de que los guisantes tengan un dulzor aumentado.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una planta de *Pisum sativum* que es resistente al hongo “Fusarium Wilt” y al hongo “Midiú pulverulento” y que contiene dentro de su genoma, un gen homocigoto recesivo, al que se hace referencia como el gen bsg. Se ha determinado que el gen bsg contiene una mutación en un intrón en un sitio de empalme 3’ del gen. Más específicamente, el gen bsg tiene la secuencia de nucleótidos genómica mostrada en la secuencia ID N°: 1 y contiene una mutación en el nucleótido 1548 en el dinucleótido AG del sitio de empalme 3’, donde el nucleótido A es sustituido por el nucleótido T.

Una planta de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg dentro de su genoma produce guisantes (conocidos en la técnica como semillas inmaduras) que muestran un nivel inferior de almidón, un nivel elevado de sacarosa y un nivel disminuido de sólidos insolubles en alcohol cuando se comparan con guisantes producidos por una planta de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma.

Adicionalmente, la presente invención contempla una planta de *Pisum sativum* que contiene un gen bsg homocigoto dentro de su genoma. El gen bsg tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO:1 y contiene una mutación en un intrón en el nucleótido 1548 en el dinucleótido AG del sitio de empalme 3’, donde el nucleótido A es sustituido por el nucleótido T.

Los guisantes de la presente invención contienen del 6.0 al 7.5 por ciento en peso fresco de sacarosa cuando se mide a un valor de tenderómetro de 90 a 110 y de 6.5 a 8.0 por ciento en peso de sólidos insolubles en alcohol cuando se mide a un valor de tenderómetro de 105. Además, los guisantes de la presente invención contienen del 5 al 30 por ciento en peso fresco más sacarosa que los guisantes producidos a partir de una planta de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma. Adicionalmente, los guisantes de la presente invención presentan veinte (20) por ciento menos sólidos insolubles en alcohol cuando se comparan con guisantes de una *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un proceso para producir guisantes que contienen niveles más altos de sacarosa y niveles inferiores de sólidos insolubles en alcohol que los guisantes que no contienen el gen bsg homocigoto dentro de su genoma. Dicho proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma, recolectar las semillas maduras resultantes, plantar las semillas maduras, crecer las semillas maduras en plantas de *Pisum sativum*, seleccionar las plantas de *Pisum sativum* con rasgos fenotípicos deseables; permitir que las plantas se autopolinicen hasta que se produzca una línea uniforme, permitir que la línea de *Pisum sativum* se autopolinice, seleccionar las plantas con los fenotipos deseables y recolectar los resultantes guisantes (también llamados “semillas maduras”).

En otra forma de realización, el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg dentro de su genoma, recolectar las semillas secas maduras, plantar las semillas recolectadas secas maduras, crecer las semillas maduras en plantas de *Pisum sativum*, permitir que las plantas se autopolinicen, recolectar las semillas resultantes secas maduras, seleccionar las semillas altamente rugosas maduras que no contienen granos de almidón organizados y que no se manchan de color morado cuando se tratan con una solución de yodina y yoduro potásico, plantar dichas semillas altamente rugosas maduras, crecer las semillas maduras en plantas de *Pisum sativum*, seleccionar las plantas con rasgos deseables fenotípicos, permitir que las plantas se autopolinicen hasta que una línea uniforme de *Pisum sativum* sea producida, permitir que la línea de *Pisum sativum* seleccionada se autopolinice, y recolectar los guisantes resultantes. La línea de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg dentro de su genoma puede contener cualquier combinación de los genes tal como el homocigoto r, rb, R o Rb dentro de su genoma. Los guisantes producidos por el proceso de la presente invención contienen del 6.0 al 7.5 por ciento en peso fresco de sacarosa cuando se mide a un valor de tenderómetro del 90 al 110 y del 6.5 al 8.0 por ciento en peso de sólidos insolubles en alcohol cuando se mide a un valor de tenderómetro de 105.

La presente invención también contempla un proceso para producir una semilla altamente rugosa madura de una planta de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg dentro de su genoma. En una forma de realización el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg dentro de su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg 30 dentro de su genoma y recolectar las semillas maduras resultantes.

En otra forma de realización, el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg dentro de su genoma con una línea de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg dentro de su genoma, recolectar las semillas maduras, plantar las semillas recolectadas maduras, crecer las semillas maduras en plantas de *Pisum sativum*, permitir que las plantas se autopolinicen, recolectar las semillas maduras, seleccionar las semillas altamente rugosas que no
 5 contengan granos de almidón organizados, plantar dichas semillas maduras y crecer las semillas en plantas de *Pisum sativum*, seleccionar las plantas con rasgos fenotípicos deseables, permitir que las plantas se autopolinicen hasta que una línea de *Pisum sativum* uniforme sea producida, permitir que la línea de *Pisum sativum* se autopolinice y recolectar las semillas maduras.

10 La presente invención también contempla una planta de *Pisum sativum* crecida a partir de la semilla madura anteriormente descrita y guisantes cosechados a partir de dicha planta.

En otra forma de realización, la presente invención contempla una molécula de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la fosfoglucomutasa plástida, donde la secuencia de nucleótidos contiene al menos una
 15 mutación en un intrón. La mutación en el intrón previene la escisión del intrón desde un transcrito primario durante una modificación postranscripcional del transcrito y produce al menos un ARNm aberrante para la traducción. Preferiblemente, la mutación es una mutación en un sitio de empalme 3' en el intrón. Más preferiblemente, la mutación se hace en un dinucleótido AG, donde el nucleótido A es sustituido por el nucleótido T. Esta molécula de ADN puede ser aislada y purificada e insertada en un vector de expresión que contiene la molécula de ADN, un promotor y una señal de poliadenilación. En este vector, el promotor está operativamente enlazado a la molécula de ADN y la molécula de
 20 ADN está operativamente enlazada a la señal de poliadenilación. El promotor puede ser el promotor 35S del virus mosaico de la coliflor y la señal de poliadenilación puede ser la señal de poliadenilación del gen 35S mosaico de la coliflor. Las células bacterianas, tales como las células de *Agrobacterium tumefaciens* y de *Agrobacterium rhizogenes*, y las células vegetales pueden ser transformadas con este vector.

25 En otra forma de realización adicional, la presente invención se refiere a una planta que contiene un gen que codifica la fosfoglucomutasa plástida dentro de su genoma, donde el gen contiene al menos una mutación en un intrón. La mutación en el intrón previene la escisión del intrón de un transcrito primario durante la modificación postranscripcional del transcrito y produce al menos un ARNm aberrante para la traducción. La planta que contiene
 30 tal gen mutado puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. Preferiblemente, la mutación es una mutación en un sitio de empalme 3' en el intrón. Más preferiblemente, la mutación está en un dinucleótido AG, donde el nucleótido A es sustituido por el nucleótido T.

En otra forma de realización adicional, la presente invención contempla una molécula de ADN aislada y purificada que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO: 1 al igual que un vector de expresión que contiene esta molécula de ADN, un promotor y una señal de poliadenilación. En este vector, el promotor está operativamente enlazado a la molécula de ADN y la molécula de ADN está operativamente enlazada a la señal de poliadenilación. El promotor puede ser el promotor 35S del virus mosaico de la coliflor y la señal de poliadenilación puede ser la señal de poliadenilación del gen 35S del virus mosaico de la coliflor. Las células bacterianas, tales como células
 40 de *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, y las células vegetales pueden ser transformadas con este vector.

Finalmente, en otra forma de realización adicional, la presente invención contempla un método para alterar el nivel de fosfoglucomutasa plástida expresada en una planta. El método para producir una planta recombinante o una
 45 célula vegetal implica transformar las células vegetales con un vector. El vector contiene un promotor, una señal de poliadenilación y una molécula de ADN teniendo sea (1) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO:1; o sea (2) una secuencia de nucleótidos que codifica la fosfoglucomutasa plástida donde la secuencia de nucleótidos contiene al menos un nucleótido que previene la escisión de al menos un intrón de un transcrito primario durante la modificación postranscripcional del transcrito y que produce al menos un ARNm aberrante para la traducción. El promotor está
 50 operativamente enlazado a la molécula de ADN y la molécula de ADN está operativamente enlazada a la señal de poliadenilación.

La segunda fase del método implica regenerar las células vegetales para proporcionar una planta diferenciada. La fase final del método implica identificar una planta transformada con un nivel alterado de fosfoglucomutasa plástida expresada en esta planta.
 55

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 muestra gránulos de almidón de tres tipos diferentes de semillas secas maduras de *Pisum sativum*. Fi-
 60 gura 1a muestra los gránulos de almidón de una semilla homogénea que contiene el gen homocigoto R dentro de su genoma. Figura 1b muestra los gránulos de almidón de una semilla rugosa conteniendo un gen homocigoto R dentro de su genoma. Figura 1c muestra la casi ausencia de gránulos de almidón y la presencia de material granuloso de composición desconocida en una semilla madura que contiene un gen bsg homocigoto.

65 Figura 2 muestra la biosíntesis del almidón en un cloroplasto.

Figura 3 muestra la biosíntesis del almidón en un amiloplasto.

Figura 4 muestra la separación electroforética de actividades de fosfoglucomutasa de una variedad de guisante conteniendo el gen homocigoto R dentro de su genoma y de una variedad de *Pisum sativum* conteniendo el gen bsg homocigoto dentro de su genoma. La sección 1 muestra el extracto de hoja de una variedad de planta conteniendo el gen bsg. La sección 2 muestra cloroplastos aislados de una variedad conteniendo el gen r. La sección 3 muestra un extracto de hoja de una variedad conteniendo el gen r. La sección 4 muestra cloroplastos aislados de una variedad conteniendo el gen r. La sección 5 muestra un extracto de hoja de una variedad conteniendo el gen bsg.

Figura 5 muestra una separación electroforética de actividades de fosfoglucomutasa de guisantes que contienen el gen r y de guisantes que contienen el gen bsg. La sección 1 muestra un extracto de cotiledoneo de una variedad que contiene el gen r. La sección 2 muestra un extracto de cotiledoneo de una variedad que contiene el gen bsg.

Figura 6 muestra parte de la secuencia genómica de PGM plástida de una variedad de bsg introgresado en Frimousse (de ahora en adelante denominada como el "mutante") (SEC ID NO: 1). Los exones están mostrados en negrita.

Figura 7 muestra parte de la secuencia genómica de la variedad de semilla uniforme de *Pisum sativum* llamada "Frimousse" (de ahora en adelante denominada como el "tipo salvaje") (SEC ID NO:2). Los exones están mostrados en negrita.

Figura 8 muestra un análisis de Northern blot de ARN de tipo salvaje y plantas mutantes hibridizadas con una sonda de PGM plástida. La sección 1 muestra el ARN total de un cotiledón de tipo salvaje. La sección 2 muestra el ARN total de un cotiledón mutante. La sección 3 muestra el ARN total de un cotiledón de tipo salvaje.

Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos de fosfoglucomutasa plástida de tipo salvaje (descrita en WO 98/01574) los cebadores PGM-Fp (CACTGTTACAGACTCGATCAATGG - SEC ID NO:3), PGM-F91 (CAGACTCGA CAACTTCATCATCTCT - SEC ID NO:4), PGM-Fb (GATTGCTGATATCCCGATG - SEC ID NO:5), PGM-F827 (GACCCAGTTTCTGATTACCTGGAG - SEC ID NO: 6), PGM-Rg (GGTTTACATTTGATGCCATGCATGC - SEC ID NO: 7), PGM-R1262 (TCAAGGGTCT TGCACGATCAATG - SEC ID NO: 8), PGM-R1816 (TCTGCTGGTG CAACTGTTAG AGTG - SEC ID NO:9) y PGM-Rf (CAAAGCTCAAAGACTTCACAGGGAGA - SEC ID NO:10) que fueron usados en la PCR para amplificar el PGM ADNc de la semilla poli(A)+ de tipo salvaje y mutante.

Figura 10 muestra la amplificación por PCR del PGM ADNc plástido del ARN de la semilla poli(A)+ de tipo salvaje (representado por una "F") y f (representado por un "Fm").

Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente del PGM ADNc plástido de tipo salvaje (SEC ID NOS:13 y 14).

Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente del PGM ADNc1 plástido del mutante (SEC ID NOS:15 y 16).

Figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente del PGM ADNc2 plástido del mutante (SEC ID NOS:17 y 18).

Figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente del PGM ADNc3 plástido del mutante (SEC ID NOS:19 y 20).

Descripción detallada de la invención

Listado de secuencias

La aplicación presente también contiene un listado de secuencias que contiene 21 secuencias. El listado de secuencias contiene secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos. Para las secuencias de nucleótidos, los pares de bases están representados por los códigos de bases siguientes:

ES 2 268 808 T3

	<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
	A	A; adenina
5	C	C; citosina
	G	G; guanina
	T	T; timina
	U	U; uracilo
10	M	A o C
	R	A o G
	W	A o T/U
	S	C o G
	Y	C o T/U
15	K	G o T/U
	V	A o C o G; no T/U
	H	A o C o T/U; no G
	D	A o G o T/U; no C
20	B	C o G o T/U; no A
	N	(A o C o G o T/U)

Los aminoácidos mostrados en la aplicación están en forma de L y están representados por las abreviaturas de tres letras de los aminoácidos siguientes:

	<u>Abreviatura</u>	<u>Nombre de aminoácido</u>
30	Ala	L-alanina
	Arg	L-arginina
	Asn	L-asparagina
	Asp	Ácido L-aspártico
35	Asx	Ácido L-aspártico o asparagina
	Cys	L-cisteína
	Glu	Ácido L-glutámico
	Gln	L-glutamina
	Glx	L-glutamina o Ácido glutámico
40	Gly	L-glicina
	His	L-histidina
	Ile	L-isoleucina
	Leu	L-leucina
45	Lys	L-lisina
	Met	L-metionina
	Phe	L-fenilalanina
	Pro	L-prolina
50	Ser	L-serina
	Thr	L-treonina
	Trp	L-triptófano
	Tyr	L-tirosina
55	Val	L-valina
	Xaa	L-desconocido u otro

Descripción de las variedades de guisante conteniendo el gen bsg

La presente invención se refiere a un guisante nuevo, *Pisum sativum*, que contiene dentro de su genoma, un gen homocigoto recesivo, denominado “bsg” (bsg refiriéndose a “grano de almidón soplado”). Como se utiliza en este caso, el término “genoma” se refiere al material entero hereditario (ADN) en una célula que está compuesta por uno o más cromosomas.

Es bien conocido en la técnica que los guisantes son semillas inmaduras de una planta de *Pisum sativum*. Los guisantes o semillas inmaduras normalmente no muestran una apariencia rugosa, sino una apariencia uniforme y redonda. Estos guisantes contienen el gen R como el alelo dominante. Los guisantes o semillas inmaduras son consumidas por

los individuos en forma de alimentos. Las semillas maduras de una planta de *Pisum sativum* son semillas secas. Una semilla madura muestra una apariencia rugosa si contiene los genes *r* o *rb* o el gen *bsg* dentro de su genoma. Las semillas maduras son usadas para plantar y producir una planta de *Pisum sativum*.

5 La planta de *Pisum sativum* de la presente invención contiene un gen *bsg* homocigoto dentro de su genoma y produce semillas maduras que son altamente rugosas, tienen un contenido de almidón muy bajo y altos niveles de sacarosa. Las semillas maduras de la presente invención también contienen un gen *bsg* homocigoto dentro de su genoma y contienen pocos, si los hay, gránulos de almidón organizados cuando se examinan bajo un microscopio. En vez de contener gránulos de almidón, las semillas maduras de la presente invención contienen material granuloso de
10 composición desconocida.

La Figura 1 demuestra la apariencia bajo un microscopio de gránulos de almidón en varios tipos de semillas de *Pisum sativum* maduras. La Figura 1 a muestra la apariencia de gránulos de almidón en semillas uniformes maduras que contienen el gen *R* homocigoto o heterocigoto con su genoma. Estas semillas maduras tienen gránulos de almidón enteros y no contienen los genes homocigotos *r* o *bsg* dentro de su genoma. Cuando las semillas maduras mostradas en la figura la son tratadas con una solución de yodina y yoduro potásico, las semillas maduras se manchan de color morado indicando la presencia de almidón. La Figura 1 b muestra la apariencia de los gránulos de almidón en una semilla rugosa madura que contiene el gen homocigoto *r* dentro de su genoma. Los gránulos de almidón en la semilla rugosa madura conteniendo el gen homocigoto *r* muestran un modelo de fractura en forma de estrella similar al de un pastel que ha sido marcado en 5 o 6 trozos. La Figura 1c muestra una semilla madura de la presente invención que contiene el gen *bsg* homocigoto dentro de su genoma. Como se muestra en la figura 1c, las semillas maduras de la presente invención contienen pocos, si los hay, gránulos de almidón organizados pero en cambio contienen material granuloso. Cuando las semillas maduras mostradas en la figura 1c son tratadas con una solución de yodina y yoduro potásico, las semillas maduras no pueden mancharse de color morado debido a la casi ausencia de almidón.

25 La mutación de *bsg* según la presente invención no fue inducida por un programa mutágeno como la mutación de rug-3 descrita en WO 98/01574. En cambio, la mutación de *bsg* según la presente invención es una mutación natural que fue observada en una cosecha de semilla uniforme de una planta de *Pisum sativum* que contenía el gen *R* como el alelo dominante.

30 Debido a la ausencia de almidón, la planta de *Pisum sativum* de la presente invención también produce los guisantes o semillas inmaduras que contienen niveles elevados de sacarosa. Como se utiliza en este caso, el término “sacarosa” se refiere al disacárido compuesto por glucosa y fructosa.

35 Los guisantes de la presente invención contienen el gen *bsg* homocigoto dentro de su genoma y contienen también de aproximadamente de 6.0 a aproximadamente 7.5, preferiblemente de aproximadamente 6.2 a aproximadamente 7.1 por ciento en peso fresco de sacarosa cuando se mide a un valor de tenderómetro de aproximadamente 90 a aproximadamente 110. Un tenderómetro es un dispositivo que se usa para medir la dureza de los guisantes, alubias y habas. Según se utiliza en este caso, el término “valor de tenderómetro” se refiere a una medida de la fuerza requerida para aplastar aproximadamente 200 gramos de guisantes usando un tenderómetro. Los valores de tenderómetro más altos indican una madurez más avanzada de los guisantes. Los guisantes verdes procesados son normalmente cosechados a valores de tenderómetro de 90 a 120.

45 Los guisantes de la presente invención contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente el 30 por ciento en peso fresco, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente el 20 por ciento en peso fresco, más sacarosa que los guisantes producidos a partir de una planta de *Pisum sativum* que no contienen el gen *bsg* homocigoto dentro de su genoma, en particular las variedades rugosas de guisantes. Como se utiliza en este caso, el término “guisantes rugosos” se refiere a *Pisum sativum* que contienen un gen homocigoto *r* (rugosus) u homocigoto *rb* en su genoma, de modo que la apariencia de la semilla madura es rugosa. Quantum es la variedad más dulce de guisante conocida por el inventor que contiene el gen *r* homocigoto en su genoma. Quantum está comercialmente disponible por Asgrow Brand, de Seminis Vegetable Seeds, Inc., el cesionario de la presente invención. Los guisantes Quantum contienen de aproximadamente 5.0 a aproximadamente el 6.2 por ciento en peso fresco de sacarosa.

55 Adicionalmente, los guisantes de la presente invención muestran un nivel débil de sólidos insolubles en alcohol (AIS). Un AIS bajo está correlacionado con una alta calidad del producto. Los guisantes de la presente invención contienen de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.0, preferiblemente de aproximadamente 7.0 a aproximadamente el 7.5 por ciento en peso de sólidos insolubles en alcohol cuando se miden a un valor de tenderómetro de aproximadamente 105. Además, los guisantes de la presente invención presentan un veinte (20) por ciento menos de AIS que los guisantes que no contienen el gen *bsg* homocigoto en su genoma (tales como las variedades rugosas de guisantes). Por ejemplo, los guisantes de la presente invención contienen un veinte (20) por ciento menos de AIS que los guisantes producidos por la variedad Quantum.

65 Además, las semillas maduras de la presente invención contienen muy poco almidón. Más específicamente, las semillas de la presente invención contienen de aproximadamente el 0.01 al 3.0 por ciento en peso en seco, preferiblemente, de aproximadamente el 0.5 al 2.0 por ciento peso en seco de almidón.

Historia de reproducción

Los guisantes de la presente invención que contienen un gen bsg homocigoto en su genoma fueron desarrollados como sigue. En 1990, una semilla rugosa mutante fue descubierta en una cosecha de Frimousse, que es una variedad de semilla uniforme de *Pisum sativum* sin bloqueo en la conversión del azúcar en almidón (este mutante se designa “bsg introgresado en Frimousse”). Este cultivo ha sido hecho crecer en una estación de reproducción en Twin Falls, Idaho. Este único mutante fue descubierto cuando el cultivo estaba pasando por pruebas de uniformidad de las semillas. Frimousse está comercialmente disponible por Asgrow Brand, de Seminis Vegetable Seeds, Inc. Una planta de este mutante de semilla rugosa fue luego cruzado con la variedad Encore de *Pisum sativum* en un invernadero en Twin Falls, Idaho. Encore es una variedad de *Pisum sativum* comercial de una gran criba de plena temporada, de color de baya verde oscuro (freezer), calidad bien procesada, y resistencia al hongo Mildiú pulverulento y Race 1 del hongo Fusarium Wilt. La semilla seca madura de Encore está disponible por Asgrow Brand de Seminis Vegetable Seeds. Una selección que resultó de este cruce contenía muy poco almidón y fue marcada como M82.1.

En diciembre 1991, la semilla de M82.1 y la variedad Lazor fueron plantadas en un invernadero en Twin Falls, Idaho. Un cruce fue hecho entre M82.1 y Lazor. Lazor es una variedad de *Pisum sativum* de final de temporada de una gran criba de color de baya verde oscuro y buena calidad procesada y es resistente al hongo Mildiú pulverulento y Race 1 del hongo Fusarium Wilt. Una semilla seca madura de Lazor está comercialmente disponible por Asgrow brand de Seminis Vegetable Seeds, Inc., cesionario de la presente invención. La resultante semilla madura fue recolectada y codificada como “BC0”. En Mayo 1992, las semillas de BC0 y Lazor fueron plantadas en el invernadero anteriormente descrito y cruzadas. La resultante semilla madura fue recolectada y codificada como “BC1”. En Septiembre 1992, las semillas de BC1 y Lazor fueron plantadas en el invernadero anteriormente descrito y cruzadas. La resultante semilla madura fue recolectada y codificada como “BC2F1”. En Febrero 1993, las semillas de BC2F1 fueron plantadas en el mismo invernadero y se dejaron autopolinizarse. Las resultantes semillas maduras fueron recolectadas y codificadas como “BC2F2”. En abril 1993, varias semillas de BC2F2 que no contenían ningún grano de almidón sin organizar fueron seleccionadas.

Más tarde en 1993, las semillas de BC2F2 antes seleccionadas fueron luego plantadas en un campo en Twin Falls, Idaho. De la resultante población, las líneas individuales que contenían las mejores características hortícolas fueron luego seleccionadas y se dejaron autopolinizarse. Los criterios de selección incluían una emergencia uniforme, del tipo de planta corta y erecta, alta productividad y uniformidad de la vaina. Las resultantes semillas maduras fueron recolectadas y codificadas como “BC2F3”. En abril de 1994, la semilla BC2F3 fue plantada en Twin Falls, Idaho.

De la resultante población, las líneas individuales que presentaban las mejores características hortícolas fueron seleccionadas y se dejaron autopolinizarse. La semilla resultante fue recolectada y codificada como “BC2F4”. En abril de 1995, la semilla BC2F4 fue plantada bajo el código “R954593” en Twin Falls, Idaho. Se realizaron observaciones durante la temporada de crecimiento que indicaron que la línea era uniforme y la reproducción real. La variedad resultante fue dejada autopolinizarse y la resultante semilla fue recolectada y codificada como 8500017. En invierno 1995, la semilla 8500017 fue plantada en Guatemala y la semilla resultante agrupada para un posterior ensayo y aumento.

Las semillas maduras de 8500017 desarrolladas como resultado de la reproducción anterior han sido depositadas según el tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (de ahora en adelante “ATCC”), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852 el 3 Noviembre, 1997 y han recibido el número de acceso 209425. Este depósito de 8500017 fue realizado según el tratado de Budapest y será mantenido en el depositario de la ATCC, que es un depositario público, durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente, o para la vida ejecutable de la patente, que será más larga, y será sustituida si se vuelve inviable durante este periodo. Adicionalmente, el solicitante ha satisfecho todos los requisitos de 37 C.F.R. Secciones 1.801-1.809, que incluyen proporcionar una indicación de la viabilidad de la muestra. Además, se ha solicitado un Certificado de Protección de Variedad Vegetal el 19 Febrero, 1998 al Departamento de Agricultura Estadounidense y se le ha asignado el número de depósito PVP 9800121.

Procesos para desarrollar plantas de Pisum sativum con niveles más altos de sacarosa

La presente invención también contempla un proceso para desarrollar plantas de *Pisum sativum* que producen guisantes con niveles más altos de sacarosa que los guisantes producidos por plantas de *Pisum sativum* que no contienen el gen bsg en su genoma. En una forma de realización, el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto en su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que también contiene el gen bsg homocigoto en su genoma, recolectar la resultante semilla madura, plantar la semilla madura, crecer la semilla madura en plantas de *Pisum sativum*, seleccionar las plantas de *Pisum sativum* con rasgos fenotípicos deseables, dejar que las plantas seleccionadas se autopolinicen hasta que se produzca una línea uniforme, dejar que la línea de *Pisum sativum* se autopolinice, y recolectar los guisantes resultantes.

En otra forma de realización, el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto en su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg en su genoma y recolectar la resultante semilla madura. La línea de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg dentro de su genoma puede en cambio contener otros genes o combinación de genes dentro de su genoma. Por ejemplo, la variedad o línea puede contener el gen r o rb, o ambos, el cual produce una semilla rugosa, o el gen R que produce una semilla uniforme.

La semilla recolectada madura contiene el gen bsg heterocigoto dentro de su genoma. Las semillas recolectadas maduras son plantadas y dejadas crecer. Las plantas de *Pisum sativum* crecidas a partir de dicha semilla son dejadas autopolinizarse. Como resultado de la autopolinización, las plantas producen varios tipos de semillas secas maduras con genes diferentes dentro de sus genomas. Un tipo de semilla madura que es producida es altamente rugosa. Esta semilla contiene granos de almidón prácticamente sin organizar y que no se mancha de color morado al tratarse con una solución de yodina y una solución de yodina de potasio. Esta semilla madura contiene el gen bsg homocigoto dentro de su genoma. La semilla madura que contiene el gen bsg es seleccionada, recolectada y plantada. Las plantas de *Pisum sativum* que tienen rasgos fenotípicos deseables son seleccionadas y dejadas autopolinizarse hasta que se produzca una línea de *Pisum sativum* uniforme. La línea uniforme es dejada autopolinizarse y los guisantes resultantes son recolectados.

Según se utiliza en este caso, el término “línea” significa una población de semillas o plantas genéticamente y fenotípicamente similar.

Según se utiliza en este caso, el término “línea de *Pisum sativum* uniforme” significa una población de semillas o plantas genéticamente y fenotípicamente similares que pueden ser reproducidas por un incremento del volumen sin alterar las características descriptivas de la población. Una variedad es de tipo uniforme que es incrementada para el comercio.

La presente invención también contempla guisantes producidos por cualquiera de los procesos anteriormente descritos. Los guisantes producidos conforme a los procesos mencionados arriba contienen del 6.0 al 7.5, preferiblemente del 6.5 al 7.0 por ciento en peso fresco de sacarosa cuando se mide a un valor de tenderómetro del 90 al 110 y del 6.5 al 8.0, preferiblemente del 7.0 al 7.5 por ciento en peso de sólidos insolubles en alcohol cuando se mide a un valor de tenderómetro de 105. Además, los guisantes producidos por el proceso de la presente invención también contienen niveles más altos de sacarosa que los guisantes producidos a partir de una planta de *Pisum sativum*, que no contiene el gen bsg homocigoto en su genoma. Además, los guisantes producidos según el proceso de la presente invención contienen del 5 al 30 por ciento en peso fresco, preferiblemente de aproximadamente del 10 a aproximadamente el 20 por ciento en peso fresco, más sacarosa que los guisantes producidos por una planta de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg dentro de su genoma. Además, los guisantes producidos según el proceso de la presente invención contienen sobre un veinte (20) por ciento menos de AIS que los guisantes producidos a partir de una planta de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg dentro de su genoma.

La presente invención también contempla un proceso para producir una semilla madura altamente rugosa de plantas de *Pisum sativum* que contienen el gen bsg homocigoto en su genoma. En una forma de realización, el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto en su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto en su genoma y recolectar las semillas maduras resultantes. La presente invención también contempla las plantas de *Pisum sativum* crecidas a partir de dicha semilla seca madura y guisantes cosechados a partir de dichas variedades.

En una segunda forma de realización, el proceso implica cruzar una línea de *Pisum sativum* que contiene el gen bsg homocigoto en su genoma con una segunda línea de *Pisum sativum* que no contiene el gen bsg homocigoto en su genoma y recolectar las semillas maduras resultantes. Después de recolectar la semilla madura, se planta y desarrolla en plantas que son dejadas autopolinizarse. La semilla madura resultante es recolectada y las semillas altamente rugosas maduras que no contienen ningún grano de almidón organizado son seleccionadas. Estas semillas maduras son plantadas y dejadas desarrollarse en plantas de *Pisum sativum*. Las plantas de *Pisum sativum* que tienen rasgos deseables fenotípicos son seleccionadas. Estas plantas seleccionadas son dejadas autopolinizarse hasta que se produzca una línea de *Pisum sativum* uniforme. La línea uniforme es dejada autopolinizarse y las semillas maduras son recolectadas. La presente invención también contempla plantas de *Pisum sativum* crecidas a partir de dicha semilla seca madura y los guisantes cosechados a partir de dichas variedades.

Caracterización molecular del gen bsg

Se ha encontrado que las plantas de *Pisum sativum* que contienen el gen bsg presentan una reducción significativa en la actividad de la enzima fosfoglucomutasa plástica (de ahora en adelante denominada “PGM”) en hojas y cotiledones (ver Figuras 4 y 5). La importancia de esta carencia de actividad PGM plástica es que en el plasto, no puede producirse la conversión de glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato. La importancia de esta reacción en la síntesis del almidón es que la glucosa-1-fosfato es el sustrato para la vía destinada de la síntesis del almidón. Sin un suministro de glucosa-1-fosfato, no puede tener lugar la síntesis del almidón. El metabolismo del azúcar y el almidón son conocidos por estar relacionados en las plantas. Se cree que una alteración en los niveles de una enzima implicada en la vía de la síntesis del almidón resulta en una alteración del nivel de azúcar en una planta y por lo tanto en niveles más altos de sacarosa en la semilla (guisantes).

Se ha descubierto que las plantas de *Pisum sativum* que contienen el gen bsg contienen una mutación en un sitio de empalme 3' en un intrón en un gen que codifica la fosfoglucomutasa plástica. Más específicamente, la mutación está en el dinucleótido AG del sitio de empalme 3', donde el nucleótido A es sustituido por el nucleótido T.

La transcripción es la síntesis del ARN en un molde de ADN por acoplamiento de bases complementarias dentro del núcleo de una célula. La molécula de ARN inicialmente transcrita del molde de ADN es conocida como el

“transcrito primario”. El transcrito primario que está transcrito del ADN contiene “intrones”, a los que se hace frecuentemente referencia como “secuencias intervinientes”. Los intrones no están en la forma madura del transcrito primario al que se hace referencia como “ARN mensajero” o “ARNm” en abreviatura. Los intrones son eliminados durante la modificación postranscripcional del transcrito primario. Varios acontecimientos tienen lugar durante la modificación postranscripcional del transcrito primario, uno de ellos incluye la eliminación de los intrones y el empalme de los exones entre sí durante varias reacciones que tienen lugar dentro de un espliceosoma. Una vez completadas las modificaciones postranscripcionales, un ARNm maduro sale del núcleo y entra en el citoplasma.

En la presente invención, la mutación en el sitio de empalme 3' en un intrón en un gen que codifica la fosfoglucomutasa plástida previene la escisión de este intrón durante la modificación postranscripcional del transcrito primario. Puesto que el intrón no es cortado del transcrito primario, esto da lugar a tres ARNms aberrantes. Según se utiliza en este caso, el término “aberrante” significa diferente de la ARNm PGM plástida de tipo salvaje correctamente dividida conteniendo secuencias de intrones no cortadas o exones cortados de forma incorrecta. Al traducirse, los ARNms aberrantes producen un polipéptido de PGM plástida que es truncado y por lo tanto, de longitud más corta que el polipéptido producido por el tipo salvaje, que tiene aproximadamente 627 aminoácidos de longitud (ver WO 98/01574 que describe la clonación de una secuencia de polinucleótidos que codifica la fosfoglucomutasa plastidial del guisante tipo salvaje con una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 627 aminoácidos). La alteración de este polipéptido de PGM plástida está considerada la responsable de la reducción significativa en la actividad de esta enzima en las variedades de *Pisum sativum* que contienen el gen bsg. Esta mutación del gen bsg será descrita de forma más completa más abajo.

Una parte de la secuencia de nucleótidos genómica de la PGM plástida del bsg mutante ha sido caracterizada y está mostrada en la figura 6 y en la SEC ID NO: 1. Una parte de la secuencia de nucleótidos genómica de la PGM plástida de una variedad convencional de la semilla uniforme de *Pisum sativum*, llamada “Frimousse”, que está comercialmente disponible por Seminis Vegetable Seeds, Inc., cesionario de la presente invención, ha sido caracterizada y está mostrada en la figura 7 y SEC ID NO:2. Esta variedad convencional de la semilla uniforme de *Pisum sativum* de ahora en adelante se denominará el “tipo salvaje”. En las Figuras 6 y 7, los exones están mostrados en negrita.

Una comparación de la secuencia de nucleótidos genómica de tipo salvaje con la secuencia de nucleótidos genómica del bsg mutante reveló una única mutación en uno de los intrones en la secuencia de nucleótidos de la PGM plástida en el bsg mutante. Específicamente, en el bsg mutante, en el nucleótido 1594, una A en el dinucleótido AG del sitio de empalme 3' es sustituida por una T (ver asterisco en las Figuras 6 y 7). Los sitios de empalme son regiones que contienen unos nucleótidos que residen al final de los intrones y funcionan en las reacciones de escisión y de empalme durante el tratamiento de los transcritos de genes. El dinucleótido AG/ del sitio de empalme 3' es invariable en los intrones de plantas superiores de origen natural (Simpson y Filipowicz *Plant Mol. Biol.* 32:1-41 (1996). Es conocido en el maíz, por ejemplo, que esta misma mutación, AG*TG, anula el tratamiento (ver Carle-Urioste *et al. Plant Mol. Biol.* 26:1785-1795 (1994)).

Esta mutación en el sitio de empalme 3' resulta en tres transcritos aberrantes que son producidos durante la transcripción. El transcrito más grande contiene no sólo el intrón con el sitio de empalme 3' mutado sino que también un intrón secuencia abajo. No está claro por qué este intrón secuencia abajo es retenido. La retención de estos dos intrones en este transcrito resulta en un polipéptido de PGM plástida que es inmediatamente truncado por un codón de terminación cerca del extremo 5' del primer intrón retenido. Esto resulta en la pérdida de aproximadamente 173 aminoácidos del terminal carboxilo del polipéptido de PGM plástida. El análisis de Northern sugiere que este primer transcrito es el transcrito más importante que se acumula en el bsg mutante (ver figura 8).

El segundo transcrito es del mismo tamaño aproximadamente que el transcrito de tipo salvaje, pero le faltan aproximadamente los 11 primeros nucleótidos del exón directamente secuencia abajo del intrón mutado. Esto resulta de la utilización de un dinucleótido AG críptico del sitio de empalme 3' en el exón secuencia abajo. Como resultado, se crea una mutación de desplazamiento en el marco de lectura y 23 aminoácidos son sustituidos del marco de lectura incorrecto por los 174 aminoácidos del C-terminal de la PGM plástida.

El tercer transcrito es más pequeño que el transcrito de tipo salvaje debido a una supresión del exón de 142 pares de bases inmediatamente secuencia abajo del intrón mutado. Esto resulta de la sustitución del sitio de empalme 3' en el intrón secuencia abajo por el sitio de empalme 3' mutado. Como resultado, se crea una mutación de desplazamiento en el marco de lectura y 9 aminoácidos son sustituidos por los 173 aminoácidos del C-terminal de la PGM plástida.

El polipéptido modificado de la PGM plástida codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 y mostrado en la figura 6 está considerado el responsable de la reducción significativa en la actividad de esta enzima en las variedades que contienen esta mutación.

Debe ser reconocido que las plantas de *Pisum sativum* que contienen mutaciones en el gen de PGM plástida además de la mutación anteriormente descrita en el sitio de empalme 3' en el intrón del gen de PGM plástida, al igual que las mutaciones en genes a parte del gen de PGM plástida, están también comprendidos en esta invención.

Además, se debería reconocer además que la presente invención comprende cualquier planta que contiene una o más mutaciones en un gen que codifica la fosfoglucomutasa plástida. Específicamente, el gen debe contener al menos una mutación en uno o más intrones. La mutación debe prevenir la escisión de uno o más intrones de un transcrito

primario durante la modificación postranscripcional del transcrito que resulta en la producción de una o más moléculas de ARNm aberrante para la traducción. Durante la traducción, este ARNm aberrante produce un polipéptido de PGM plástida que está truncado o bien es más grande que el polipéptido de PGM plástida de tipo salvaje. Los tipos de plantas comprendidos en la presente invención incluyen las plantas “monocotiledóneas” (frecuentemente denominadas “monocots”) o “dicotiledóneas” (frecuentemente denominadas “dicots”). Una “planta monocotiledónea” se refiere a una planta cuyas semillas tienen sólo un cotiledón, u órgano del embrión que almacena y absorbe los alimentos. Una “planta dicotiledónea” se refiere a una planta cuyas semillas tienen dos cotiledones.

Moléculas de ADN según la presente invención

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una molécula de ADN. Se cree que la introducción en una planta de un vector de expresión conteniendo una molécula de ADN aislada y purificada de la presente invención (tal y como se define de ahora en adelante) insertada en la dirección sentido o antisentido resultará en una alteración, específicamente, una reducción, en los niveles de expresión del gen de PGM plástida nativo. Por ejemplo, es bien conocido que la expresión genética en plantas transgénicas puede ser inhibida usando ARN sentido transcrito desde un molde exógeno para infrarregular la expresión de genes de plantas específicas (ver Jorgensen, Keystone Symposium “Improved Crop and Plant Products through Biotechnology”, Abstract X1-022 (1994)). El uso de la supresión sentido es bien conocido en la técnica y se describe en Waterhouse, PM., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(23):13959-64 (1998), Oue Q, *et al.*, *Plant J.* 13(3):401-9 (1998) y Tsai CJ., *et al.*, *Plant Physiol.* 117(1):101-12 (1998), todos incorporados aquí por referencia. Es bien conocido, que una célula fabrica una proteína transcribiendo el ADN del gen que codifica esta proteína para producir ARN, que es luego procesado en ARN mensajero (de ahora en adelante denominado “ARNm”) y finalmente traducido por los ribosomas en la proteína. Este proceso puede ser inhibido en la célula por la presencia de ARN antisentido. El término “ARN antisentido” significa una secuencia de ARN que es complementaria a una secuencia de bases en el ARNm en cuestión en el sentido de que cada base o la mayoría de bases en la secuencia antisentido (leyendo en el sentido 3’ a 5’) es capaz de acoplarse con la base correspondiente (G con C, A con U) en la secuencia de ARNm leyendo en el sentido de 5’ a 3’. Se cree que esta inhibición se desarrolla por la formación de un complejo entre las dos cadenas complementarias de ARN, así impidiendo la formación de la proteína. Cómo funciona es incierto: el complejo puede interferir con una transcripción adicional, tratamiento, transporte o traducción, o degradar el ARNm, o tener más de uno de estos efectos. Este ARN antisentido puede ser producido en la célula por transformación de la célula con un constructo de ADN apropiado dispuesto para transcribir la cadena no molde (por oposición a la cadena molde) del gen pertinente (o de una secuencia de ADN que muestra homología sustancial con ésta).

El uso de ARN antisentido para infrarregular la expresión de genes de plantas específicas es bien conocido. La reducción de la expresión genética ha conducido a un cambio en el fenotipo de la planta: bien a nivel de una gran diferencia fenotípica visible, p. ej., falta de producción de antocianina en los pétalos de flores de petunia conduciendo a una descoloración en vez de pétalos coloreados (ver van der Krol *et al.*, *Nature*, 333:866-869 (1988)); o a un nivel bioquímico más ligero, por ejemplo, un cambio en la cantidad de poligalacturonasa y reducción en la despolimerización de la pectina durante la maduración del tomate (ver Smith *et al.*, *Nature*, 334:724-726 (1988)).

Adicionalmente, la molécula de ADN de la presente invención puede ser usada en la recombinación sitio específica (también conocida como “homóloga” y “reconocimiento genético”). Es sabido por ejemplo, que la presencia de secuencias isogénicas genómicas en un ADN introducido puede ser reconocida hasta su propio locus cromosómico y así facilitar la integración por recombinación sitio específica (Schaefer, D.G., *et al.*, *Plant J.*, 11(6):1195-1206 (1997), incorporado aquí por referencia). Inicialmente se observa en *Saccharomyces cerevisiae*, este caso es un prerequisite para la aplicación en las herramientas más sofisticadas de genética inversa, es decir interrupción génica y alelo sustituido. *Id.* Con estos enfoques, prácticamente cualquier gen donado, incluso de función desconocida, puede ser específicamente mutagenizado *in vitro* y reintroducido hasta su propia localización cromosómica para estudiar su función. *Id.* La aplicación exitosa de la sustitución alélica depende de la proporción de homólogos para casos de recombinación ilegítima durante una transformación integrativa. *Id.*

La molécula de ADN de la presente invención puede ser usada en la recombinación sitio específica para reemplazar la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje para dar lugar a la actividad PGM plástida no funcional. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN usada en tal recombinación sitio específica muestra una homología elevada con la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje reconocida que es sustituida y contiene aproximadamente de 50 a aproximadamente 10.000 nucleótidos, más preferiblemente aproximadamente 5.000 nucleótidos. Las técnicas para la recombinación sitio específica descrita en Risseuw *et al.*, *Plant J.*, 7(1):109-19 (1995), Offringa R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(15):7346-50 (1993), Offringa R., *et al.*, *EMBO J.*, 9(10):3077-84 (1990), Miao, ZH *et al.*, *Plant J.*, 7(2):359-65 (1995), todos incorporados aquí por referencia, puede utilizarse para efectuar la recombinación sitio específica en la presente invención.

La molécula de ADN aislada de la presente invención comprende: (1) una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO:1 que contiene una mutación en un intrón en el nucleótido 1594 en el sitio de empalme 3’ donde una A es sustituida por una T y las secuencias que son complementarias a la secuencia mostrada en la SEC ID NO:1; y (2) una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoglucomutasa plástida, donde la secuencia de nucleótidos contiene al menos un nucleótido que previene la escisión de al menos un intrón de un transcrito primario durante la modificación postranscripcional del transcrito y que produce al menos un ARNm aberrante para la traducción. Las secuencias de nucleótidos descritas aquí pueden ser aisladas y purificadas de una sustancia

5 natural tal como una planta o pueden ser artificialmente sintetizadas y luego purificadas usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Además, la presente invención también se refiere a un vector de expresión que contiene esta molécula de ADN, las células vegetales transformadas con estos vectores, y un proceso de reducción o supresión de la expresión de la PGM plástida de la planta por supresión sentido o antisentido en las plantas transformadas con estos vectores.

En otro aspecto, la presente invención también contempla variaciones alélicas de origen natural y mutaciones de las secuencias de nucleótidos establecidas arriba mientras que la molécula de ADN contiene la mutación antes descrita.

10 En otro aspecto adicional, la presente invención también incluye secuencias de nucleótidos aisladas que se hibridan bajo condiciones de hibridación severas a las secuencias de nucleótidos establecidas arriba. Las condiciones de hibridación severas son bien conocidas en la técnica y definen un grado de identidad de la secuencia mayor del 70% al 80%.

15 La presente invención también contempla oligonucleótidos de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, que sirven como cebadores y sondas de hibridación para la selección de bibliotecas de ADN y la identificación de moléculas de ADN o ARN que contienen la mutación antes descrita y secuencias relacionadas. Tales cebadores y sondas están caracterizados por el hecho de que se hibridarán a la molécula de ADN que contiene la mutación antes descrita contenida dentro de dicha molécula de ADN. Una sonda de oligonucleótidos o cebador contiene una secuencia de nucleótidos de al menos 15 nucleótidos que es idéntica a, casi idéntica a o complementaria a una secuencia contigua a la molécula de ADN mostrada en la SEC ID NO: 1. Así, cuando una sonda de oligonucleótidos tiene 25 nucleótidos de longitud, al menos 15 de estos nucleótidos son idénticos o complementarios a una secuencia de la molécula de ADN de la presente invención.

25 En otro aspecto adicional, la presente invención también proporciona constructos de ADN que comprenden toda o parte de la molécula de ADN anteriormente descrita. Un “constructo” según se utiliza en este caso, es una molécula de ADN que comprende secuencias de ácidos nucleicos normalmente no asociados en la naturaleza, tal como una secuencia procariótica y una secuencia eucariótica. Normalmente, un “constructo” comprende un vector, tal como un origen plásmido, vírico, y/o episómico, y una secuencia para ser transcrita.

30 Generalmente, el constructo de ADN contendrá al menos un promotor. Los promotores pueden ser heterólogos, lo que significa que no están naturalmente enlazados operativamente a un gen de PGM plástida. Los promotores útiles para la expresión en plantas son bien conocidos en la técnica y, pueden ser inducibles, constitutivos, tejido específicos, derivados de eucariotas, procariotas o virus, o tienen varias combinaciones de estas características. Ejemplos de promotores que son adecuados para el uso en plantas incluyen el promotor 35S del virus mosaico de coliflor, el promotor fitohemagglutina (PHA), promotores de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (rbcs) y promotores de la proteína de unión a la clorofila a/b (Cab).

35 La selección de un vector de expresión apropiado es relativamente simple, puesto que las limitaciones son mínimas. Los rasgos mínimos del vector son que la secuencia de nucleótidos deseada se introduzca en un estado relativamente intacto. Por ejemplo, si las células vegetales deben ser transformadas con el constructo de ADN, cualquier vector que produzca una planta portadora de la secuencia de ADN introducida debería ser suficiente.

45 Así, los vectores adecuados incluyen los vectores del plásmido Ti, los vectores transportadores diseñados meramente para producir el número más elevado de copias, los vectores episómicos que contienen secuencias mínimas necesarias para la replicación definitiva una vez que ha ocurrido la transformación, vectores del transposón, vectores de recombinación homóloga, vectores minicromosómicos, y vectores víricos. La selección de vectores y los métodos para construirlos son conocidos de forma común por los expertos en la materia y están descritos en las referencias técnicas generales, tales como Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vols. 1-3, incorporado aquí por referencia.

50 El vector puede también incluir cualquier secuencia de nucleótidos adicional unida que confiera resistencia a la degradación de la molécula de ADN para ser introducida, que asista en el proceso de integración genómica o que proporcione medios para seleccionar fácilmente las células transformadas o plantas, lo cual es ventajoso y reduce inmensamente la dificultad de seleccionar los transgenos utilizables. Normalmente, los vectores de expresión contienen marcadores de la selección, tales como resistencia a la canamicina, resistencia a la higromicina, para permitir la detección y/o selección de estas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (ver patente estadounidense número 4.704.362, incorporada aquí por referencia).

60 Los vectores útiles generalmente contienen secuencias que permiten la replicación en un huésped procariótico útil para la clonación de la molécula de ADN de la presente invención. Los huéspedes procarióticos más frecuentemente usados son cepas de *Escherichia coli*, aunque otros procariotas, tales como *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas* pueden también ser usados, y son bien conocidos en la técnica. Los vectores útiles pueden también contener otros elementos de la secuencia útiles para la clonación (por ejemplo, sitios de restricción) o expresión (por ejemplo, secuencias potenciadoras).

Los vectores de expresión útiles son bien conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Normalmente, el vector contendrá una señal de poliadenilación, tal como la señal de poliadenilación del gen 35S del mosaico de coliflor.

El vector puede también contener secuencias reguladoras de la traducción (tales como sitios de inicio de la traducción), y pueden también contener intrones y sitios de empalme, secuencias potenciadoras (que pueden ser inducibles, tejido específicas o constitutivas), y secuencias 5' y 3' reguladoras y flanqueantes.

Para conseguir la expresión, es preciso introducir el constructo apropiado en al menos algunas células de un organismo huésped, así como por transformación. Como se utiliza en este caso, el término “transformación” significa alteración del genotipo (incluyendo los genes episómicos) de un organismo meta por la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de ácidos nucleicos no necesita necesariamente originarse a partir de una fuente diferente, pero, en algún momento, habrá sido externa a la célula en la que debe ser introducida.

El organismo huésped puede ser células de levadura, como por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*, células vegetales como células de *Pisum sativum*, células de insectos como células Tn5 y células bacterianas como de *E. coli* y *Pseudomonas*.

La transformación de las plantas puede ser realizada esencialmente en cualquiera de las distintas maneras conocidas por los expertos en la técnica de biología molecular vegetal. Ver en general, *Methods in Enzymology* Vol. 153 (“Recombinant DNA Part D”) 1987, Wu and Grossman Eds., Academic Press, incorporada aquí por referencia. Según se utiliza en este caso, el término “planta” se refiere a plantas enteras y tejidos derivados de plantas. Según se utiliza en este caso, “tejidos derivados de plantas” se refiere a tejidos de plantas diferenciados e indiferenciados, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, raíces, brotes, hojas, polen, óvulos, semillas, tejido tumoral, y varias formas de células en cultivo tales como células intactas, protoplastos, embriones y tejido del callo. Los tejidos derivados de plantas pueden estar en la planta o en un órgano, tejido o cultivo celular. Una “planta monocotiledónea” se refiere a una planta cuyas semillas tienen sólo un cotiledón, u órgano del embrión que almacena y absorbe el alimento. Una “planta dicotiledónea” se refiere a una planta cuyas semillas tienen dos cotiledones. Un “protoplasto” se refiere a una célula vegetal sin una pared celular o matriz extracelular.

El vector puede ser introducido en células vegetales por microinyección, usando polietilenglicol (Paszowski *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), por electroporación (Fromm *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824-5828), por alta penetración balística por pequeñas partículas con la molécula de ADN bien dentro de la matriz de pequeñas perlas o partículas, o en la superficie (Klein *et al.*, (1987) *Nature* 327:70-73).

Un método preferido de introducción del vector en células vegetales es infectar una célula vegetal, un explante, un meristema o una semilla con una cepa creada genéticamente de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* portadora del segmento. Dentro del segmento T-ADN de su plásmido Ti de tamaño completo o en un vector del plásmido Ti binario abreviado conteniendo las secuencias límite de T-ADN del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, en caso de ser usado, debe ser “desarmado”, es decir, se debe eliminar su actividad de inducción tumoral, antes del uso. Para facilitar la selección de las células vegetales transgénicas, es preferible que el segmento de gen sea enlazado a un marcador seleccionable, por ejemplo, resistencia a la canamicina. En algunas especies, tales como *Arabidopsis thaliana*, este proceso de infección por *Agrobacterium* es facilitado por infiltración al vacío de tejido embrionario (como en Bechtold *et al.*, (1993) *C.R. Acad. Sci. Paris* 316:1194-1199). Ejemplos de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que pueden ser usadas incluyen LBA4404, como se describe por Hoekema *et al.*, (1983) *Nature* 303:179-180, y EHA101 como se describe por Hoot *et al.*, (1986) *J. Bacteriol.* 168:1297-1301. Una cepa preferida de *Agrobacterium rhizogenes* es 15834, como se describe por Birot *et al.*, (1987) *Plant Physiol. Biochem.* 25:323-325. El plásmido Ti es transmitido a células vegetales tras la infección por *Agrobacterium tumefaciens*, y es integrado de forma estable en el genoma de la planta (Horsch *et al.*, (1984) *Science* 233:496-498; Fraley *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-4807). Bajo las condiciones apropiadas conocidas en la técnica, las células vegetales transformadas son colocadas bajo selección antibiótica y crecidas en los medios de cultivo de tejidos para formar brotes de cultivo, raíces, y eventualmente plantas intactas que pueden ser propagadas en la tierra.

Los plásmidos Ti contienen dos regiones esenciales para la producción de células transformadas. Una de éstas, llamada transferencia de ADN (T-ADN), induce la formación tumoral. La otra región denominada virulenta, es esencial para la introducción del T-ADN en las plantas. La región de transferencia de ADN, que transfiere al genoma de la planta, puede ser aumentada en tamaño por la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos extraña sin que su capacidad de transferencia se vea afectada. Eliminando los genes que provocan los tumores de modo que ya no interfieran, el plásmido Ti modificado puede luego ser usado como un vector para la transferencia de los constructos de genes de la invención en una célula vegetal apropiada, siendo éste un “vector de Ti deshabilitado”.

Hay actualmente al menos tres formas diferentes de transformar células vegetales con *Agrobacterium*:

- (1) cocultivo de *Agrobacterium* con protoplastos aislados cultivados;
- (2) transformación de células o tejidos con *Agrobacterium*; o
- (3) transformación de semillas, ápices, meristemas o plantas enteras con *Agrobacterium*.

El método (1) requiere un sistema de cultivo establecido que permita la regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados. El método (2) requiere (a) que las células vegetales o tejidos puedan ser transformados por *Agrobacterium* y (b) que las células transformadas o tejidos puedan ser inducidos a regenerarse en plantas enteras.

ES 2 268 808 T3

El método (3) requiere la regeneración o micropropagación o simplemente “propagación” de semillas de *Arabidopsis* transformadas con un vector.

En el sistema binario, para lograr la infección, se necesitan dos plásmidos: un plásmido conteniendo T-ADN y un plásmido vir. Cualquiera de los plásmidos que contienen T-ADN puede ser usado, el único requisito es que sea capaz de seleccionar independientemente para cada uno de los dos plásmidos.

Como resultado de este proceso de transformación de células vegetales, un segmento del plásmido Ti que lleva el segmento de ADN deseado es integrado en el cromosoma nuclear y las células transformadas pueden ser seleccionadas usando un marcador seleccionable enlazado al segmento de ADN deseado. Estos marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitarse, resistencia a los antibióticos, resistencia a los herbicidas o actividades demostrables visualmente. Otros marcadores seleccionables conocidos en la técnica pueden ser usados en esta invención.

Normalmente, la regeneración estará implicada en la obtención de un organismo completo transgénico del proceso de transformación. Por ejemplo, en las plantas, el término “transgenota” se refiere al producto inmediato del proceso de transformación y a las plantas transgénicas enteras resultantes. El término “regeneración” como se utiliza en este caso, significa el crecimiento de un organismo transgénico entero o completo. Por ejemplo, en las plantas, el término regeneración se refiere al crecimiento de una planta entera a partir de una célula vegetal, un grupo de células vegetales, una parte de la planta, un trozo de la planta (p. ej., de un protoplasto, callo, o parte del tejido), o la propagación de semillas transformadas con *Agrobacterium* por infiltración al vacío.

En las plantas, la regeneración a partir de protoplastos cultivados está descrita en Evans *et al.*, *Protoplast Isolation and Culture in Handbook of Plant Cell Cultures* 1:124-176 (MacMillan Publishing Co. New York 1983); M.R. Kavey, “Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasts”, *Protoplasts* (1983)-Lecture Proceedings, pp. 12-29, (Birkhauser, Basel 1983); P.J. Dale, “Protoplasts Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops”, *Protoplasts* (1983)-Lecture Proceedings, pp.31- 41 (Birkhauser, Basel (1983); and H. Binding, “Regeneration of Plants”, *Plant protoplasts* pp. 21-73 (CRC Press, Boca Raton 1985).

La identificación, selección o confirmación de organismos transgénicos está normalmente basada en un ensayo o varios ensayos. Los organismos transgénicos (tales como transgenotas) pueden ser seleccionados por ensayos bioquímicos, biológico moleculares, y otros ensayos. Por ejemplo, varios ensayos pueden ser usados para determinar si una planta particular, parte de la planta, o célula transgenota muestra un aumento (es decir, sobreexpresión) o reducción (es decir, supresión) del gen de PGM plástida. Normalmente el cambio en expresión o actividad del transgenota será comparado con niveles encontrados en plantas tipo salvaje (p. ej., no transformadas) del tipo mismo. Preferiblemente, el efecto del constructo introducido (transgén) a nivel de la expresión o actividad del gen endógeno será establecido a partir de una comparación de plantas gemelas con y sin el constructo que contiene el fragmento de ADN deseado. Los niveles de ARNm pueden ser medidos por transferencia de Northern, prolongación del cebador, protección de ribonucleasa, PCR cuantitativa o semi-cuantitativa (reacción en cadena de la polimerasa), y otros métodos bien conocidos en la técnica (ver, p. ej., Sambrook *et al.*, (1989)). La proteína puede ser medida de varias maneras incluyendo métodos inmunológicos tales como por ELISA o transferencia de Western.

Los ejemplos siguientes ilustran las formas de realización preferidas de la presente invención y no son limitadores de la especificación ni de las reivindicaciones de ninguna manera.

Ejemplo 1

Características de 8500017

Un cultivar de guisante 8500017 tiene las características siguientes:

Madurez:

Número de nodos en el primer florecimiento: 15

La variedad de la presente invención florece 5 días más tarde que Wando. Wando está públicamente disponible por el Pisum Plant Introduction Collection, USDA ARF, Johnson Hall, Room 55, Washington State University, Pullman, Washington.

Número de días a procurar: 77

Unidades huéspedes: 1630

Altura: la variedad de la presente invención tiene aproximadamente 45 cm de alto, y es aproximadamente 5 cm más corto que Wando.

Vid:

Hábito: Indeterminado

ES 2 268 808 T3

Ramificación: 1-2 Ramas

Internodos: Zig Zag

5 Robustez: Fina

Número de nodos: 19

Foliolos:

10

Color: Verde Oscuro

Cera: Ligera

15 Jaspeados: Sí

Número de pares de foliolos: Dos

20 *Estiplas:* la variedad de la presente invención contiene estiplas que son jaspeadas. Las estiplas son del mismo color que los foliolos, están apretadas y son de tamaño más grande en comparación con los foliolos.

Color de la flor:

Venación: Verdosa

25

Estándar: Blanco

Ala: Blanca

30 Quilla: Blanca

Vainas:

Forma: Ligeramente Curvada

35

Color: verde medio

Superficie: Desigual

40

Longitud: 8 cm

Extremo: Romo

Anchura (entre Suturas): 11 mm

45

Número de semillas por vaina: 9

Guisantes: (95-100 tenderómetro)

50 Color: Verde oscuro

Criba:

1-5%

55

2-17%

3-35%

60

4-39%

5-4%

Promedio: 3.20%

65

Semillas: (secas, maduras):

Forma: Aplanada

Superficie: Rugosa y ópaca

Modelo de color: Monocolor

5 Color primario: Crema & verde

Color del suelo del hilum: Bronceado

Color cotiledoneo: Verde

10

Número de gramos por 100 semillas: 14

Resistencia a enfermedades: la planta de *Pisum sativum* de la presente invención es resistente al hongo Fusarium Wilt y al hongo Mildiú pulverulento

15

Las variedades más cercanas de *Pisum sativum* a la planta de *Pisum sativum* de la presente invención son: Lazor, Markado y Trek. Lazor ha sido antes descrito. Markado es un guisante de plena temporada, de criba media, freezer con verde oscuro (freezer) y con follaje relativamente fino en comparación con otras variedades de freezer de criba superior. Markado está comercialmente disponible por Novartis (Boise, Idaho). Trek es una variedad freezer de criba media y de temporada media con follaje afila y color de baya de verde oscuro medio. Trek está comercialmente disponible como Asgrow Brand por Seminis Vegetable Seeds.

20

Ejemplo 2

25 *Almidón y sacarosa en las hojas de guisantes de la presente invención y examen de la actividad enzimática comparado con guisantes de una variedad de Pisum sativum rugosa que contiene el gen r*

La variedad de guisante Lazor, que contiene el gen homocigoto r y produce una semilla rugosa madura, y una línea introgresada por bsg de Lazor que produce una semilla altamente rugosa fueron estudiadas en este ejemplo. Una muestra de hojas de Lazor y una línea introgresada por bsg de Lazor fueron secadas hasta un peso estable en un liofilizador y luego pulverizadas hasta obtener un polvo usando un mortero y mano de mortero. Una cantidad prepesada de las muestras (100 mg) fue lavada varias veces en etanol al 80% a 70°C. Los sobrenadantes de etanol fueron agrupados y usados para la determinación de sacarosa. El granulado fue usado para la determinación de almidón.

30

Cuantificación de almidón

Se eliminó el azúcar de las muestras de tejido liofilizado por diferentes lavados a 70°C en etanol al 80%. El almidón fue gelatinizado sometiéndolo a autoclave durante 45 minutos y luego hidrolizado por digestión a 37°C con α -amilasa (Sigma) en 0.3 M de acetato sódico, pH 5.2 seguido de digestión adicional con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Sigma) en 0.1 M de acetato sódico, pH 4.6 a 55°C. Las muestras fueron desproteinizadas por ebullición y la glucosa fue evaluada enzimáticamente acoplando la oxidación de la glucosa a la reducción de NAD⁺ con hexoquinasa (Boehringer/Mannheim) y glucosa-6-P deshidrogenasa (Sigma).

40

Una alícuota del almidón hidrolizado fue incubada a la temperatura ambiente en 0.1 M de Tris-Cl (pH 8), 1 mM de ATP, 1 mM de NAD⁺, 2 mM de MgCl₂, 15 U/ml de hexoquinasa de levadura, y 15 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*. La reacción permitió ser completada y la absorbencia fue leída a 340 nm y comparada con una curva estándar. Los resultados están mostrados abajo en la tabla 1.

45

Cuantificación de sacarosa

50

Los sobrenadantes de etanol al 80% agrupados fueron llevados hasta 6.5 ml con el 80% de etanol. Siguiendo la adición de 3.6 ml de agua y 2.15 ml de cloroformo, la muestra fue removida y centrifugada en una centrifugadora de mesa. Después de que la fase inferior haya sido reextraída con 0.2 ml de agua, las fases superiores fueron agrupadas, evaporadas hasta la sequedad en un concentrador Savant Speed-Vac, y resuspendidas en 0.2 ml de agua.

55

La glucosa y la fructosa fueron destruidas mediante el tratamiento de la muestra durante 30 minutos a 90°C en presencia de 3.7 volúmenes de NaOH 0.1 M. La muestra fue luego neutralizada por la adición de 0.5 volúmenes de acetato sódico 1 M, pH 4.6. Los niveles de sacarosa fueron determinados usando un ensayo espectrofotométrico acoplado por deshidrogenasa. Una alícuota de la muestra tratada con alcali fue incubada a la temperatura ambiente en 40 mM de imidazol (pH 6.9), 1 mM de ATP, 1 mM de NAD⁺, 5 mM de MgCl₂, 0.5 mM de DTT, 0.02% de BSA, 32 U/ml de invertasa, 5 U/ml de levadura hexoquinasa, y 5 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*. La reacción permitió ser completada y la absorbencia fue leída a 340 nm y comparada con una curva estándar. Los resultados están mostrados abajo en la tabla 1.

60

65

TABLA 1

Niveles de almidón y de sacarosa en hojas de Lazor y líneas introgresadas con bsg de Pisum sativum

	Almidón % peso seco	Almidón % peso fresco	Sacarosa % peso seco	Sacarosa % peso fresco
Lazor	3.060 +/- 0.071	0.4948 +/- 0.0220	8.18 +/- 0.69	1.32 +/- 0.14
bsg	0.015 +/- 0.002	0.0023 +/- 0.0004	10.19 +/- 0.78	1.58 +/- 0.12

La Tabla 1 muestra que los niveles de almidón de las hojas en la línea de *Pisum sativum* con el gen introgresado con bsg en Lazor son como mucho sólo aproximadamente el 0.5% de Lazor. También, la tabla 1 demuestra que los niveles de sacarosa fueron aumentados en las hojas de la línea de *Pisum sativum* con el gen bsg.

Ensayos de ADP-glucosa pirofosforilasa

Los embriones de Lazor y una línea introgresada con el gen bsg de Lazor congelado en nitrógeno líquido fueron molidos en un mortero en presencia de 3-4 volúmenes de tampón de extracción enfriado en hielo (100 mM de ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico (MOPS) (pH 7.2), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 5 mM de DTT). El almidón y detrito celular fueron eliminados por granulación durante 10 minutos a 27.000xg. Las partes alícuotas del sobrenadante fueron luego rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. La actividad ADPG-PPasa resultó ser estable bajo estas condiciones de almacenamiento.

La ADP-glucosa pirofosforilasa fue evaluada en la dirección inversa a 25°C acoplando la producción de glucosa-1-P a la reducción de NAD⁺. Las mezclas de reacción estándar (1 ml) contenían 75 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfónico (HEPES) (pH 7.75), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de 3PGA, 0.1 mg/ml de albúmina de suero bovino, 5 µM de glucosa-1,6-bisfosfato; 1.5 mM de ADP-glucosa, 0.4 mM de NAD⁺; 2 U de fosfoglucomutasa (Sigma) y de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma), y hasta 100 µl de extracto. Después de un minuto las reacciones del periodo de preincubación fueron iniciadas por adición de pirofosfato de sodio a 1.5 mM. La producción de NADH fue controlada espectrofotométricamente a 340 nm contra una mezcla reactiva que carecía de pirofosfato de sodio. El nivel fue proporcional a la cantidad de extracto añadido y la reacción fue lineal durante al menos unos periodos de 3 minutos. Una unidad está definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de glucosa-1-P por minuto.

Las concentraciones de proteínas fueron determinadas usando el reactivo colorante de BioRad. Los resultados están mostrados abajo en la tabla 2.

TABLA 2

Actividad ADP-glucosa pirofosforilasa en embriones de Lazor y líneas introgresadas con bsg de Pisum sativum

	peso embrión, g	actividad ADPG-PPasa, U/mg de proteína
Lazor	.28	.0559
	.31	.0373
bsg	.28	.0388
	.31	.0271

La Tabla 2 muestra que la actividad ADP glucosa pirofosforilasa no es muy reducida en los cotiledones de la presente invención cuando se compara con la actividad en la variedad Lazor.

Análisis de isocimas de fosfoglucomutasa por electroforesis en gel de almidón

Los embriones (0.25-0.3 g) u hojas (0.5 g) congeladas en nitrógeno líquido fueron molidos en un mortero enfriado en hielo en presencia del tampón de extracción (0.1 M de Tris-Cl, pH 7.8, 2% de glutatona reducida) más 50 mg de polivinilpolipirrolidona y una pequeña cantidad de arena lavada en ácido. Los extractos fueron escurridos a través de una capa de miracloth y, en algunos experimentos, se diluyeron con un tampón de extracción hasta concentraciones de clorofila iguales (como determinadas por la fórmula: [(A₆₄₅ X 202) + (A₆₆₃ X 80.2)] X 10.5 = µg clorofila/ml). Los extractos fueron tomados por mechas de 3MM de 5 mm X 1 cm y colocados a 4 cm del extremo catodal en un 12% de gel de almidón preparado en 15 mM de Tris/4 mM de ácido cítrico, pH 7.8. Una mecha de 3MM fue usada para conectar el gel de almidón al tampón del electrodo (0.3 M de borato sódico, pH 7.8). La electroforesis fue hecha en el espacio frío durante 20 minutos a 200 V/30 mA. Las mechas fueron luego eliminadas y la electroforesis fue

continuada a 30 mA hasta que el voltaje alcanzara 300 V; el voltaje fue luego mantenido a 300 V hasta que el frente colorante se hubiera movido ~11 cm.

La parte superior del gel de almidón fue luego cortada en rebanada y la sección inferior de 1 mm fue coloreada para la actividad fosfoglucomutasa (PGM) usando una sobrecapa del 0.7% de agarosa que contenía 0.1 M de Tris-Cl (pH 7.5), 10 mM de MgCl₂, 1.5 mg/ml de glucosa-1-P, 0.15 mg/ml de NADP⁺, 0.2 mg/ml de MTT, 40 µg/ml de PMS, y 0.4 U/ml de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. Después de una incubación de 15 minutos a oscuras a 30°C, el gel fue lavado durante 1 minuto en el 1% de ácido acético, se enjuagó varias veces con agua, y se fijó en 5:2:1:4 etanol:ácido acético:glicerina:agua.

Los cloroplastos fueron aislados según el método descrito en *Methods in Plant Molecular Biology*, 141-172, Cold Spring Harbor Press, Lamppa, J.K., *et al.*, eds. 1995, "Section 8 *In vitro Import of Proteins into Chloroplasts*", 1995, aquí incorporado por referencia. Las hojas (~20 g) fueron suavemente homogenizadas en 450 ml de tampón triturador enfriado en hielo (2 mM EDTA, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de MnCl₂, 50 mM de HEPES-KOH (pH 7.5), 0.33 M de sorbitol) con un conjunto Polytron a 3.5 durante 2 explosiones de un minuto. El producto homogeneizado fue filtrado a través de cuatro capas de cheesecloth y cuatro capas de Miracloth y luego se granuló en un Rotor GSA a 4000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Los granulados fueron resuspendidos en 8 ml de tampón de trituración y estratificados sobre dos gradientes de fase Percoll 40%/80% hechos en un tampón de trituración más 0.86 mg/ml de ácido ascórbico y 0.35 mg/ml de glutatona reducida. Los gradientes fueron centrifugados en un rotor HB-4 a 7500 rpm durante 8 minutos a 4°C. La banda de cloroplasto inferior fue resuspendida en 30 ml del tampón de trituración y reganulada por centrifugación en un rotor HB-4 a 3500 rpm durante 5 minutos. Los granulados fueron resuspendidos en 30 ml de 1xHSM (10 mM de HEPES-KOH, pH 8, 0.33 M de sorbitol, 8.4 mM de metionina) y reganulados en un rotor HB-4 a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los granulados fueron luego bien lisados siendo absorbidos en medio hipotónico (10 mM Cl tris, pH 7.8, 2% glutatona reducida) o resuspendidos en 1xHSM y lisados por congelación-descongelación.

La Figura 4 muestra la separación electroforética de las actividades fosfoglucomutasa en Lazor y en la línea de *Pisum sativum* que tiene el gen bsg introgresado en Lazor. En Lazor, dos isozimas son rediseñadas en extractos de sus hojas, mientras que sólo una isozima se mancha para isozimas fosfoglucomutasas en el gen bsg introgresado de la línea *Pisum sativum* de Lazor. En extractos de hojas de la línea introgresada por bsg de Lazor, la isozima perdida de la línea de *Pisum sativum* introgresada por bsg de Lazor, que es la isozima menos electronegativa, es la isozima encontrada en los cloroplastos aislados. La misma banda de isozima está también ausente en los extractos de embrión de la línea de *Pisum sativum* introgresada por bsg de Lazor que está mostrada en la figura 5.

Ejemplo 3

Análisis de azúcar de guisantes congelados

Los guisantes de una línea introgresada por bsg, derivada de cruces con Encore y denominada Encore BSG, y guisantes de la variedad XPF330 de *Pisum sativum* fueron congelados para la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (HPLC). XPF330 es una variedad propiedad de Seminis Vegetable Seeds, Inc. XPF330 es de final de temporada, produce una semilla rugosa madura que contiene el gen r y es resistente al Hongo mildiú pulverulento. Las muestras de guisante congeladas fueron almacenadas a -20 grados centígrados hasta ser extraídas. Los guisantes fueron subprobados y pesados en una balanza analítica Mettler AT200. Se añadió etanol absoluto a la submuestra (proporción 4:1, volumen/peso). La muestra fue enfriada y almacenada durante toda la noche (a -20°C) luego triturada con un homogenizador IKA Ultra Turrax T25. El producto homogeneizado fue retornado al congelador. Al día siguiente, la muestra fue mezclada, luego centrifugada para aclarar el extracto. Una alícuota fue eliminada y sellada en un frasco autosampler y almacenada a -20°C hasta ser analizada.

Los azúcares son separados en un sistema chemstation 1050 HPLC de Hewlett-Packard, utilizando un detector de índice de refracción. La columna usada fue una columna Whatman Partsil 5PAC (4 x 12.5 mm). El sistema solvente estaba compuesto por el 85% de acetonitrilo a un nivel de flujo de 0.85 ml/minuto a 35°C. El volumen de inyección fue 5 microlitros. Una mezcla estándar de glucosa, fructosa y sacarosa en el 80% de etanol fue usada para cuantificar los azúcares. Este estándar fue inyectado cada diez muestras. Los resultados están mostrados abajo en la tabla 3.

ES 2 268 808 T3

TABLA 3

Línea		Fru	Glc	Suc
Encore BSG	Avg.	0.058	0.031	6.773
	Stds	0.008	0.011	0.271
	CV	14.451	33.973	4.001
	StdErr	0.003	0.004	0.111
	Cuenta	6		
XPF 330	Avg.	0.037	0.019	4.552
	Stds	0.003	0.004	0.125
	CV	7.884	22.959	2.757
	StdErr	0.001	0.002	0.051
	Cuenta	6		

Los resultados mostrados arriba en la tabla 3 demuestran que los guisantes que contienen el gen bsg homocigoto dentro de su genoma contienen niveles más altos de fructosa, glucosa y sacarosa que los guisantes que contienen el gen homocigoto r dentro de sus genes.

Ejemplo 4

Análisis de sacarosa de guisantes congelados

Las muestras congeladas de las variedades o líneas de *Pisum sativum* catalogadas abajo en las tablas 4 y 5 fueron almacenadas a -20°C hasta ser extraídas. Los guisantes fueron subprobados y pesados en una balanza analítica Mettler AT200. Se añadió etanol absoluto a la submuestra (proporción 4:1, volumen/peso). La muestra fue enfriada y almacenada durante toda la noche (a -20°C) luego triturada con un homogenizador IKA Ultra Turrax T25. El homogeneizado fue retornado al congelador. Al día siguiente, la muestra fue mezclada, luego centrifugada para aclarar el extracto. Una alícuota fue eliminada y sellada en un frasco autosampler y almacenada a -20°C hasta ser analizada.

Los azúcares son separados en un sistema chemstation 1050 HPLC de Hewlett-Packard, utilizando un detector de índice de refracción. La columna usada fue una columna Whatman Partsil 5PAC (4 x 12.5 mm). El sistema solvente estaba compuesto por el 85% de acetonitrilo a un nivel de flujo de 0.85 ml/minuto a 35°C. El volumen de inyección fue 5 microlitros. Una mezcla estándar de sacarosa en el 80% de etanol fue usada para cuantificar la sacarosa. Este estándar fue inyectado cada diez muestras. Los resultados están mostrados abajo en tablas 4 y 5.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 268 808 T3

TABLA 4

Peso fresco

Variedad	Tenderómetro	% de sacarosa promedio	gen bsg
Bolero	99	4.75	No
Bolero	99	4.64	No
Dual	97	4.56	No
Dual	97	4.27	No
EX 8500567	95	6.26	Sí
EX 8500567	95	6.22	Sí
EX 8500567	102	6.39	Sí
EX 8500567	102	6.40	Sí
Lazor	93	4.78	No
Lazor	93	5.06	No
Lazor	99	4.82	No
Lazor	99	4.89	No
Lazor BSG	95	6.37	Sí
Lazor BSG	95	6.50	Sí
Lazor BSG	97	6.45	Sí
Lazor BSG	97	6.56	Sí
Quantum	98	4.82	No
Quantum	98	4.83	No
Spring	98	4.86	No
Spring	104	4.77	No
Tacoma	94	4.78	No
Tacoma	94	4.72	No
Tacoma	99	4.47	No
Tacoma	99	4.39	No
XP F357	96	5.15	No
XP F357	96	5.57	No
XP F357	104	5.36	No
XP F357	104	5.31	No

ES 2 268 808 T3

TABLA 5

Análisis de sacarosa de guisantes Congelados (peso fresco)

Variedad	% promedio de sacarosa	Tenderómetro	gen bsg
B1R X MCRO	4.90	97	No
BEMAf X Alf	4.81	100	No
Bolero	5.25	96	No
Bolero X Bemol Af	4.75	98	No
CM279	5.52	102	No
CM279	5.45	98	No
CM279	5.57	98	No
CM279	5.02	100	No
Dinos	4.74	97	No
8500567	6.59	96	Sí
8500567	7.06	97	Sí
8500567	6.70	90	Sí
8500567	5.75	87	Sí
EF680 X Tacoma	4.83	104	No
Encore X Tacoma	4.79	98	No
F226 X Darfon	4.61	103	No
F234 X Mrkd	5.73	103	No
F240 X Tacoma	5.16	97	No
F240 X Tacoma	4.90	98	No
F353	5.50	99	No

ES 2 268 808 T3

F357	5.11	97	No
F383	5.38	97	No
Kalamo	5.09	97	No
Lazor	5.61	100	No
Lazor	5.31	97	No
Lazor	5.25	97	No
Lazor BSG	7.10	92	Sí
Lazor BSG	7.07	95	Sí
Lazor BSG	6.74	93	Sí
Lea X F240	5.86	97	No
Lea X Tacoma	5.18	103	No
M153	4.84	97	No
Micro PMB C1	4.88	97	No
Novll X F240	5.06	101	No
P1Sdin X Nvll	5.42	100	No
P1sDn X Nvll	6.08	97	No
Sknd X R86275 X	5.13	102	No
Sknd X R86275 X	5.51	98	No
Snake	5.09	98	No
Spr DMBC X	5.85	98	No
Spring	5.34	95	No
Spring	5.20	99	No
Spring	4.78	96	No

Las variedades de *Pisum sativum*, Bolero, Dual, Lazor, Quantum, Spring y Tacoma catalogadas en la Tabla 4, producen semillas rugosas maduras y contienen el gen homocigoto r dentro de su genoma. Estas variedades están comercialmente disponibles por Seminis Vegetable Seeds, Inc. Las variedades de *Pisum sativum* 8500567 y 8500557, también mostradas en la Tabla 4, producen semillas altamente rugosas y contienen el gen homocigoto bsg dentro de su genoma. 8500567 y 8500557 son variedades propiedad de Seminis Vegetable Seeds, Inc. La línea de *Pisum sativum*, Lazor BSG también mostrada en la Tabla 4, produce semillas altamente rugosas y contiene el gen homocigoto bsg dentro de su genoma. Lazor BSG es una variedad propiedad de Seminis Vegetable Seeds, Inc. XPF357, también mostrada en la Tabla 4, produce semillas rugosas y contiene el gen r dentro de su genoma. XPF357 es una variedad propiedad de Seminis Vegetable Seeds, Inc.

Las variedades de *Pisum sativum* y las líneas de reproducción mostradas en la Tabla 5, a excepción de 8000567 y Lazor BSG, producen semillas rugosas y contienen el gen homocigoto r dentro de su genoma. Todas estas variedades (a excepción de Snake) son variedades propiedad (o líneas de reproducción) de Seminis Vegetable Seeds, Inc. Las variedades de *Pisum sativum* Bolero, Lazor, Dinos, Kalamo y Spring, producen semillas rugosas y contienen el gen homocigoto r dentro de su genoma. Estas variedades están comercialmente disponibles por Seminis Vegetable Seeds, Inc.

ES 2 268 808 T3

Snake, también mostrada en la Tabla 6, produce semillas rugosas y contiene el gen homocigoto *r* dentro de su genoma. Snake está comercialmente disponible por Cristes Moscow Growers, Moscow, Idaho.

El promedio de sacarosa producida por los guisantes conteniendo el gen *bsg* homocigoto en su genoma en las Tablas 4 y 5 fue 6.54 (con unos valores que varían de 5.75 a 7.10 cuando se mide a unos valores de tenderómetro de aproximadamente 87 a aproximadamente 102). La cantidad promedio de sacarosa producida por los guisantes que no contenían el gen *bsg* en las pruebas de sacarosa conducidas en 1996-1997 fue 5.08 (con valores que varían de 4.27 a 6.08).

Ejemplo 5

Análisis de sólidos insolubles en alcohol en varios guisantes

Este ejemplo describe el contenido de sólidos insolubles en alcohol a partir de guisantes enlatados de diferentes variedades o líneas de *Pisum sativum*. El protocolo para determinar los sólidos insolubles en alcohol en estos guisantes enlatados es el siguiente:

- a) abrir la lata, echar el contenido en una criba de 8 mesh, enjuagar con dos volúmenes de agua corriente, y permitir su drenaje durante dos (2) minutos;
- b) un peso de 90-100 gramos de guisantes hasta aproximarse todo lo posible a 0.1 gramos, transferir a un vaso mezclador, añadir al vaso un volumen igual de agua desionizada;
- c) mezclar los guisantes durante dos (2) minutos en el ajuste de la mezcla;
- d) pesar 40 gramos de la mezcla mezclada hasta aproximarse todo lo posible a 0.01 gramos y transferir de forma cuantitativa a un matraz de ebullición de 1 litro ajustado con un condensador a reflujo. 280 ml de etanol al 86% son utilizados para completar la transferencia;
- e) hervir la mezcla durante 30 minutos;
- f) posicionar un papel de filtro de 11 cm Whatman #1, previamente secado en un plato de ponderación y pesado hasta aproximarse todo lo posible a 0.01 gramos, en un aparato de filtro Buchner de 8 cm, de modo que los bordes del papel se extiendan 1 cm sobre los lados del aparato de filtro. Aplicar succión al aparato y filtrar la mezcla de sólidos en alcohol de forma cuantitativa a través del papel; lavar el residuo del matraz con el 80% de etanol hasta que los lavados sean incoloros. No sobrecargar el vaso formado por el papel de filtro; y
- g) retornar el papel de filtro a un horno de secado en su plato de ponderación de metal original y secar a 100°C durante 2 horas. Enfriar en un desecador y pesar hasta aproximarse todo lo posible a 0.01 gramos. Determinar el peso de los sólidos secos, insolubles en alcohol por diferencia y multiplicar por 5 para convertir en porcentaje de sólidos insolubles en alcohol.

El valor de los sólidos insolubles en alcohol a 105 tenderómetros fue calculado usando una regresión lineal de medidas por pares de sólidos insolubles en alcohol y tenderómetros para cada variedad. El valor de tenderómetro al 12% de sólidos insolubles en alcohol fue calculado por regresión lineal de los mismos datos por pares. Para las variedades de guisante de la presente invención conteniendo el gen *bsg*, fue necesario extender la línea de regresión más allá de la gama de datos para interceptar el 12 por ciento. Por ejemplo, 8500557, una variedad de guisante conteniendo el gen *bsg*, tenía el 7.2% AIS en un tenderómetro de 105, y el tenderómetro calculado para el 12% AIS es 199. La Tabla 6, abajo se muestra el valor de sólidos insolubles en alcohol a 105 y el valor de tenderómetro al 12% AIS para diferentes variedades de *Pisum sativum*.

ES 2 268 808 T3

TABLA 6

Código	Tdr=	105	AIS=	12.0	gen bsg
8500557	AIS=	7.2	Tdr=	199	Sí
8500567	AIS=	7.7	Tdr=	200	Sí
Tender	AIS=	8.9	Tdr=	124	No
Revolution	AIS=	9.3	Tdr=	135	No
10002	AIS=	9.8	Tdr=	127	No
20028	AIS=	10.1	Tdr=	128	No
Zamira	AIS=	10.2	Tdr=	123	No
Pacha	AIS=	10.3	Tdr=	126	No
Cabro	AIS=	10.3	Tdr=	124	No
20037	AIS=	10.3	Tdr=	124	No
CMG290	AIS=	10.4	Tdr=	123	No
Magic	AIS=	10.4	Tdr=	119	No
Avola	AIS=	10.4	Tdr=	125	No
20036	AIS=	10.5	Tdr=	124	No
Fresca	AIS=	10.5	Tdr=	121	No
10003	AIS=	10.5	Tdr=	122	No
Bolero	AIS=	10.5	Tdr=	120	No
Samish	AIS=	10.6	Tdr=	121	No
Quad	AIS=	10.6	Tdr=	119	No
Titan	AIS=	10.6	Tdr=	121	No
20029	AIS=	10.7	Tdr=	114	No
Renard	AIS=	11.0	Tdr=	116	No
20 047	AIS=	11.1	Tdr=	115	No
20019	AIS=	11.3	Tdr=	119	No
Methow	AIS=	11.5	Tdr=	110	No
20 035	AIS=	11.8	Tdr=	107	No
Catalina	AIS=	12.0	Tdr=	105	No
Fristo	AIS=	12.0	Tdr=	105	No
Orlando	AIS=	13.2	Tdr=	95	No
Kong	AIS=	NS	Tdr=	NS	No
Lazor BSGBC1	AIS=	8.0	Tdr=	194	Yes
Lazor BSGBC2	AIS=	8.4	Tdr=	180	Yes

ES 2 268 808 T3

20078	AIS=	8.7	Tdr=	131	No
Paso	AIS=	9.0	Tdr=	133	No
Mathilde	AIS=	9.1	Tdr=	131	No
20071	AIS=	9.3	Tdr=	125	No
20 089	AIS=	9.5	Tdr=	128	No
Globo	AIS=	9.5	Tdr=	124	No
20091	AIS=	9.6	Tdr=	121	No
Waverex	AIS=	9.6	Tdr=	131	No
20067	AIS=	9.7	Tdr=	129	No
20100	AIS=	9.8	Tdr=	122	No
20101	AIS=	9.9	Tdr=	123	No
20092	AIS=	10.0	Tdr=	127	No
10021	AIS=	10.0	Tdr=	121	No
10025	AIS=	10.1	Tdr=	126	No
20090	AIS=	10.2	Tdr=	125	No
Nitro	AIS=	10.2	Tdr=	123	No
10016	AIS=	10.2	Tdr=	123	No
20075	AIS=	10.3	Tdr=	124	No
10 015	AIS=	10.3	Tdr=	125	No
Darfon	AIS=	10.3	Tdr=	120	No
Kimo	AIS=	10.4	Tdr=	123	No
20093	AIS=	10.4	Tdr=	121	No
R555	AIS=	10.4	Tdr=	127	No
20068	AIS=	10.4	Tdr=	121	No
20030	AIS=	10.4	Tdr=	122	No
Barle	AIS=	10.5	Tdr=	119	No
20 069	AIS=	10.5	Tdr=	117	No
10020	AIS=	10.5	Tdr=	121	No
Brule	AIS=	10.6	Tdr=	118	No
20073	AIS=	10.7	Tdr=	119	No
Curico	AIS=	10.7	Tdr=	115	No
Purser	AIS=	10.7	Tdr=	115	No
20094	AIS=	10.7	Tdr=	120	No

ES 2 268 808 T3

20116	AIS=	10.7	Tdr=	117	No
20076	AIS=	10.8	Tdr=	119	No
Lynx	AIS=	10.9	Tdr=	115	No
20102	AIS=	10.9	Tdr=	118	No
20103	AIS=	10.9	Tdr=	118	No
Sigra	AIS=	10.9	Tdr=	116	No
Encore	AIS=	11.0	Tdr=	115	No
Alamado	AIS=	12.0	Tdr=	115	No
Markado	AIS=	11.0	Tdr=	116	No
20070	AIS=	11.1	Tdr=	115	No
Bolero	AIS=	11.1	Tdr=	114	No
Spring	AIS=	11.1	Tdr=	114	No
Tyne	AIS=	11.1	Tdr=	116	No
Deltafon	AIS=	11.2	Tdr=	111	No
10 017	AIS=	11.2	Tdr=	113	No
Wolf	AIS=	11.2	Tdr=	113	No
20119	AIS=	11.3	Tdr=	111	No
Lazor	AIS=	11.4	Tdr=	110	No
20063	AIS=	11.4	Tdr=	110	No
20074	AIS=	11.4	Tdr=	113	No
20 087	AIS=	11.4	Tdr=	113	No
Camina	AIS=	11.4	Tdr=	112	No
20120	AIS=	11.4	Tdr=	112	No
Masterfon	AIS=	11.5	Tdr=	111	No
20118	AIS=	11.5	Tdr=	110	No
Vevas	AIS=	11.5	Tdr=	110	No
20106	AIS=	11.6	Tdr=	107	No
Snake	AIS=	11.6	Tdr=	109	No
20088	AIS=	11.7	Tdr=	108	No
20117	AIS=	11.8	Tdr=	107	No
20072	AIS=	11.9	Tdr=	106	No
Prism	AIS=	12.0	Tdr=	105	No
Dual	AIS=	13.0	Tdr=	95	No

ES 2 268 808 T3

Las variedades de *Pisum sativum* Tender, Revolution, Avola, Orlando, Markado, Barle, Sibra, Encore, Methow, Alamado, Tyne, Deltafon, Lazor, Camina, Wolf, Masterfon, Veras, Pacha, Bolero, Cabro, Fristo, Paso, Mathilde, Globe, Nitro, Darfon, Kimo, Dual, Prism, Magic, Titan, Renard, Catalina, Kong, Curico y Lynx catalogadas en la Tabla 6, producen semillas rugosas maduras y contienen el gen homocigoto r dentro de su genoma. Estas variedades están comercialmente disponibles por Seminis Vegetable Seeds, Inc. Las variedades de *Pisum sativum* CMG290, Samish, Quad, Snake y Brule producen una semilla rugosa y contienen el gen homocigoto r dentro de su genoma. Estas variedades de *Pisum sativum* están comercialmente disponibles por Crites Moscow Growers, Moscow, Idaho.

La variedad de *Pisum sativum* Zamira produce semillas rugosas maduras y contiene el gen homocigoto r dentro de su genoma. Zamira está comercialmente disponible por Nunhems Zaden (Haelen, Países Bajos).

La variedad de *Pisum sativum* Fresca produce semillas rugosas maduras y contiene el gen homocigoto r dentro de su genoma. Fresca está comercialmente disponible por Vilmoran (Empire, California).

La variedad de *Pisum sativum* Waverex produce semillas rugosas maduras y contiene el gen homocigoto r dentro de su genoma. Waverex está comercialmente disponible por Van Waveren (Gottingen, Alemania occidental).

La variedad de *Pisum sativum* Purser produce semillas rugosas maduras y contiene el gen homocigoto r dentro de su genoma. Purser está comercialmente disponible por Novartis (Boise, Idaho).

Las variedades de *Pisum sativum* 8500557 y 8500567 producen semillas altamente rugosas maduras y contienen el gen homocigoto bsg dentro de su genoma. 8500557 y 8500567 son variedades propiedad de Seminis Vegetable Seeds.

Todas las demás variedades o líneas de *Pisum sativum* usadas en la Tabla 6 producen semillas rugosas maduras y contienen el gen homocigoto r dentro de su genoma. Todas las variedades son propiedad de Seminis Vegetable Seeds, Inc.

Ejemplo 6

Análisis de sacarosa y niveles de AIS

22 muestras congeladas de guisantes fueron evaluadas por su porcentaje (%) en sacarosa y sólidos insolubles en alcohol. Los guisantes fueron evaluados por las variedades de *Pisum sativum* o líneas de Quantum, Lazor y Lazor BSGBC2. Lazor BSGBC2 fue seleccionado después de 2 retrocruzamientos del bsg de M82.1 en Lazor (como genitor recurrente). Los mismos procedimientos usados en los ejemplos 3 y 4 para la determinación y AIS fueron usados en este ejemplo. Los resultados están mostrados en la Tabla 7.

TABLA 7

Variedad	Tenderómetro	% sacarosa	% AIS
Quantum	92	6.01	8.8
Quantum	100	6.26	9.6
Lazor	95	5.88	9.5
Lazor	101	NA	10.7
Lazor BSGBC2	91	7.01	7.3
Lazor BSGBC2	99	7.07	NA

Estos resultados muestran que los guisantes de la línea de *Pisum sativum* Lazor BSGBC2 contenían un porcentaje más alto en peso fresco de sacarosa y un % inferior de AIS que las variedades Quantum y Lazor.

Ejemplo 7

Caracterización molecular del gen bsg

5 A. Materiales y Métodos

1. Preparación de ARN poli(A)+

El ARN fue obtenido a partir de hojas y cotiledones como se describe en Dunsmuir *et al.* (1987) en: Gelvin, S. and Schilperroot, R., eds. Plant Molecular Biology Manual, Vol 9. Plenum, New York, págs. 45-59, aquí incorporado por referencia. El ARN poli(A)+ fue aislado usando un Kit poly A Tract (Promega).

2. Análisis del transcrito de PGM

El ARN del cotiledón total y poli(A)+ fueron separados electroforéticamente en un 1.1% gel de agarosa conteniendo el 6% de formaldehído y preparado en un tampón consistente en 20 mM de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano-sulfónico), 5 mM de acetato sódico, 1 mM de EDTA, pH 8. Este tampón fue también usado como tampón de reserva a excepción de que el pH fue ajustado a 7. El ARN fue desnaturalizado a 55°C en el 65% de formamida, 8% de formaldehído, 26 mM de MOPS, 6.5 mM de acetato sódico, 1.3 mM de EDTA, pH 8 antes de ser cargado en el gel formaldehído. Después de la electroforesis a 4 V/cm, el ARN fue transferido a una membrana Duralon-UV (Stratagene) y entrecruzada por UV con un Stratagene Stratalinker.

Para la detección de los transcritos de PGM plástida, se hibridaron Northern blots con un fragmento 1.1 kb de *HindIII* de la mitad 3' del clon de ADNc de tipo salvaje, que fue marcado con Klenow usando cebadores aleatorios (Feinberg, A.P. *et al.*, Anal. Biochem. 132:6-13). Se realizaron hibridaciones en 0.25 M de tampón de fosfato (pH 7.4), 7% de SDS, 1 mM de EDTA, 1% de albúmina de suero bovino a 65°C en una incubadora Robbins Hybridization. Los lavados finales fueron realizados en 0.1 x SSC a 65°C.

3. Preparación de la primera cadena de ADNc

La primera cadena de ADNc fue preparada usando una transcriptasa inversa Superscript II (GibcoBRL). La síntesis de la primera cadena fue cebada fuera del cebador adaptador dT17 (GGAGATCTGGTAAGCTTGT17) (SEC ID NO: 21) según las instrucciones del fabricante y usando 200 ng de ARN poli(A)+. El producto final fue diluido hasta 0.5 ml con agua.

4. Preparación de ADN genómico

Para preparar ADN genómico 2.5 g de hojas congeladas en nitrógeno líquido fueron trituradas en un mortero en presencia de 4 mis de tampón de urea (7 M de urea, 0.31 M de NaCl, 50 mM de Tris-Cl (pH 8), 20 mM de EDTA, 1% de N-lauroil sarcosina). Después de la extracción con fenol-cloroformo, el ADN fue precipitado por la adición de 0.3 mis de acetato amónico 5 M y 4.3 mis de isopropanol, se lavó en el 70% de etanol, y se resuspendió en 4 mis de TE (10 mM de Tris-Cl (pH 8), 1 mM de EDTA). El ADN fue luego extraído con fenol-cloroformo en presencia de 0.2 mis de acetato sódico 3 M y precipitado por la adición de dos volúmenes de etanol. Después de que el ADN fuera íntegramente lavado en el 70% de etanol, fue resuspendido en 0.5 mis de TE. El ADN fue precipitado una vez más por la adición de 125 µl de acetato amónico 7.5 M y 1 volumen de isopropanol, lavado en el 70% de etanol, y resuspendido en 0.5 mls de TE.

5. Amplificación por PCR de ADNc y secuencias genómicas

ADNc de PGM fue amplificado por PCR en un volumen de 100 µl conteniendo un tampón 1x Pfu donado (Stratagene), 0.2 mM de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP, y dCTP), 50 pmol de cada cebador, y 5 µl de la primera cadena de ADNc. La mezcla reactiva fue calentada a 94°C antes de añadir 5 U de Pfu ADN polimerasa (Stratagene). Después de una fase de 6 minutos de desnaturalización (94°C), la temperatura fue bajada a 64°C durante 45 segundos y luego llevada a 72°C durante 4-5 minutos. Las muestras fueron luego sometidas a 31 ciclos de desnaturalización (45 seg, 94°C), recocimiento (45 seg, 62°C), y extensión (72°C, 4-5 minutos), con la extensión final siendo realizada durante 2 minutos adicionales. Las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un termociclador DNA Thermal Cycler de Perkin Elmer Cetus.

Las secuencias genómicas fueron amplificadas por PCR de una manera similar a excepción de que los tiempos de extensión fueron aumentados hasta seis minutos. Las reacciones de la PCR contenían ~500 ng de ADN genómico.

6. Clonación de fragmentos amplificados por PCR

Los fragmentos amplificados por PCR fueron extraídos por cloroformo para eliminar el aceite mineral que lo cubría y luego fueron precipitados con etanol en presencia de 0.3 M de acetato sódico y 10 p1 de ARNt.

Los fragmentos amplificados por PCR que son clonados en PCRII-TOPO fueron primero incubados durante 10 minutos a 72°C con Taq polimerasa para añadir una proyección dA en 3'. Después fueron clonados en PCRII-TOPO usando un kit de donación de TOPO TA (Invitrogen).

- 5 El polinucleótido quinasa fue usado para añadir un 5' fosfato antes de donar los fragmentos amplificados por PCR en SmaI-cut Bluescript o *HindIII* SmaI-cut Bluescript.

7. Secuenciación y análisis de secuencias

- 10 Los clones genómicos y de ADNc fueron primero extraídos con fenol-cloroformo y precipitados con etanol antes de ser digeridos con 20 µg/ml de ribonucleasa A durante 10 minutos a 37°C. Los moldes tratados con ribonucleasa A fueron extraídos con fenol-cloroformo y precipitados con etanol una vez más antes de ser usados como molde en una reacción de secuenciación de ciclo ternario realizada usando un kit de secuenciación de primer ciclo fluorescente ThermoSequenase con 7-deaza-DGTP (Amersham Pharmacia). Las reacciones fueron cebadas quitando los cebadores M13 directos y M13 inversos marcados fluorescentemente. La secuenciación fue realizada en un secuenciador automatizado fluorescente Licor. Los datos de la secuenciación fueron analizados usando el programa Sequencher.

B. Resultados

20 1. Aislamiento de clones de ADNc de PGM plástida de bsg

- La PCR fue usada para amplificar el ADNc de PGM plástida de la variedad de *Pisum sativum* de semilla uniforme, llamada "Frimousse" (de ahora en adelante denominada "tipo salvaje") y el ARN de la semilla Poli(A)+ de Frimousse introgresada con bsg (de ahora en adelante denominada "mutante") usando los cebadores PGM-Fp (SEC ID NO:3), PGM-F91 (SEC ID NO:4), PGM-Fb (SEC ID NO:5), PGM-F827 (SEC ID NO: 6), PGM-Rg (SEC ID NO: 7), PGM-R1262 (SEC ID NO: 8), PGM-R1816 (SEC ID NO:9) y PGM-Rf (SEC ID NO: 10) mostrados en la figura 9 (SEC ID NO:11). Muchos fragmentos generados por PCR fueron de tamaños idénticos tanto en el tejido del mutante como del tipo salvaje. No obstante, los productos amplificados por PCR del mutante de ADNc que rodean la región interna de 555 pares de bases entre los cebadores PGM-R1262 (SEC ID NO:8) y PGM-R1816 (SEC ID NO:9) fueron sometidos a electroforesis como tres bandas. Una banda fue aproximadamente 150 pares de bases más grande que la banda de tipo salvaje. La segunda banda fue aproximadamente 170 pares de bases más pequeña que la banda de tipo salvaje. La tercera banda fue del mismo tamaño que la banda de tipo salvaje (ver por ejemplo figura 10, las amplificaciones Fb/Rf y Fb/R1816). Los productos de PCR que abarcaban esta región interna de 555 pares de bases no tuvo un tamaño diferente entre el mutante y el tipo salvaje. Los fragmentos de ADNc amplificados con combinaciones de cebador PGM-Fb/PGM-R1816 (SEC ID NOS:5 y 9) y PGM-Fp/PGM-Rf (SEC ID NOS:3 y 10) fueron luego donados en PCRII-TOPO (Invitrogen) o SmaI-cut Bluescript (Stratagene) para un examen adicional.

- La PCR fue también usada para amplificar las secuencias genómicas de PGM plástida de tipo salvaje y mutante. No se vio ninguna diferencia en el tamaño de las bandas amplificadas. Las secuencias genómicas fueron amplificadas usando los cebadores PGM-F827 (SEC ID NO:6) y PGM-R1816 (SEC ID NO:9). Las secuencias genómicas amplificadas con estos cebadores fueron primero digeridas con *HindIII* y luego donadas en Bluescript digerido con *HindIII* EcoRV.

45 2. Análisis de secuencias de ADNc de PGM y clones genómicos

Secuencia de ADNc de PGM plástida de tipo salvaje

- La secuencia del ADNc de PGM plástida de tipo salvaje está mostrada en la figura 11. La región entre los cebadores PGM-Fp (SEC ID NO:3) y PGM-Rf (SEC ID NO: 10) fue secuenciada en ambas direcciones salvo una región de 132 pares de bases que fue ordenada en sólo una dirección. La región ordenada incluye la zona de codificación entera salvo los 8 residuos aminoácidos del C-terminal. Dos clones independientes fueron ordenados en toda esta región y no se encontraron diferencias entre estos clones.

Secuencia genómica de PGM plástida de tipo salvaje

- Una secuencia parcial del gen de PGM plástida de tipo salvaje está mostrada en la figura 7. Este gen fue secuenciado a partir del sitio *HindIII* que codificaba el residuo aminoácido 244 para el cebador PGM-R1816 (SEC ID NO:9), que codifica los residuos aminoácidos 573-580. La secuencia fue conducida en ambas direcciones salvo una región de 77 pares de bases entre los nucleótidos 1274-1350. Más de un clon independiente fue secuenciado excepto en la región entre los nucleótidos 1016-1350. Dentro de la región secuenciada 12 intrones fueron encontrados variando de tamaño entre 79-337 nucleótidos.

Secuencia genómica de PGM mutante

- 65 La variante mutante del gen de PGM plástida fue secuenciada en la misma región que el gen de tipo salvaje salvo por un espacio de 77 pares de bases entre los nucleótidos 1274 y 1350 que no fueron completamente secuenciados (figura 6). A excepción de la región entre los nucleótidos 959 y 1430, ambas cadenas y más de un clon independiente fueron secuenciados. Sólo una diferencia fue encontrada entre el tipo salvaje y las secuencias mutantes en la región

secuenciada, que fue en el nucleótido 1594 donde A en el dinucleótido AG del sitio de empalme 3' fue sustituido por T (con asteriscos 6 y 7).

Secuencia de cDNA1 de PGM plástida mutante

El ADNc de PGM plástida más grande amplificado en el mutante (de ahora en adelante denominado "ADNc1") está mostrado en la figura 12. El ADNc 1 fue secuenciado entre los cebadores PGM-Fp (SEC ID NO:3) y PGM-Rf (SEC ID NO:10). Entre los nucleótidos 888 y 1788 se secuenció en ambas direcciones y entre los nucleótidos 694 y 1915 más de un clon derivado independientemente fue secuenciado. El ADNc1 retiene no sólo el intrón con el sitio de empalme 3' mutado (marcado con asterisco), sino que también el intrón secuencia abajo (ambos intrones están mostrados en la figura 12 en *itálico*). No está claro por qué debería ser retenido el intrón secuencia abajo. Puede ser que el intrón mutado sea normalmente eliminado antes de que el intrón secuencia abajo pueda ser procesado o quizás la estructura secundaria que resulta de la retención del intrón mutado impide el procesamiento del intrón secuencia abajo.

La retención de las dos secuencias del intrón en ADNc resulta en un polipéptido de PGM plástida que es inmediatamente truncado por un codón de terminación cerca del extremo 5' del primer intrón retenido. Esto resulta en que los 173 aminoácidos del C-terminal se pierden de la PGM plástida.

En el Northern blot mostrado en la figura 8, el único transcrito que se ve que se acumula en los cotiledones de bsg es más grande que el transcrito de tipo salvaje. Puesto que el ADNc1 fue el único ADNc de PGM plástida amplificado que es sustancialmente más grande que el transcrito de tipo salvaje, se cree que corresponde al transcrito más importante que se acumula en el bsg mutante.

Secuencia de ADNc2 de PGM plástida mutante

El siguiente ADNc de PGM plástida más grande amplificado en el bsg mutante (de ahora en adelante "ADNc2") está mostrado en la figura 13. El ADNc2 fue secuenciado en ambas direcciones a partir de dos clones independientes en la región entre los cebadores PGM-Fb (SEC ID NO:5) y PGM-R1816 (SEC ID NO:9). El ADNc2 es aproximadamente del mismo tamaño que la secuencia de tipo salvaje pero carece de los 11 primeros nucleótidos del exón directamente secuencia abajo desde el intrón mutado. Esto resulta de la utilización de un dinucleótido AG del sitio de empalme 3' en el exón secuencia abajo. Como resultado, una mutación de desplazamiento del marco de lectura es creada y 23 aminoácidos son sustituidos del marco de lectura incorrecto por los 174 aminoácidos del C-terminal de PGM plástida. En la figura 13, los dos nucleótidos que flanquean la supresión de 11 pares de bases están mostrados en **negrita**.

Secuencia de ADNc3 de PGM plástida mutante

El ADNc de PGM plástida más pequeño amplificado en el bsg mutante (de ahora en adelante "ADNc3") está mostrado en la figura 14. Dos clones de ADNc3 independientes fueron secuenciados entre los cebadores PGM-Fp (SEC ID NO:3) y PGM-Rf (SEC ID NO:10). Ambas cadenas fueron secuenciadas en la región entre los nucleótidos 716 y 1565. El ADNc3 de PGM plástida es más pequeño que el transcrito de tipo salvaje debido a una supresión del exón de 142 pares de bases inmediatamente secuencia abajo del intrón mutado. Esto resulta de la sustitución del sitio de empalme 3' en el intrón secuencia abajo por el sitio de empalme 3' mutado. Como resultado, se crea una mutación de desplazamiento del marco de lectura y 9 aminoácidos son sustituidos por los 173 aminoácidos del C-terminal de la PGM plástida. En la figura 14, los dos nucleótidos que flanquean este exón eliminado están mostrados en **negrita**.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ADN aislada con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO:1.

2. Molécula de ADN aislada con una secuencia de nucleótidos que se hibridiza bajo condiciones severas para la SEC ID NO:1, donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una mutación en un intrón, donde la mutación previene la escisión del intrón de un transcrito primario durante la modificación postranscripcional del transcrito, dando como resultado al menos un ARNm aberrante.

3. Molécula de ADN según la reivindicación 2, donde la mutación se hace en un sitio de empalme 3' en el intrón.

4. Molécula de ADN según la reivindicación 3, donde la mutación se hace en un dinucleótido AG, donde el nucleótido A es sustituido por el nucleótido T.

5. Vector de expresión que contiene la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un promotor y señal de poliadenilación, donde el promotor está operativamente enlazado a la molécula de ADN y la molécula de ADN está operativamente enlazada a la señal de poliadenilación.

6. Vector según la reivindicación 5, donde el promotor es el promotor 35S del virus mosaico de la coliflor.

7. Vector según la reivindicación 5, donde la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación del gen 35S de la coliflor.

8. Célula bacteriana que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

9. Célula bacteriana según la reivindicación 8, donde la célula bacteriana está seleccionada del grupo que se compone de una célula de *Agrobacterium tumefaciens* y una célula de *Agrobacterium rhizogenes*.

10. Método para producir una planta recombinante o célula vegetal, dicho método comprendiendo la transformación de una planta o una célula vegetal por una molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o por un vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o por una célula bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9.

11. Método según la reivindicación 10, donde dicha planta o célula vegetal es una planta o célula de *Pisum sativum*.

12. Célula vegetal recombinante transformada con una molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

13. Célula vegetal recombinante según la reivindicación 12, donde el promotor es un promotor 35S del virus mosaico de la coliflor y la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación del gen 35S del mosaico de la coliflor.

14. Célula vegetal recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde la célula vegetal es una célula de *Pisum sativum*.

15. Una planta de *Pisum sativum* comprendiendo dentro de su genoma una molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

16. Guisantes cosechados de la planta según la reivindicación 15.

17. Planta según la reivindicación 15 o los guisantes según la reivindicación 16, donde dicha molécula de ADN está presente en condición homocigota.

18. Guisantes según la reivindicación 16 o 17, donde dichos guisantes comprenden del 6 al 7.5 por ciento en peso fresco de sacarosa cuando se mide a un valor de tenderómetro de 90 a 110.

19. Guisantes según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, donde dichos guisantes comprenden del 6.5 al 8.0 por ciento en peso de sólidos insolubles en alcohol cuando se mide a un valor de tenderómetro de 105.

20. Uso de una planta de *Pisum sativum* según la reivindicación 15 o 17 para cruzar dicha planta con otra planta de *Pisum sativum*.

21. Método para hacer una planta de *Pisum sativum* que comprende una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y/o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 dentro de su genoma, dicho método comprendiendo el cruce de una planta según la reivindicación 15 o 17 con otra planta de *Pisum sativum* y la recolecta de las semillas que resultan de dicho cruce.

Figura 1a

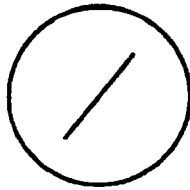


Figura 1b

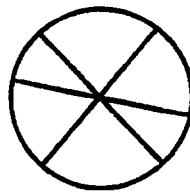


Figura 1c

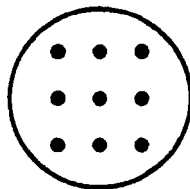


Figura 2

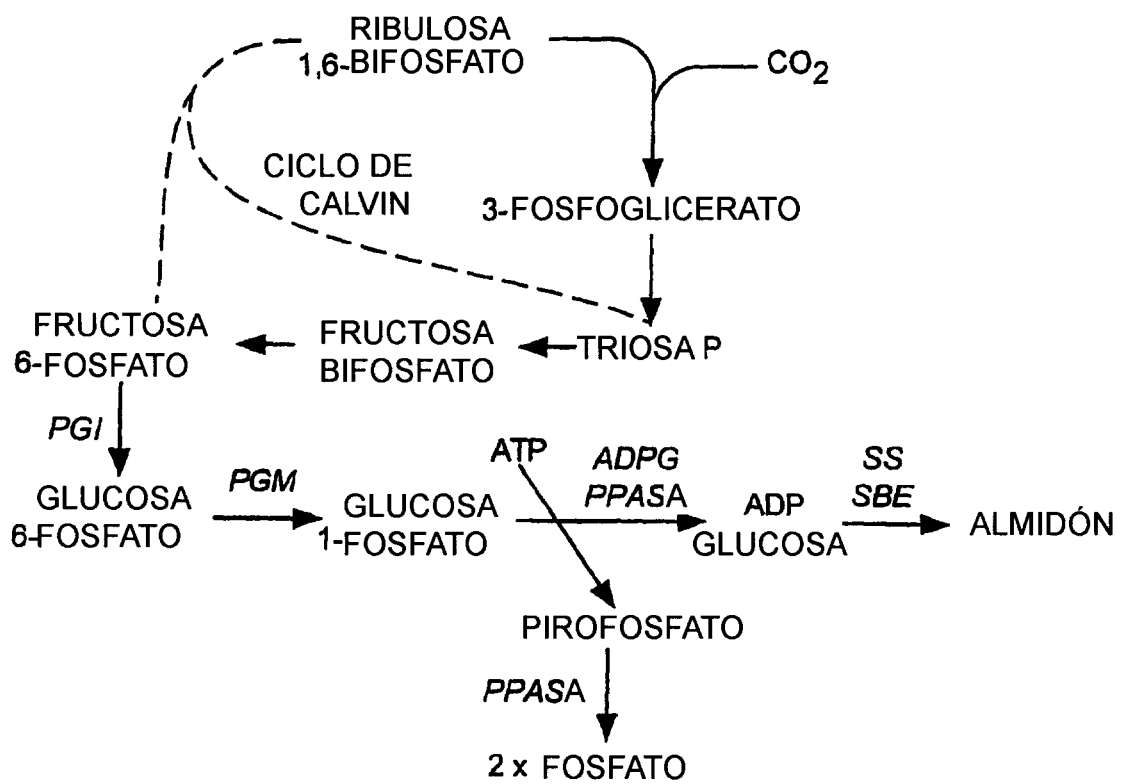


Figura 3

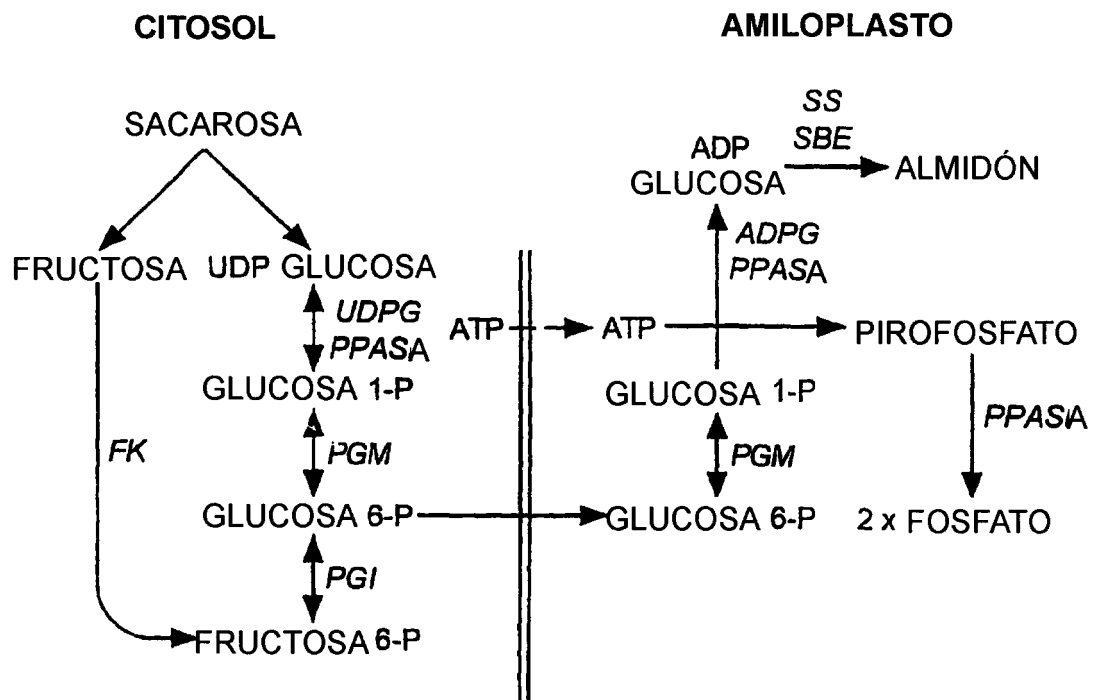


Figura 4

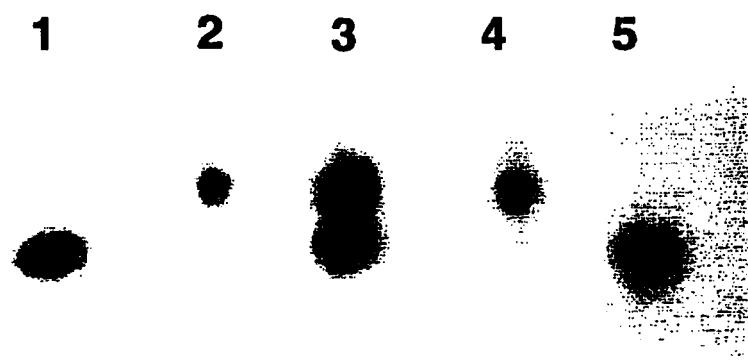


Figura 5

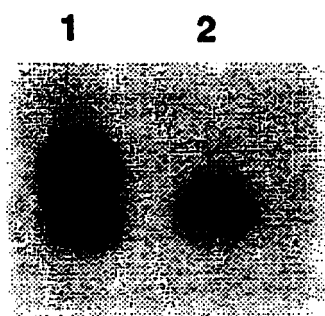


Figura 6

HindIII (1)

1 AAGCTTCAGTGTGGAAGTAATAGACCCAGTTTCTGATTACCTGGAGTTATTGGAGGTCAAAAATAATCCTTTTT

73 TCTTCATTATAATCCAGTAGAATGATTCATGCAAGCTCGATCTCTGTGTGTGAGAGTTTATTTCATTTCATTTTCGTCTAAAGT

155 TTATTTGTTATTATTTTTTGTGCAGACAGTGTTCGATTTTCAGCTAATCAAAGTCTTATTTCACGGCCAGAT

XbaI (281)

228 TTTAGGTACAACCTTAACATTTATTCCACCATAATCCAATCTTGGCACATTGTCTAGAATCTGATGTGTGTAAATTTTTT

SphI (335)

309 TATTTTAGGTTTACATTTGATGCCATGCGACTTGCCGGTGCTTATGCAACACCCATTTTCGTTGATAA

380 ACTTGGTGTCTAGTCCGGTATAGTTCTCCCCCTTTTACTCTGTACATAGCGGGTACAAGTTTATACGGTATTGTTGATT

459 TTGGGTGTTAAGTATGCAATGTAGGATTCAATTTCAAATGGAATACCTTTGGAAGATTTTGGACATGGTCATC

532 CTGATCCTAATCTAACGTGAGTTTAGTTTTATATTTTCGACATTGTGTTTTCAATCATAGTAAATTGTTTTTGATTCT

611 AATGTTTTATTGAACAGATACGCAAGGATCTTTGTCAATATTATGTATGCTGAAAACGGACCTGATTTTGGTGTG

683 CCGCTAGTGATGTATGCGAGATTTTAGTTATTTTTGAAAATTAACCTGTTTCCGTTGATAAATCCTTGTGCAACAATGT

BglII (801)

763 TTTGTCTGAACCCAGAGCAATTGGATGAGATGGTAAGAGATCTCTTCAGCTTAACCTGAGGTCTGAGTTTGAACTCAGT

XhoI (912)

845 CCTGGGCACGCAACAGTGCTAAATTCCTTTGAGAGAGAACTTTGCCGTCCATTGCGGTCTCTCCCAGCTCGAGGGATTAGTC

PstI (928)

927 TCTGCAGTTGCACGCAGAGGATACCCGATTTTTACTGTAAAAAACAATGTTTTTTGTCTGCATTGTTTFACTTGATAATGT

1009 TTATGTATTTTAACTTTTCGTTTAGGTGATGGTGATAGAAATATGATTTTGGGAACAAGTTTCTTTCGTAACCTCC

1082 TTCAGACTCTGTAGCCGTTATTGTCAGCCAAATGCAAAAAGAAGCGATTCCGTACTTTAAGGACAGTATCAAG

1152 GTAGAAAGTTTGTGCATATCATATTATTACAAGTATTCGTGTGTGTA AACAGAGTGCATTGTTCTGTATTGTAATTGC

XbaI (1268)

1234 AGGGTCTTGCACGATCAATGCCGACAAGCGGTGCTCTAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

XbaI (1351)

1304 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTAGATTATGGTTCTCGAATGACAGACGGACC

1384 TC GGGTGCAGGTTCCCACTGGTTGGAAATCTTTTGGTAATCTTPATGGATGCTGGAAATCTGTTCGATTTCGG

1455 GGGAAGAGAGTTTTTGGAACAGGTTCTGACCAACATTCTGTAGAAAAGACGGAATCTGGTAACCTTCTTATTTTTT

1527 GTATTGAGAATAGCGGGTCGAGCATTTATCAAACATTATCTAAGTTTCTCCGACTTATTAATATTATTTGGGCTGTATTAG

*
1607 CTTGGCTTTTCGATTATTGCTCACCGCAACAAGACACGAAACCAGGGGAGAAATTGGTCTCTGTGTCTGA

XbaI (1720)

1677 TGTTGTGAAGGAGCATTGGGCAACCTATGGTGAAAAATTTCTTTTCTAGATACGATTACGAGGTTGGTTTTTG

1748 ATGCTGCAATTGAAGTTTATTTGTGTATCACACACTTTGAAGTTTATTTTCTTTTGAGTTTTGACAAATATAAATATA

1830 GGAATGTGAATCCGAAGGCCGAAATAAGATGATAGAGTACCTACGAGAGCTTTTGTGGAAGAGCAAGCCT

1900 GGTGATAAGTATGGTAAGTTACTCAACACCACTTCTTATCACAGACACGGAGACACGGACCAAAACACGACATTGAC

1979 ATTGGCACGTAATCATTAGCATACACTTCCCTGAGTATATTTAAAGTGTGATGAGTTTCTTGTACAGGAAGTTACGTC

2059 CTCAGTTTGGCGATGATTATACATACACTGATCCTGTAAGTTCTTACAACCTTACATTCATCATGTTGATTTT

2135 TGTTTCTTCAACTTACGGTAAATCAACCATAGTTCAAATCTGATTGAATAAAAACATGCAGGTAGATGGAAGTGTAGT

2214 ATCAAAAACAAGGGGTTCCGGTTTGTTTTCACCGATGGTTCAAGAAATTATTTACCGTTTATCAGTAAGTAACG

2285 TCTGTTTAATTACTTACCCGAAAAATTTATGAAATGAAATATTAAAGTGATTACTTACGGTGTTTTTGTTTACAGGGAACG

2365 GGTCTCGCTGGTGCACCTGTTAGAGTG

Figura 7

HindIII (1)

1 **AAGCTTTCAGTGTGGAAGTAATAGACCCAGTTTCTGATTACCTGGAGTTATTGGAGGTCAAAAATAATCTTTT**
 73 **TCTTCATTATAATCCAGTAGAATGATTCATGCAAGCTCGATCTCTGTGTGAGAGTTTATTTCATTTCATTTCGTC**
 155 **TTATTTGTTATTATTTTGTGTCAGACAGTGTTCGATTTTCAGCTAATCAAAAGTCTTATTTTCACGGCCAGAT**

XbaI (281)

228 **TTTAGGTACAACCTTAACATTTATTCACCATAATCCAAATCTTGGCACATTGCTCTAGAATCTGATGTGTAAATTTTTT**

SphI (335)

309 **TATTTTAGGTTTACATTTGATGCCATGCGATGCGAGTTGCCGGTGCTTATGCAACACCCATTTTCGTTGATAA**
 380 **ACTTGGTGCTAGTCCGGTATAGTTCTTCCCTTTTACTCTTGTACATAGCGGGTACAAGTTTATACGGTATTGTTGATT**
 459 **TTGGGTGTTAAGTATGCAATGTAGGATTCAATTTCAAAATGGAATACCTTTTGGAAAGATTTTGGACATGGTCATC**
 532 **CTGATCCTAATCTAACGTGAGTTTGTATTTTATATTTTCGACATGTGTGTTTCAATCATAGTAAATTGTTTGTGATTCT**
 611 **AATGTTTATTGAACAGATACGCAAAAGGATCTTTGTCAATATTATGTATGCTGAAAACGGACCTGATTTTGGTG**
 683 **CCGCTAGTGATGGTATGCGAGATTTTAGTTATTTTGAATTTTAACTGTGTTCCGTTGATAAATCCTTGTGCAACAATGT**

BglII (801)

763 **TTTGTCTGAACCAAGAGCAATTGGATGAGATGGTAAGAGATCTCTTTCAGCTTAACCTGAGGTCTGAGTTTGAACTCAGT**

XhoI (912)

845 **CCTGGGCACGCAACAGTGCTAAATTCCTCTGAGAGAGAACTTTGCCGTCATTGCCGTCTCCCCAGCTCGAGGGATTAGTC**

PstI (928)

927 **TCTGCAGTTGCACGCAGAGGATACCCGATTTTTACTGTAAAAAACAATGTTTTTGTCTGCATTTGTTTACTTGTATAATGT**
 1009 **TTATGTATTTTAACTTTCGTTTGGTGTATGGTGATAGAAATATGATTTTGGGAACAAGTTTCTTTCGTAACCTCC**
 1082 **TTTCAGACTCTGTAGCCGTTATTGTCAGCCAAATGCAAAAGAAGCGATTCCGTACTTTAAGGACAGTATCAAG**
 1152 **GTAGAAAGTTTGTGCATATCATATTATTCACAAGTATTCGTTGTGTGTAAGACAGAGTGCATTGTTCTGTATGTAAATTGC**

XbaI (1268)

1234 **AGGGTCTTGCACGATCAATGCCGACAAGCGGTGCTCTAGATAGAGTTGCTGAAAAGTTGAACCTCCCTTTT**

XbaI (1351)

1304 **TTTTCAGGTATAGTATGATTTTACATTGTTGTGCGTTTGAATTTATCTAGATTATGGTTCTCGAATGACAGACGGACC**
 1384 **TCGGGTGCAGGTTCCCACTGGTTGGAAATCTTTTGGTAATCTTATGGATGCTGGAAATCTGTTCGATTTCGG**
 1455 **GGGAAGAGAGTTTTTGGAAACAGGTTCTGACCACATTCTGTGAGAAAGACGGAACTCTGTAACCTTCTTATTTTT**
 1527 **GTATTGAGAATAGCGGTGAGCATTATCAACAATATCTAAGTTTCTCCGACTTATTAATATTATAGGGCTGTATTAG**
 1607 **CTTGGCTTTTCGATTATTGCTCACCGCAACAAGACACGAAACCAGGGGAGAAATGGTCTCTGTGTCTGA**

XbaI (1720)

1677 **TGTTGTGAAGGAGCATTGGGCAACCTATGTTAGAAATTTCTTTTCTAGATACGATTACGAGGTTGGTTTTG**
 1748 **ATGCTGCAATTGAAGTTTATTTGTGTATCACACACTTTGAAGTTTATTTTTCTTTTGTGAGTTTGTACAAATATAAATATA**
 1830 **GGAATGTGAATCCGAAGCGCAAAATAAGATGATAGAGTACCTACGAGAGCTTTTGTCTGAAGAGCAAGCCT**
 1900 **GGTGATAAGTATGTAAGTTACTCACAACCACTTCTTATCACAGACACGGAGACACGGACACCAAAACACGACATTGAC**
 1979 **ATTGGCACGTAATCATTAGCATACACTTCCCTGAGTATATTTAAAGTGTGATGAGTTTCTTGTACAGGAAGTTACGTC**
 2059 **CTCCAGTTTCCCGATGATTATACATACACTGATCCTGTAAAGTTCTTACAACCTTACATTCTCATCATGTTGATTTT**
 2135 **TGTTTCTTCAACTTACGGTAAATCAACCATAGTTCAAATTCGATTGAATAAAAACATGCAGGTAGATGGAAGTGTAGT**
 2214 **ATCAAAACAAGGGGTTCCGGTTTGTTTTCCCGATGGTTCAAGAATTATTTACCGTTTATCAGTAAGTAACG**
 2285 **TCTGTTTAAATTAACCTACCCGAAAAATTTATGAAATGAAATATTAAGTGATTACTTACGGTGTTTTTGTTTACAGGGAAACG**
 2365 **GGTCTGCTGGTGCAACTGTTAGAGTG**

←

Figura 8

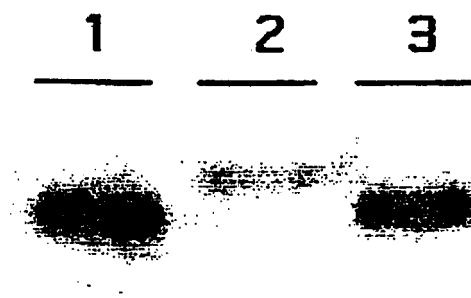
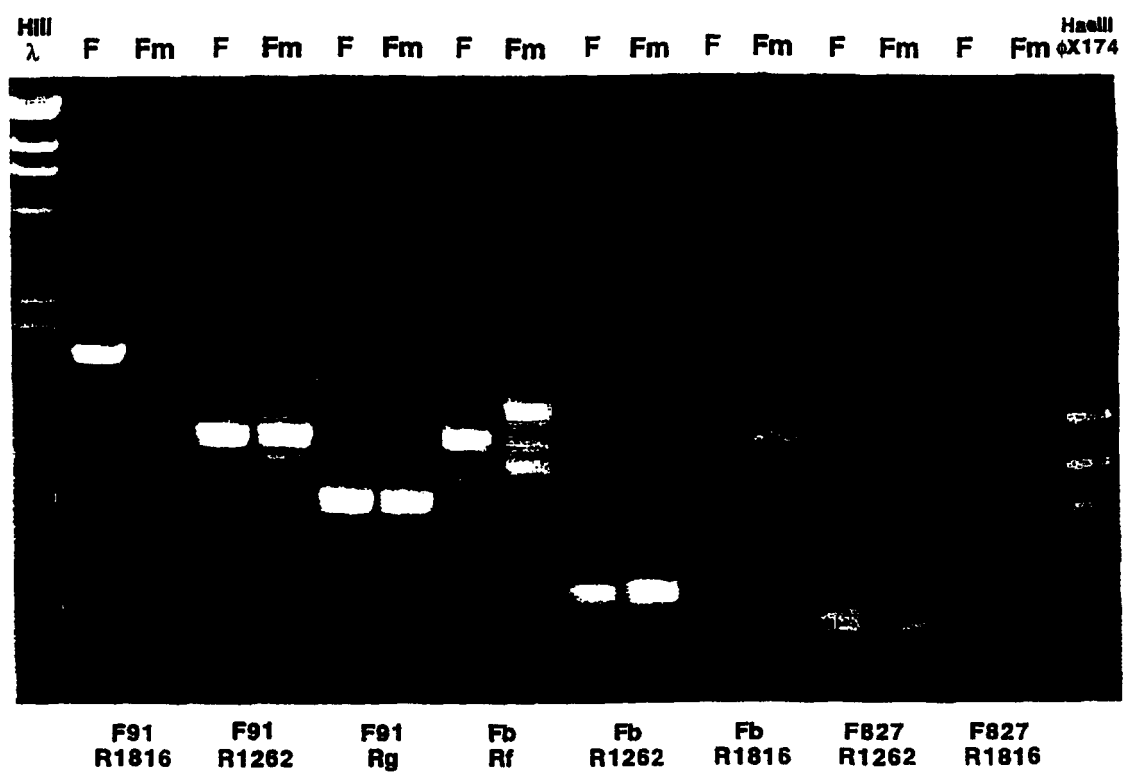


Figura 10



cebadores:

Figura 11

1 CACTGTTACAGACTCGATCAATGGCTTCTGTTACAGACTCGACAACCTTCATCATCTCTGCGTTTAAACCCAAACACTCA
 1► Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe Ile Ile Ser Ala Phe Lys Pro Lys His Ser
 81 AATGTCACCACTTTCATTCATTCATCAATCCAAATTTCTCTCTTCAAGTTCAAACTTTCTTTCAGGGTTCGCTA
 21► Asn Val Pro Leu Ser Ile His His Ser Ser Ser Asn Phe Pro Ser Phe Lys Val Gl Asn Phe Pro Phe Arg Val Arg Ty
 A
 161 TAATTCAGCTATTAGAGCCACTTCGTCTTCTCTTCTACTCCCACAACCATTCAGAACCTAATGACATTAAAGATTAAC
 47► r Asn Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Pro Thr Thr Ile Ala Glu Pro Asn Asn Ile Lys Ile Asn S
 A KpnI (278) T
 241 CTATTCCTACTAAACCTATTGAAGGACAAAAAAGTGGTACCAGTGGCCTAAGAAAAAGGTGAAAGTGTTTAAGCAAGAA
 74► er Ile Pro Thr Lys Pro Ile Glu Glu Lys Thr Glu Thr Ser Glu Leu Arg Lys Lys Val Lys Val Phe Lys Glu Glu
 321 AATFACCTTGCAAAATGGATTTCAGGCACTGTTTAAATTCGTTGCCCGGAGGATTACAAGAATGGATTGTTGGTTTGGG
 101► Asn Tyr Leu Ala Asn Trp Ile Glu Ala Leu Phe Asn Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Glu Leu Val Leu Gl
 401 AGGCGATGGTTCGATACTTCAATAAAGAGCTGCACAGATAATAATCAAGATTGCTGCTGGAAATGGTGTGGAAAAATTC
 127► y Glu Asp Glu Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala Glu Ile Ile Ile Ile Lys Ile Ala Ala Glu Asn Glu Val Glu Lys Ile
 481 TGGTTGGGAAGGAAGGATATTGTCAACGCCAGCCGTTTCTGCTGTGATAAGGAAGAGAGAGGCAAAATGGTGGGTTCATC
 154► eu Val Glu Lys Glu Glu Ile Leu Ser Thr Pro Ala Val Ser Ala Val Ile Arg Lys Arg Glu Ala Asn Glu Glu Phe Ile
 561 ATGAGTGCAGGACATAACCCCTGGTGACCTGAATATGATTGGGGTATTAAAGTTTAAATTACAGTAGCGGACAACTGCACC
 181► Met Ser Ala Ser His Asn Pro Glu Glu Pro Glu Tyr Asp Trp Glu Ile Lys Phe Asn Tyr Ser Ser Glu Glu Pro Ala P
 Clal (877)
 641 AGAATCCATCACCGACAAGATTTACGGAAACACCCCTATCGATTCTGAGATAAAGATTGCTGATATCCCGATGTTGACT
 207► o Glu Ser Ile Thr Asp Lys Ile Tyr Glu Asn Thr Leu Ser Ile Ser Glu Ile Lys Ile Ala Asn Ile Pro Asp Val Asp L
 HindIII (749)
 721 TATCAAAATGTTGGAGTTACGAAATTCGGAAGCTTCAGTGTGGAAGTAATAGACCCAGTTTCTGATTACCTGGAGTTATTG
 234► eu Ser Asn Val Glu Val Thr Lys Phe Glu Ser Phe Ser Val Glu Val Ile Asp Pro Val Ser Asp Tyr Leu Glu Leu Leu
 SphI (875)
 801 GAGACAGTGTTCGATTTTCAGCTAATCAAAAGTCTTATTTACCGCCAGATTTTAGGTTTACATTGTATGCCATGCATGC
 261► Glu Thr Val Phe Asp Phe Glu Leu Ile Lys Ser Leu Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe Asp Ala Met His Ala
 881 AGTTGCCGGTGTCTATCAACACCCATTTTCGTTGATAAACTTGGTGTCTAGTCCGGATTCAATTTCAAATGGAATACCTT
 287► a Val Ala Glu Val Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val Asp Lys Leu Glu Val Ser Pro Asp Ser Ile Ser Asn Glu Ile Pro L
 961 TGGAAAGATTTGGACATGGTCATCCTGATCCTAATCTAACATACGCAAGGATCTGTCAATATATATGCTGAAAAC
 314► u Glu Asp Phe Glu His Glu His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys Asp Leu Val Asn Ile Met Tyr Ala Glu Asn
 1041 GGACCTGATTTTGGTCCCGCTAGTGATGGTGTGATAGAAATATGATTTTGGGAACAAGTTTCTTCTGTAACCTCCTTC
 341► Glu Pro Asp Phe Glu Val Ala Ser Asp Glu Asp Glu Asp Arg Asn Met Ile Leu Glu Thr Ser Phe Phe Val Thr Pro Se
 1121 AGACTCTGTAGCCGTTATTGCAACCAATGCAAAAGAACGATTCCGTACTTTAAGGACAGTATCAAGGGTCTTGCACGAT
 367► r Asp Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys Glu Ala Ile Pro Tyr Phe Lys Asp Ser Ile Lys Glu Leu Ala Arg S
 XbaI (1220)
 1201 CAATGCCGACAAGCGGTGCTCTAGATAGAGTTGCTGAAAAGTTGAACCTCCCTTTTTTTGAGGTTCCCACTGGTTGGAAA
 394► er Met Pro Thr Ser Glu Ala Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu Pro Phe Phe Glu Val Pro Thr Glu Trp Lys
 1281 TTCTTTGGTAATCTTATGGATGCTGGAAATCTGTGATTTGCGGGGAAGAGATTGTTGGAACAGGTTCTGACACATTCG
 421► Phe Phe Glu Asn Leu Met Asp Ala Glu Asn Leu Ser Ile Cys Glu Glu Glu Ser Phe Glu Thr Glu Ser Asp His Ile Ar
 1361 TGAGAAAGACGGAATCTGGCTGTATTAGCTTGGCTTTGCGATTATGCTCACCGCAACAAAGACACGAAACCGGGGAGA
 447► g Glu Lys Asp Glu Ile Trp Ala Val Leu Ala Trp Leu Ser Ile Ile Ala His Arg Asn Lys Asp Thr Lys Pro Glu Glu L
 XbaI (1503)
 1441 AATGGTCTCTGTGCTGATGTTGTGAAGGAGCATTGGGCAACCTATGGTAGAAATTTCTTTCTAGATACGATTACGAG
 474► y Leu Val Ser Val Ser Asp Val Val Lys Glu His Trp Ala Thr Tyr Glu Arg Asn Phe Phe Ser Arg Tyr Asp Tyr Glu
 1521 GAATGTGAATCCGAAGGCGCAATAGATGATAGATACCTACGAGAGCTTTTGTGGAAGAGCAAGCCTGGTGATAAGTA
 501► Glu Cys Glu Ser Glu Glu Val Asn Lys Met Ile Glu Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Ser Lys Ser Lys Pro Glu Asp Lys Ty
 1601 TGGAAAGTTACGTCCTCCAGTTTGGCGATGATTATACATACACTGATCCTGTAGATGGAAGTGTAGTATCAAAACAAGGGG
 527► r Glu Ser Tyr Val Leu Glu Phe Ala Asp Asp Tyr Thr Tyr Thr Asp Pro Val Asp Glu Ser Val Val Ser Lys Glu Glu YV
 1681 TTCGGTTTGTGTTTACCGATGGTTCAAGAATTATTTACCGTTTATCAGGAACGGGTTCTGCTGGTGCAACTGTTAGAGTG
 554► a Arg Phe Val Phe Thr Asp Glu Ser Arg Ile Ile Tyr Arg Leu Ser Glu Thr Glu Ser Ala Glu Val Thr Val Arg Val
 1761 TATATCGAACAGTTTGAACAGATGTTTCTAAACACGACGTCGATGCTCAAAATGCTTGAACCATTAATAGATTAGC
 581► Tyr Ile Glu Glu Phe Glu Pro Asp Val Ser Lys His Asp Val Asp Ala Glu Ile Ala Leu Lys Pro Leu Ile Asp Leu Al
 1841 ATATCTGTTTCAAAGCTCAAAGACTTCACAGGA
 607► a Leu Ser Val Ser Lys Leu Lys Asp Phe Thr Glu

Figura 12

1 CTTCTGTTACAGACTCGACAACCTTCATCTCTCTGCGTTTAAACCCAAAGACTCAAATGTCCTCCACTTTC
 1PheCysTyrArgLeuAspAsnPheIleIleSerAlaPheLysProLysHisSerAsnValProLeuSe
 71 AATTCATCATTCATCATCCAATTTTCCTTCTTTCAAAGTTCAAACCTTTCCTTTCAGGGTTTCGCTATAAT
 23PrlleHisHisSerSerSerAsnPheProSerPheLysValGlnAsnPheProPheArgValArgTyrAsn
 141 TCAGCTATTAGAGCCACTTCGTCTTCTCTCTACTCCCAACCACTTGCAGAACCTTAATGACATTAAGA
 47SerAlalleArgAlaThrSerSerSerSerSerThrProThrThrIleAlaGluProAsnAspIleLysI
 KpnI (252)
 211 TTAACCTCTATTCTACTAAACCTATTGAAGGACAAAAAAGTGGTACCAGTGGCCTAAGAAAAAGGTGAA
 70IleAsnSerIleProThrLysProIleGluGlyGlnLysThrGlyThrSerGlyLeuArgLysLysValLy
 281 AGTGTTTAAGCAAGAAAATTACCTTGCAAAATGGATTTCAGGCACCTGTTTAATTCGTTGCCGCCGAGGAT
 93sValPheLysGlnGluAsnTyrLeuAlaAsnTrpIleGlnAlaLeuPheAsnSerLeuProProGluAsp
 351 TACAAGAATGGATTGTTGGTGGTGGGAGGCGATGGTCGATACTTCAATAAAGAAGCTGCACAGATAATAA
 117TyrLysAsnGlyLeuLeuValLeuGlyGlyAspGlyArgTyrPheAsnLysGluAlaAlaGlnIleIleIle
 421 TCAGATTGCTGCTGGAAATGGTGGTGGGAAAAATTCGTTGGGAAGGAAGGGATATTGTCAACGCCAGC
 140IleLysIleAlaAlaGlyAsnGlyValGlyLysIleLeuValGlyLysGluGlyIleLeuSerThrProAl
 491 CGTTTCTGCTGTGATAAGGAAGAGAGAGGCAAAATGGTGGGTTTATCATGAGTGCAGCCATAACCTGGT
 163aValSerAlaValIleArgLysArgGluAlaAsnGlyGlyPheIleMetSerAlaSerHisAsnProGly
 561 GGACCTGAATATGATTGGGGTATTAAGTTTAATTACAGTAGCGGACAACCTGCACCAGAATCCATCACCG
 187GlyProGluTyrAspTrpGlyIleLysPheAsnTyrSerSerGlyGlnProAlaProGluSerIleThrA
 ClaI (853)
 631 ACAAGATTTACGGAAACACCTATCGATTTCGAGATAAAGATTGCTGATATCCCGATGTTGACTTATC
 210sPlyIleTyrGlyAsnThrLeuSerIleSerGluIleLysIleAlaAspIleProAspValAspLeuSe
 HindIII (725)
 701 AAATGTTGGAGTTACGAAATTCGGAAGCTTCAGTGTGGAAGTAATAGACCCAGTTTCTGATTACCTGGAG
 233rAsnValGlyValThrLysPheGlySerPheSerValGluValIleAspProValSerAspTyrLeuGlu
 771 TTATTGGAGACAGTGTTCGATTTTCAGCTAATCAAAAGTCTTATTTACGGCCAGATTTTAGGTTTACAT
 257LeuLeuGluThrValPheAspPheGlnLeuIleLysSerLeuIleSerArgProAspPheArgPheThrP
 SphI (851)
 841 TTGATGCCATGCGATGCGGCTGCTTATGCAACACCCATTTCGTTGATAAACTTGGTGCTAGTCC
 280heAspAlaMetHisAlaValAlaGlyAlaTyrAlaThrProIlePheValAspLysLeuGlyAlaSerPr
 911 GGATTCAAATTCAAATGGAATACCTTTGGAAGATTTTGGACATGGTCATCCTGATCCTAATCTAACATAC
 303oAspSerIleSerAsnGlyIleProLeuGluAspPheGlyHisGlyHisProAspProAsnLeuThrTyr
 981 GCAAAGGATCTTGTCATFATTATGTATGCTGAAACGGACCTGATTTTGGTGCCGCTAGTGATGGTGATG
 327AlaLysAspLeuValAsnIleMetTyrAlaGluAsnGlyProAspPheGlyAlaAlaSerAspGlyAspG
 1051 GTGATAGAAATATGATTTTGGGAACAAGTTTCTTCTGTAACCTCCTTCAGACTCTGTAGCCGTTATTCGAGC
 350IyAspArgAsnMetIleLeuGlyThrSerPhePheValThrProSerAspSerValAlaValIleAlaAl
 1121 CAATGCAAAAGAAAGCGATTCCTGACTTTAAAGACAGTATCAAGGGTCTTGCACGATCAATGCCGACAAAGC
 373aAsnAlaLysGluAlaIleProTyrPheLysAspSerIleLysGlyLeuAlaArgSerMetProThrSer
 XbaI (1198)
 1191 GGTGCTCTAGATAGAGTTGCTGAAAAAGTTGAACCTCCCTTTTTTGAAGGTTCCTCCACTGGTTGGAATTC
 397GlyAlaLeuAspArgValAlaGluLysLeuAsnLeuProPhePheGluValProThrGlyTrpLysPheP
 1261 TTGGTAACTTATGGATGCTGGAATCTGTCGATTTGCGGGGAAGAGAGTTTGGAAACAGGTTCTGACCA
 420heGlyAsnLeuMetAspAlaGlyAsnLeuSerIleCysGlyGluGluSerPheGlyThrGlySerAspHi
 1331 CATTCGTGAGAAAGACGGAATCTGTAACTTTCTTATTTTGTATTGAGAAATAGCGGGTCGAGCATTTATCAAACATT
 443sIleArgGluLysAspGlyIleTrp
 1409 ATCTAAGTTTCTCCGACTTATTAATATTATTGGGCTGTATTAGCTTGGCTTTTCGATTATTGCTCACCGCAACAA
 1484 GACACGAAACCAAGGGGAGAAATGGTCTCTGTGTCTGATGTTGTGAAGGAGCATTGGGCAACCTATGGTA
 XbaI (1585)
 1554 GAAATTTCTTTTCTAGATACGATTACGAGGTTGGTTTTGATGCTGCAATTGAAGTTTTATTTGTTGTATCACACT
 1631 TTGAAGTTTTATTTTCTTTTGAGTTTTGACAAATATAAATATAGGAATGTGAATCCGAAGGGCGAAATAAGATGAT
 1708 AGAGTACCTACGAGAGCTTTTGTGGAAGAGCAAGCCTGGTGATAAGTATGGAAGTTACGTCCTCCAGTTT
 1778 GCCGATGATTATACATACACTGATCCTGTAGATGGAAGTGTAGTATCAAAACAAGGGGTTTCGGTTTGT
 1848 TCACCGATGGTTCAAGAATTATTTACCGTTTATCAGGAACGGGTTCTGCTGGTGCAACTGTTAGAGTGT
 1918 TATCGAACAGTTTGAACAGATGTTTCTAAACACGACGTCGATGCTCAAATTCCTTACCATKDAATA
 1988 GATTTAGCAATATCTGTTT

Figura 13

HindIII (55)

1 GATTGCTGATATTCCCGATGTTGACTTATCAAATGTTGGAGTTACGAAATTCGGAAGCTTCAGTGTGGAAGTAATAGAC
 1► I I e A l a A s p l l e P r o A s p V a l A s p L e u S e r A s n V a l G l y V a l T h r L y s P h e G l y S e r P h e S e r V a l G l u V a l l l e A s p
 80 CCAGTTTCTGATTACCTGGAGTTATTGGAGACAGTGTTCGATTTCAGCTAATCAAAAGTCTTATTTACGGCCAGATT
 27► P r o V a l S e r A s p T y r L e u G l u L e u L e u G l u T h r V a l P h e A s p P h e G l n L e u l l l e L y s S e r L e u l l l e S e r A r g P r o A s p P

SphI (181)

159 TTAGGTTTACATTTGATGCCATGCATGCAGTTGCCGGTGCTTATGCAACACCCATTTCGTTGATAAACTTGGTGCTAG
 53► h e A r g P h e T h r P h e A s p A l a M e t H i s A l a V a l A l a G l y A l a T y r A l a T h r P r o l l e P h e V a l A s p L y s L e u G l y A l a S e
 238 TCCGATTCAATTTCAAATGGAATACCTTTGGGAAGATTTTGGACATGGTCATCCTGATCCTAATCTAACATACGCAAAG
 79► r P r o A s p S e r l l l e S e r A s n G l y l l l e P r o L e u G l u A s p P h e G l y H i s G l y H i s P r o A s p P r o A s n L e u T h r T y r A l a L y s
 317 GATCTTGTCATATATTATGTATGCTGAAAACGGACCTGATTTTGGTGCCGCTAGTGATGGTGATGGTGATAGAAATATGA
 106► A s p L e u V a l A s n l l l e M e t T y r A l a G l u A s n G l y P r o A s p P h e G l y A l a A l a S e r A s p G l y A s p G l y A s p A r g A s n M e t l
 396 TTTTGGGAACAAGTTTCTTCGTAACCTCCTCAGACTCTGTAGCCGTTATTGCAGCCAATGCAAAAGAAGCGATTCCGTA
 132► l e L e u G l y T h r S e r P h e P h e V a l T h r P r o S e r A s p S e r V a l A l a V a l l l e A l a A l a A s n A l a L y s G l u A l a l l e P r o T y

XbaI (526)

475 CTTTAAGGACAGTATCAAGGGTCTTGACGATCAATGCCGACAAGCGGTGCTCTAGATAGAGTTGCTGAAAAGTTGAAC
 158► r P h e L y s A s p S e r l l l e L y s G l y L e u A l a A r g S e r M e t P r o T h r S e r G l y A l a L e u A s p A r g V a l A l a G l u L y s L e u A s n
 554 CTCCCTTTTTCGAGGTTCCCACTGGTTGGAAATTCCTTTGGTAATCTTATGGATGCTGGAAATCTGTGCGATTTCGGGG
 185► L e u P r o P h e P h e G l u V a l P r o T h r G l y T r p L y s P h e P h e G l y A s n L e u M e t A s p A l a G l y A s n L e u S e r l l l e C y s G l y G

▲

633 AAGAGAGTTTGGAAACAGGTTCTGACCACATTCGTTGAGAAAGACGGAATCTGCTTGGCTTTCGATTATTGCTCACC GCA
 211► l u G l u S e r P h e G l y T h r G l y S e r A s p H i s l l l e A r g G l u L y s A s p G l y l l l e C y s L e u A l a P h e A s p T y r C y s S e r P r o G l
 712 ACAAAGACACGAAACCAGGGGAGAAATTGGTCTCTGTGTCTGATGTTGTGAAGGAGCATTTGGGCAACCTATGGTAGAAA
 237► n G l n A r g H i s G l u T h r A r g G l y G l u l l l e G l y L e u C y s V a l

XbaI (798)

791 TTTCTTTTCTAGATACGATTACGAGGAATGTGAATCCGAAGGCGCAAATAAGATGATAGAGTACCTACGAGAGCTTTTG
 870 TCGAAGAGCAAGCCTGGTGATAAGTATGGAAGTTACGTCCTCCAGTTTGCCGATGATTATACATACACTGATCCTGTAG
 949 ATGGAAGTGTAGTATCAAAACAAGGGTTTCGGTTTGTTCACCGATGGTTCAAGAATTATTTACCGTTTATCAGGAAC
 1028 GGGTTCGCTGGTGCAACTGTTAGAGTG

◀

Figura 14

1 CACTGTTACAGACTCGATCAATGGCTTTCTGTTACAGACTCGACAACCTTCATCATCTCTGCGTTTAAACCCAAACACTCA
 1► MetAlaPheCysTyrArgLeuAspAsnPheIleIleSerAlaPheLysProLysHisSer
 81 AATGTCCCACTTTCAATTCATCATTCATCATCCAATTTTCTCTCTTCAAAGTTCAAACCTTTCTTTTCAGGGTTCGCTA
 21► AsnValProLeuSerIleHisHisSerSerSerAsnPheProSerPheLysValGlnAsnPheProPheArgValArgTy
 161 TAATTACAGCTATTAGAGCCACTTCGTCCTCTCTCTCTACTCCACAAACCTTGCAGAACCTAATGACATTAAGATTAACT
 47► rAsnSerAlaIleArgAlaThrSerSerSerSerSerThrProThrThrIleAlaGluProAsnAspIleLysIleAsnS
 KpnI (276)
 241 CTATTCCTACTAAACCTATTGAAGGACAAAACTGGTACCAGTGGCCTAAGAAAAAGGTGAAAGTGTTTAAGCAAGAA
 74► erIleProThrLysProIleGluGlyGlnLysThrGlyThrSerGlyLeuArgLysLysValLysValPheLysGlnGlu
 321 AATTACCTTGCAAATTTGGATTTCAGGCACTGTTTAATTCGTTCCCGCGGAGGATTACAAGAATGGATTGTTGGTTTTGGG
 101► AsnTyrLeuAlaAsnTrpIleGlnAlaLeuPheAsnSerLeuProProGluAspTyrLysAsnGlyLeuLeuValLeuGlu
 401 AGCGCATGGTTCGATACTTCAATAAAGAAGCTGCACAGATAATAATCAAGATTGCTGCTGGAAATGGTGTGGAAAAATTC
 127► yGlyAspGlyArgTyrPheAsnLysGluAlaAlaGlnIleIleIleLysIleAlaAlaGlyAsnGlyValGlyLysIleL
 481 TGGTTGGGAAGGAAGGGATATTGTCAACGCCAGCCGTTTCTGCTGTGATAAGGAAGAGAGAGGCAAATGGTGGGTTTATC
 154► euValGlyLysGluGlyIleLeuSerThrProAlaValSerAlaValIleArgLysArgGluAlaAsnGlyGlyPheIle
 561 ATGAGTGGGAGCCATAACCTTGGTGGACCTGAATATGATTGGGGTATTAAAGTTTAATTACAGTAGCGGACAACTGCACC
 181► MetSerAlaSerHisAsnProGlyGlyProGluTyrAspTrpGlyIleLysPheAsnTyrSerSerGlyGlnProAlaPr
 ClnI (677)
 641 AGAATCCATCACCGACAAGATTTACGGAAACACCCCTATCGATTCTCTGAGATAAAGATTGCTGATAATCCCGATGTTGACT
 207► oGluSerIleThrAspLysIleTyrGlyAsnThrLeuSerIleSerGluIleLysIleAlaAspIleProAspValAspL
 HindIII (749)
 721 TATCAAATGTTGGAGTTACGAAATTCGGAAGCTTCAGTGTGGAAGTAATAGACCCAGTTTCTGATTACCTGGAGTTATTG
 234► euSerAsnValGlyValThrLysPheGlySerPheSerValGluValIleAspProValSerAspTyrLeuGluLeuLeu
 SphI (875)
 801 GAGACAGTGTTCGATTTTCAGCTAATCAAAAGTCTTATTTCACGGCCAGATTTTAGGTTTACATTTGATGCCATGCATGC
 261► GluThrValPheAspPheGlnLeuIleLysSerLeuIleSerArgProAspPheArgPheThrPheAspAlaMetHisAl
 881 AGTTGCCGGTGTCTATGCAACACCCATTTTCGTTGATAAACTTGGTGTCTAGTCCGGATTCAATTTCAAATGGAATACCTT
 287► aValAlaGlyAlaTyrAlaThrProIlePheValAspLysLeuGlyAlaSerProAspSerIleSerAsnGlyIleProL
 961 TGAAGATTTTGGACATGGTCATCCTGATCCTAATCTAACATACGCAAGGATCTGTGCAATATTATGTATGCTGAAAAC
 314► euGluAspPheGlyHisGlyHisProAspProAsnLeuThrTyrAlaLysAspLeuValAsnIleMetTyrAlaGluAsn
 1041 GGACCTGATTTTGGTCCCGCTAGTGTGATGGTGTGATAGAAATATGATTTTGGGAACAAGTTTCTTCGTAACCTCCTTC
 341► GlyProAspPheGlyAlaAlaSerAspGlyAspGlyAspArgAsnMetIleLeuGlyThrSerPhePheValThrProSe
 1121 AGACTCTGTAGCCGTTATTGCAGCCAAATGCAAAAGAAGCGATTCCGTACTTTAAGGACAGTATCAAGGGTCTTGCAAGAT
 367► rAspSerValAlaValIleAlaAlaAsnAlaLysGluAlaIleProTyrPheLysAspSerIleLysGlyLeuAlaArgS
 XbaI (1220)
 1201 CAATGCCGACAAGCGGTGCTCTAGATAGAGTTGCTGAAAAGTTGAACCTCCCTTTTGTGAGGTTCCCACTGGTTGGAAA
 394► erMetProThrSerGlyAlaLeuAspArgValAlaGluLysLeuAsnLeuProPhePheGluValProThrGlyTrpLys
 1281 TTTCTTTGGTAATCTTATGGATGCTGGAAATCTGTGCAATTCGCGGGAAGAGAGTTTGGAAACAGGTTCTGACCACATCTG
 421► PhePheGlyAsnLeuMetAspAlaGlyAsnLeuSerIleCysGlyGluGluSerPheGlyThrGlySerAspHisIleAr
 1361 TGAGAAAGACCGAATCTGGAATGTGAATCCGAAGGCGCAAATAAGATGATAGAGTACCTACGAGAGCTTTTGTGCAAGA
 447► gGluLysAspGlyIleTrpAsnValAsnProLysAlaGlnIleArg
 1440 GCAAGCCTGGTGATAAGTATGGAAGTTACGTCTCCAGTTTGGCGATGATTATACATACACTGATCCTGTAGATGGAAGT
 1520 GTAGTATCAAAACAAGGGGTTCGGTTTGTTTTCACCGATGGTTCAAGAATTATTTACCGTTTATCAGGAACGGGTCTCTGC
 1600 TGGTGAACCTGTTAGAGTGTATATCGAACAGTTTGAACAGATGTTTCTAAACACGACGTCGATGCTCAAATTCCTTTGA
 1680 AACCATTAATAGATTTAGCATTATCTGTTTCAAAGCTCAAAGACTTCACAGGGA

ES 2 268 808 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Webster, David
Burguess, Diane
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Una variedad de *Pisum sativum* sin almidón con niveles elevados de saca-
rosa
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 21
- (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- 15 (A) DESTINATARIO: Rockey, Milnamow & Katz, Ltd.
(B) CALLE: 180 N. Stetson Avenue, 2 Prudential Plaza, Suite 4700
(C) CIUDAD: Chicago
(D) ESTADO: IL
20 (E) PAÍS: E.E.U.U.
(F) CÓDIGO POSTAL: 60601
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: PC IBM compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- 35 (A) NÚMERO DE DEPÓSITO:
(B) FECHA DE SOLICITUD:
(C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DE REPRESENTANTE/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: Mueller, Lisa V.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 38,978
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: SVS3801P0302
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: 312-616-5400
(B) TELEFAX: 312-616-5460

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2391 pares de bases
(B) TIPO: Ácido nucleico
55 (C) TIPO DE CADENA: único
(D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:1:
- 65

ES 2 268 808 T3

	AAGCTTCAGT GTGGAAGTAA TAGACCCAGT TTCTGATTAC CTGGAGTTAT TGGAGGTCAA	60
5	AATAATCTTT TTCTTCATT ATAATCCAGT AGAATGATTC ATGCAAGCTC GATCTCTGTG	120
	TTGAGAGTTT TATTTCAATT CATTTCTGCT AAGTTTATTT GTTATTATTT TTTGTGCAGA	180
	CAGTGTTTGA TTTTCAGCTA ATCAAAAGTC TTATTTCAAG GCCAGATTTT AGGTACAACC	240
10	TTAACATTTA TTCCACCATA ATCCAAATCT TGGCAGATTG TCTAGAATCT GATTGTGTTA	300
	AATTTTTTTA TTTTAGGTTT ACATTTGATG CCATGCATGC AGTTGCCGGT GCTTATGCRA	360
15	CACCCATTTT CGTTGATAAA CTTGGTGTCT GTCCGGTATA GTTCTTCCCC TTTTACTCTT	420
	GTACATAGCG GGTACAAGTT TATACGGTAT TGTTGATTTT GGGTGTAAAG TATGCAATGT	480
	AGGATTCAAT TTCAAATGGA ATACCTTTGG AAGATTTTGG ACATGGTCAT CCGTATCCTA	540
20	ATCTAACGTG AGTTTAGTTT TATATTTTCG ACATTGTGTT TTCAATCATT AGTAAATTGT	600
	TTTGATTCTT AATGTTTATT GAACAGATAC GCAAAGGATC TTGTCAATAT TATGTATGCT	660
25	GAAAACGGAC CTGATTTTGG TGCCGCTAGT GATGSTATGC GAGATTTTAG TTATTTTGA	720
	AATTTAACTT GTTTCGGTGG ATAAATCCTT GTGCAACAAT GTTTTGTCTG AACCCAAGAG	780
	CAATTGGATG AGATGGTAAG AGATCTCTTT CAGCTTAACC TGAGGTCTCG AGTTTGAAC	840
30	CAGTCCCTGG CACGCAACAG TGCTAAATTC TCTTGAGAGA GAACTTTCCC GTCCATTGCG	900
	GTCCCTCCCA GCTCGAGGGA TTAGTCTCTG CAGTTGCACG CAGAGGATAC CCGATTTTGA	960
35	CTGTAAAAAA ACAATGTTTT TTGTCTGCAT TTGTTTACTT GATAATGTTT ATGTATTTTA	1020
	ACTTTCGTTT AGGTGATGCT GATAGAAATA TGATTTTGGG AACAAGTTTC TTCGTAATTC	1080
40	CTTCAGACTC TGTAGCCGTT ATTGCAGCCA ATGCAAAAGA AGCGATTCCG TACTTTAAGG	1140
	ACAGTATCAA GGTAGAAAGT TTGTGCATAT CATATTATTC ACAAGTATTC GTTGTTGTAA	1200
	AACAGAAATG TCATTGTTCT GTATTGTAAT TGCAGGCTCT TGCACGATCA ATGCCGACAA	1260
45	GCGGTGCTCT AGANNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	1320
	NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN TCTAGATTAT GGTCTCTGAA TGACAGACGG	1380
50	ACCTCGGGTG CAGGTTCCCA CTGGTTGGAA ATTCTTTGGT AATCTTATGG ATGCTGGAAA	1440
	TCTGTCAATT TCGGGGAAG AGAGTTTGG AACAGGTTCT GACCACATTC GTGAGAAAGA	1500
	CGGAATCTGG TAACTTTCTT ATTTTGTAT TGAGAATAGC GGGTCGAGCA TTTATCAAAC	1560
55	ATTATCTAAG TTTCTCCGAC TTATTAATAT TATGCGGCTG TATTAGCTTG GCTTTCTGAT	1620

ES 2 268 808 T3

```

ATTGCTCACC GCAACAAAGA CACGAAACCA GGGGAGAAAT TGGTCTCTGT GTCTGATGTT 1680
GTGAAGGAGC ATTGGGCAAC CTATGGTAGA AATTTCTTTT CTAGATACGA TTACGAGGTT 1740
GGTTTTGATG CTGCAATTGA AGTTTTATTT GTTGATCAC AACTTTGAA GTTTTATTTT 1800
TCTTTTGAGT TTTGACAAAT ATAAATATAG GAATGTGAAT CCGAAGGCGC AAATAAGATG 1860
ATAGAGTACC TACGAGAGCT TTTGTGGAAG AGCAAGCCTG GTGATAAGTA TGGTAAGTTA 1920
CTCACAACCA CTTTCTTATC ACAGACACGG AGACACGGAC ACCAAACACG ACATTGACAT 1980
TGGCACGTAA TCATTAGCAT AACTTTCCC TGAGTATATT TAAAGTGTA TGAGTTTCTT 2040
TGTACAGGAA GTTACGTCTT CCAGTTGCC GATGATTATA CATACACTGA TCCTGTAAGT 2100
TCTTACAAC TACATTCTC ATCATGTTGA TTTTGTTC TTCAACTTAC GGTAAATCAA 2160
CCATAGTTCA AATCTGATT GAATAAAAC ATGCAGGTAG ATGGAAGTGT AGTATCAAAA 2220
CAAGGGGTTT GGTGTGTTTT CACCGATGGT TCAAGAATTA TTTACCGTTT ATCAGTAAGT 2280
AACGTCTGTT TAATTACTTA CCCGAAAAAT TTATGAAATG AAATATTAAG TGATTACTTA 2340
CGGTGTTTTT GTTTACAGGG AACGGGTCT GCTGTTGCAA CTGTTAGAGT G 2391

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2391 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:2:

```

AAGCTTCAGT GTGGAAGTAA TAGACCCAGT TTCTGATTAC CTGGAGTTAT TGGAGGTCAA 60
AATAATCTTT TTTCTTCATT ATAATCCAGT AGAATGATTC ATGCAAGCTC GATCTCTGTG 120
TTGAGAGTTT TATTTTCATTT CATTTCGTCT AAGTTTATTT GTTATTATTT TTTGTGCAGA 180
CAGTGTTCGA TTTTCAGCTA ATCAAAAGTC TTATTTCCAG GCCAGATTTT AGGTACAACC 240
TTAACATTTA TTCCACCATA ATCCAAATCT TGGCACATTG TCTAGAACTT GATTGTGTTA 300
AATTTTTTTA TTTTAGGTTT ACATTTGATG CCATGCATGC AGTTGCCGGT GCTTATGCAA 360
CACCCATTTT CGTTGATAAA GTTGGTGCTA GTCCGGTATA GTTCTTCCCC TTTTACTCTT 420
GTACATAGCG GGTACAAGTT TATACGGTAT TGTGATTTT GGGTGTTAAG TATGCAATGT 480

```

ES 2 268 808 T3

AGGATTC AAT TTCAAATGGA ATACCTTTGG AAGATTTTGG ACATGGTCAT CCTGATCCTA 540
 ATCTAACGTC AGTTTAGTTT TATATTTTCG ACATTGTGTT TTCAATCATT AGTAAATTGT 600
 TTTTGATTCT AATGTTTATT GAACAGATAC GCAAAGGATC TTGTCAATAT TATGTATGCT 660
 GAAAACGGAC CTGATTTTGG TGCCGCTAGT GATGGTATGC GAGATTTTAG TTATTTTGA 720
 AATTTAACTT GTTTCGGTTG ATAAATCCTT GTGCAACAAT GTTTTGTCTG AACCACAAGAG 780
 CAATGGATG AGATGGTAAG AGATCTCTTT CAGCTTAACC TGAGGTCCCTG AGTTTGAACCT 840
 CAGTCCCTGG CACGCAACAG TGCTAATTC TCTTGAGAGA GAACTTTGCC GTCCATTGCG 900
 GTCCTCCCCA GCTCGAGGGA TTAGTCTCTG CACTTGCAAG CAGAGGATAC CCGATTTTGA 960
 CTGTAAAAAA ACAATGTTTT TTGTCTGCAT TTGTTTACTT GATAATGTTT ATGTATTTTA 1020
 ACTTTCGTTT AGGTGATGGT GATAGAAATA TGATTTTGGG AACAAATTTC TTCGTAACCTC 1080
 CTTCAGACTC TGTAGCCCTT ATTGCAGCCA ATGCAAAAGA AGCGATTCCG TACTTTAAGG 1140
 ACAGTATCAA GGTAGAAAGT TTGTGCATAT CATATTATTC ACAAGTATTC GTTGTTGTAA 1200
 AACAGAAGTG TCATTGTTCT GTATTGTAAT TGCAGGCTCT TGCACGATCA ATGCCGACAA 1260
 GCGGTGCTCT AGATAGAGTT GCTGAAAAGT TGAACCTCCC TTTTTTGGAG GTATAGTATG 1320
 ATTTTACATT GTTGTTGGGT TTAGAAATAT TCTAGATTAT GGTTCCTGAA TGACAGACGG 1380
 ACCTCGGGTG CAGGTTCCCA CTGGTTGGAA ATTCTTTGGT AATCTTATGG ATGCTGGAAA 1440
 TCTGTGATTT TGCGGGGAAG AGAGTTTTGG AACAGGTTCT GACCACATTC GTGAGAAAGA 1500
 CGGAATCTGG TAACTTCTTT ATTTTTGTAT TGAGAATAGC GGGTCGAGCA TTTATCAAAC 1560
 ATTATCTAAG TTTCTCCGAC TTATTAATAT TATAGGGCTG TATTAGCTTG GCTTTGATTT 1620
 ATTGCTCACC GCAACAAAGA CACGAAACCA GGGGAGAAAT TGGTCTCTGT GTCTGATGTT 1680
 GTGAAGGAGC ATTGGGCAAC CTATGGTAGA AATTTCTTTT CTAGATACGA TTACGAGGTT 1740
 GGTTTTGATG CTGCAATTGA AGTTTATTTT GTTGATTCAC ACACTTTGAA GTTTTATTTT 1800
 TCTTTTGAGT TTTGACAAAT ATAAATATAG GAATGTGAAT CGAAGGCGC AAATAAGATG 1860
 ATAGAGTACC TACGAGAGCT TTTGTGGAAG AGCAAGCCTG GTGATAAGTA TGGTAACTTA 1920
 CTCACAACCA CTTTCTTATC ACAGACACGG AGACACGAGC ACCAAACACG ACATTGACAT 1980
 TGGCACGTAA TCATTAGCAT ACACTTTCCC TGAGTATATT TAAAGTGTGA TGAGTTTCTT 2040
 TGTACAGGAA GTTACGTCTT CCAGTTTGCC GATGATTATA CATACACTGA TCCTGTAAAT 2100
 TCTTACAACT TCACATTCTC ATCATGTTGA TTTTGTGTTT TTCAACTTAC GGTAAATCAA 2160

ES 2 268 808 T3

```

CCATAGTTCA AATTCTGATT GAATAAAAC ATGCAGGTAG ATGGAAGTGT AGTATCAAAA 2220
CAAGGGGTTT GGTTCGTTTT CACCGATGGT TCAAGAATTA TTTACCGTTT ATCAGTAAGT 2280
AACGTCTGTT TAATTACTTA CCCGAAAAAT TTATGAAATG AATATTTAAG TGATTACTTA 2340
CGGTGTTTTT GTTACAGGG AACGGGTTCT GCTGGTGCAA CTGTTAGAGT G 2391

```

5

10

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID NO:3:

25

CACTGTTACA GACTCGATCA ATGG

24

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

35

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:4:

40

CAGACTCGAC AACTTCATCA TCTCT

25

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:5:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

50

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:5:

GATTGCTGAT ATTCCCGATG

20

60 (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

65

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

ES 2 268 808 T3

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:6:

GACCCAGTTT CTGATTACCT GGAG

24

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:7

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:7:

GGTTTACATT TGATGCCATG CATGC

25

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:8:

TCAAGGGTCT TGCACGATCA ATG

23

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:9:

TCTGCTGGTG CAACTGTTAG AGTG

24

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

ES 2 268 808 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:10:

5 CAAAGCTCAA AGACTTCACA GGGAGA

26

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:11:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2182 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 77..1954

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:11:

CAAACACATA GTTAAACAAA AAACACTCTC TCTTGACTCT TCGAAGAAAA AGTTGTCACT 60

GTTACAGACT CGATCA ATG GCT TTC TGT TAC AGA CTC GAC AAC TTC ATC 109

Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe Ile

1

5

10

ATC TCT GCG TTT AAA CCC AAA CAC TCA AAT GTC CCA CTT TCA ATT CAT 157

Ile Ser Ala Phe Lys Pro Lys His Ser Asn Val Pro Leu Ser Ile His

15

20

25

CAT TCA TCA TCC AAT TTT CCT TCT TTC AAA GTT CAA AAC TTT CCT TTC 205

His Ser Ser Ser Asn Phe Pro Ser Phe Lys Val Gln Asn Phe Pro Phe

30

35

40

ES 2 268 808 T3

5	AGG GTT CGC TAT AAT TCA GCT ATT AGA GCC ACT TCA TCT TCC TCT TCT Arg Val Arg Tyr Asn Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser 45 50 55	253
10	ACT CCC ACA ACC ATT GCA GAA CCT AAT GAC ATT AAG ATT AAC TCT ATT Thr Pro Thr Thr Ile Ala Glu Pro Asn Asp Ile Lys Ile Asn Ser Ile 60 65 70 75	301
15	CCT ACT AAA CCT ATT GAA GAA CAA AAA ACT GGT ACC AGT GGT CTA AGA Pro Thr Lys Pro Ile Glu Glu Gln Lys Thr Gly Thr Ser Gly Leu Arg 80 85 90	349
20	AAA AAG GTG AAA GTG TTT AAG CAA GAA AAT TAC CTT GCA AAT TGG ATT Lys Lys Val Lys Val Phe Lys Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Asn Trp Ile 95 100 105	397
25	CAG GCA CTG TTT AAT TCG TTG CCG CCG GAG GAT TAC AAG AAT GGA TTG Gln Ala Leu Phe Asn Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Gly Leu 110 115 120	445
30	TTG GTT TTG GGA GGC GAT GGT CGA TAC TTC AAT AAA GAA GCT GCA CAG Leu Val Leu Gly Gly Asp Gly Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala Gln 125 130 135	493
35	ATA ATA ATC AAG ATT GCT GCT GGA AAT GGT GTT GGA AAA ATT CTG GTT Ile Ile Ile Lys Ile Ala Ala Gly Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Val 140 145 150 155	541
40	GGG AAG GAA GGG ATA TTG TCA ACG CCA GCC GTT TCT GCT GTG ATA AGG Gly Lys Glu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ala Val Ser Ala Val Ile Arg 160 165 170	589
45	AAG AGA GAG GCA AAT GGT GGG TTT ATC ATG AGT GCG AGC CAT AAC CCT Lys Arg Glu Ala Asn Gly Gly Phe Ile Met Ser Ala Ser His Asn Pro 175 180 185	637
50	GGT GGA CCT GAA TAT GAT TGG GGT ATT AAG TTT AAT TAC AGT AGC GGA Gly Gly Pro Glu Tyr Asp Trp Gly Ile Lys Phe Asn Tyr Ser Ser Gly 190 195 200	685
55	CAA CCT GCA CCA GAA TCC ATC ACC GAC AAG ATT TAC GGA AAC ACC CTA Gln Pro Ala Pro Glu Ser Ile Thr Asp Lys Ile Tyr Gly Asn Thr Leu 205 210 215	733
60	TCG ATT TCT GAG ATA AAG ATT GCT GAT ATT CCC GAT GTT GAC TTA TCA Ser Ile Ser Glu Ile Lys Ile Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu Ser 220 225 230 235	781
65	AAT GTT GGA GTT ACG AAA TTC GGA AGC TTC AGT GTG GAA GTA ATA GAC Asn Val Gly Val Thr Lys Phe Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile Asp 240 245 250	829
	CCA GTT TCT GAT TAC CTG GAG TTA TTG GAG ACA GTG TTC GAT TTT CAG Pro Val Ser Asp Tyr Leu Glu Leu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe Gln 255 260 265	877

ES 2 268 808 T3

5	CTA ATC AAA AGT CTT ATT TCA CGG CCA GAT TTT AGG TTT ACA TTT GAT Leu Ile Lys Ser Leu Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe Asp 270 275 280	925
10	GCC ATG CAT GCA GTT GCC GGT GCT TAT GCA ACA CCC ATT TTC GTT GAT Ala Met His Ala Val Ala Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val Asp 285 290 295	973
15	AAA CTT GGT GCT AGT CCG GAT TCA ATT TCA AAT GGA ATA CCT TTG GAA Lys Leu Gly Ala Ser Pro Asp Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu Glu 300 305 310 315	1021
20	GAT TTT GGA CAT GGT CAT CCT GAT CCT AAT CTA ACA TAC GCA AAG GAT Asp Phe Gly His Gly His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys Asp 320 325 330	1069
25	CTT GTC AAT ATT ATG TAT GCT GAA AAC GGA CCT GAT TTT GGT GCC GCT Leu Val Asn Ile Met Tyr Ala Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala Ala 335 340 345	1117
30	AGT GAT GGT GAT GGT GAT AGA AAT ATG ATT TTG GGA ACA AGT TTC TTC Ser Asp Gly Asp Gly Asp Arg Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe Phe 350 355 360	1165
35	GTA ACT CCT TCA GAC TCT GTA GCC GTT ATT GCA GCC AAT GCA AAA GAA Val Thr Pro Ser Asp Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys Glu 365 370 375	1213
40	GCG ATT CCG TAC TTT AAG GAC AGT ATC AAG GGT CTT GCA CGA TCA ATG Ala Ile Pro Tyr Phe Lys Asp Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser Met 380 385 390 395	1261
45	CCG ACA AGC GGT GCT CTA GAT AGA GTT GCT GAA AAG TTG AAC CTC CCT Pro Thr Ser Gly Ala Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu Pro 400 405 410	1309
50	TTT TTT GAG GTT CCC ACT GGT TGG AAA TTC TTT GGT AAT CTT ATG GAT Phe Phe Glu Val Pro Thr Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met Asp 415 420 425	1357
55	GCT GGA AAT CTG TCG ATT TGC GGG GAA GAG AGT TTT GGA ACA GGT TCT Ala Gly Asn Leu Ser Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly Ser 430 435 440	1405
60	GAC CAC ATT CGT GAG AAA GAC GGA ATC TGG OCT GTA TTA GCT TGG CTT Asp His Ile Arg Glu Lys Asp Gly Ile Trp Ala Val Leu Ala Trp Leu 445 450 455	1453
65	TCG ATT ATT GCT CAC CGC AAC AAA GAC ACG AAA CCA GGG GAG AAA TTG Ser Ile Ile Ala His Arg Asn Lys Asp Thr Lys Pro Gly Glu Lys Leu 460 465 470 475	1501
	GTC TCT GTG TCT GAT GTT GTG AAG GAG CAT TGG GCA ACC TAT GGT AGA Val Ser Val Ser Asp Val Val Lys Glu His Trp Ala Thr Tyr Gly Arg 480 485 490	1549

ES 2 268 808 T3

5	AAT TTC TTT TCT AGA TAC GAT TAC GAG GAA TGT GAA TCC GAA GGC GCA Asn Phe Phe Ser Arg Tyr Asp Tyr Glu Glu Cys Glu Ser Glu Gly Ala 495 500 505	1597
10	AAT AAG ATG ATA GAG TAC CTA CGA GAG CTT TTG TCG AAG AGC AAG CCT Asn Lys Met Ile Glu Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Ser Lys Ser Lys Pro 510 515 520	1645
15	GGT GAT AAG TAT GGA AGT TAC GTC CTC CAG TTT GCC GAT GAT TAT ACA Gly Asp Lys Tyr Gly Ser Tyr Val Leu Gln Phe Ala Asp Asp Tyr Thr 525 530 535	1693
20	TAC ACT GAT CCT GTA GAT GGA AGT GTA GTA TCA AAA CAA GGG GTT CGG Tyr Thr Asp Pro Val Asp Gly Ser Val Val Ser Lys Gln Gly Val Arg 540 545 550 555	1741
25	TTT GTT TTC ACC GAT GGT TCA AGA ATT ATT TAC CGT TTA TCA GGA ACG Phe Val Phe Thr Asp Gly Ser Arg Ile Ile Tyr Arg Leu Ser Gly Thr 560 565 570	1789
30	GGT TCT GCT GGT GCA ACT GTT AGA GTG TAT ATC GAA CAG TTT GAA CCA Gly Ser Ala Gly Ala Thr Val Arg Val Tyr Ile Glu Gln Phe Glu Pro 575 580 585	1837
35	GAT GTT TCT AAA CAC GAC GTC GAT GCT CAA ATT GCC TTG AAA CCA TTA Asp Val Ser Lys His Asp Val Asp Ala Gln Ile Ala Leu Lys Pro Leu 590 595 600	1885
40	ATA GAT TTA GCA TTA TCT GTT TCA AAG CTC AAA GAC TTC ACA GGG AGA Ile Asp Leu Ala Leu Ser Val Ser Lys Leu Lys Asp Phe Thr Gly Arg 605 610 615	1933
45	GAG AAG CCT ACA GTC ATC ACT TAATATAAGT TTGGTTTTTC ATTTTCAGTT Glu Lys Pro Thr Val Ile Thr 620 625	1984
50	TTGGTTATTT TTCCACTTTG GAGCTTAGCA TCTTTTTTGT ATAATATGAT ATTTTGTATT	2044
55	TACTTTCAAG AAAATGAAGT ATCATTGTGT AACAGAATAA ATAATGGTAT TAATAATAGC	2104
60	TAGCTTCTAT GCAGAGAAGT TGTTCTTTTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	2164
65	AAAAAAAAAA AAAAAAAA	2182

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 626 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:12:

ES 2 268 808 T3

Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe Ile Ile Ser Ala Phe Lys
 1 5 10 15
 5 Pro Lys His Ser Asn Val Pro Leu Ser Ile His His Ser Ser Ser Asn
 20 25 30
 10 Phe Pro Ser Phe Lys Val Gln Asn Phe Pro Phe Arg Val Arg Tyr Asn
 35 40 45
 Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Pro Thr Thr Ile
 50 55 60
 15 Ala Glu Pro Asn Asp Ile Lys Ile Asn Ser Ile Pro Thr Lys Pro Ile
 65 70 75 80
 20 Glu Glu Gln Lys Thr Gly Thr Ser Gly Leu Arg Lys Lys Val Lys Val
 85 90 95
 Phe Lys Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Asn Trp Ile Gln Ala Leu Phe Asn
 100 105 110
 25 Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Gly Leu Leu Val Leu Gly Gly
 115 120 125
 30 Asp Gly Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala Gln Ile Ile Ile Lys Ile
 130 135 140
 Ala Ala Gly Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Val Gly Lys Glu Gly Ile
 145 150 155 160
 35 Leu Ser Thr Pro Ala Val Ser Ala Val Ile Arg Lys Arg Glu Ala Asn
 165 170 175
 40 Gly Gly Phe Ile Met Ser Ala Ser His Asn Pro Gly Gly Pro Glu Tyr
 180 185 190
 Asp Trp Gly Ile Lys Phe Asn Tyr Ser Ser Gly Gln Pro Ala Pro Glu
 195 200 205
 45 Ser Ile Thr Asp Lys Ile Tyr Gly Asn Thr Leu Ser Ile Ser Glu Ile
 210 215 220
 50 Lys Ile Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu Ser Asn Val Gly Val Thr
 225 230 235 240
 Lys Phe Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile Asp Pro Val Ser Asp Tyr
 245 250 255
 55 Leu Glu Leu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe Gln Leu Ile Lys Ser Leu
 260 265 270
 60 Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe Asp Ala Met His Ala Val
 275 280 285
 Ala Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val Asp Lys Leu Gly Ala Ser

ES 2 268 808 T3

	290	295	300
5	Pro Asp Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu Glu Asp Phe Gly His Gly 305 310 315 320		
	His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys Asp Leu Val Asn Ile Met 325 330 335		
10	Tyr Ala Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala Ala Ser Asp Gly Asp Gly 340 345 350		
15	Asp Arg Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe Phe Val Thr Pro Ser Asp 355 360 365		
	Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys Glu Ala Ile Pro Tyr Phe 370 375 380		
20	Lys Asp Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser Met Pro Thr Ser Gly Ala 385 390 395 400		
25	Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu Pro Phe Phe Glu Val Pro 405 410 415		
	Thr Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met Asp Ala Gly Asn Leu Ser 420 425 430		
30	Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly Ser Asp His Ile Arg Glu 435 440 445		
35	Lys Asp Gly Ile Trp Ala Val Leu Ala Trp Leu Ser Ile Ile Ala His 450 455 460		
	Arg Asn Lys Asp Thr Lys Pro Gly Glu Lys Leu Val Ser Val Ser Asp 465 470 475 480		
40	Val Val Lys Glu His Trp Ala Thr Tyr Gly Arg Asn Phe Phe Ser Arg 485 490 495		
45	Tyr Asp Tyr Glu Glu Cys Glu Ser Glu Gly Ala Asn Lys Met Ile Glu 500 505 510		
	Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Ser Lys Ser Lys Pro Gly Asp Lys Tyr Gly 515 520 525		
50	Ser Tyr Val Leu Gln Phe Ala Asp Asp Tyr Thr Tyr Thr Asp Pro Val 530 535 540		
55	Asp Gly Ser Val Val Ser Lys Gln Gly Val Arg Phe Val Phe Thr Asp 545 550 555 560		
	Gly Ser Arg Ile Ile Tyr Arg Leu Ser Gly Thr Gly Ser Ala Gly Ala 565 570 575		
60	Thr Val Arg Val Tyr Ile Glu Gln Phe Glu Pro Asp Val Ser Lys His 580 585 590		
65			

ES 2 268 808 T3

Asp Val Asp Ala Gln Ile Ala Leu Lys Pro Leu Ile Asp Leu Ala Leu
595 600 605

Ser Val Ser Lys Leu Lys Asp Phe Thr Gly Arg Glu Lys Pro Thr Val
610 615 620

Ile Thr
625

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1875 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 21..1875

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:13:

CACGTGTACA GACTCGATCA ATG GCT TTC TGT TAC AGA CTC GAC AAC TTC 50
Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe
1 5 10

ATC ATC TCT GCG TTT AAA CCC AAA CAC TCA AAT GTC CCA CTT TCA ATT 98
Ile Ile Ser Ala Phe Lys Pro Lys His Ser Asn Val Pro Leu Ser Ile
15 20 25

CAT CAT TCA TCA TCC AAT TTT CCT TCT TTC AAA GTT CAA AAC TTT CCT 146
His His Ser Ser Ser Asn Phe Pro Ser Phe Lys Val Gln Asn Phe Pro
30 35 40

TTC AGG GTT CGC TAT AAT TCA GCT ATT AGA GCC ACT TCG TCT TCC TCT 194
Phe Arg Val Arg Tyr Asn Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser
45 50 55

TCT ACT CCC ACA ACC ATT GCA GAA CCT AAT GAC ATT AAG ATT AAC TCT 242
Ser Thr Pro Thr Thr Ile Ala Glu Pro Asn Asp Ile Lys Ile Asn Ser
60 65 70

ATT CCT ACT AAA CCT ATT GAA GGA CAA AAA ACT GGT ACC AGT GGC CTA 290
Ile Pro Thr Lys Pro Ile Glu Gly Gln Lys Thr Gly Thr Ser Gly Leu
75 80 85 90

AGA AAA AAG GTC AAA GTC TTT AAG CAA GAA AAT TAC CTT GCA AAT TGG 338
Arg Lys Lys Val Lys Val Phe Lys Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Asn Trp
95 100 105

ES 2 268 808 T3

	ATT CAG GCA CTG TTT AAT TCG TTG CCG CCG GAG GAT TAC AAG AAT GGA	386
	Ile Gln Ala Leu Phe Asn Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Gly	
	110 115 120	
5	TTG TTG GTT TTG GGA GGC GAT GGT CGA TAC TTC AAT AAA GAA GCT GCA	434
	Leu Leu Val Leu Gly Gly Asp Gly Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala	
	125 130 135	
10	CAG ATA ATA ATC AAG ATT GCT GCT GGA AAT GGT GTT GGA AAA ATT CTG	482
	Gln Ile Ile Ile Lys Ile Ala Ala Gly Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu	
	140 145 150	
15	GTT GGG AAG GAA GGG ATA TTG TCA ACG CCA GCC GTT TCT GCT GTG ATA	530
	Val Gly Lys Glu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ala Val Ser Ala Val Ile	
	155 160 165 170	
20	AGG AAG AGA GAG GCA AAT GGT GGG TTT ATC ATG AGT GCG AGC CAT AAC	578
	Arg Lys Arg Glu Ala Asn Gly Gly Phe Ile Met Ser Ala Ser His Asn	
	175 180 185	
25	CCT GGT GGA CCT GAA TAT GAT TCG GGT ATT AAG TTT AAT TAC AGT AGC	626
	Pro Gly Gly Pro Glu Tyr Asp Trp Gly Ile Lys Phe Asn Tyr Ser Ser	
	190 195 200	
30	GGA CAA CCT GCA CCA GAA TCC ATC ACC GAC AAG ATT TAC GGA AAC ACC	674
	Gly Gln Pro Ala Pro Glu Ser Ile Thr Asp Lys Ile Tyr Gly Asn Thr	
	205 210 215	
35	CTA TCG ATT TCT GAG ATA AAG ATT GCT GAT ATT CCC GAT GTT GAC TTA	722
	Leu Ser Ile Ser Glu Ile Lys Ile Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu	
	220 225 230	
40	TCA AAT GTT GGA GTT ACG AAA TTC GGA AGC TTC AGT GTG GAA GTA ATA	770
	Ser Asn Val Gly Val Thr Lys Phe Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile	
	235 240 245 250	
45	GAC CCA GTT TCT GAT TAC CTG GAG TTA TTG GAG ACA GTG TTC GAT TTT	818
	Asp Pro Val Ser Asp Tyr Leu Glu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe	
	255 260 265	
50	CAG CTA ATC AAA AGT CTT ATT TCA CGG CCA GAT TTT AGG TTT ACA TTT	866
	Gln Leu Ile Lys Ser Leu Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe	
	270 275 280	
55	GAT GCC ATG CAT GCA GTT GCC GGT GCT TAT GCA ACA CCC ATT TTC GTT	914
	Asp Ala Met His Ala Val Ala Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val	
	285 290 295	
60	GAT AAA CTT GGT GCT AGT CCG GAT TCA ATT TCA AAT GGA ATA CCT TTG	962
	Asp Lys Leu Gly Ala Ser Pro Asp Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu	
	300 305 310	
65	GAA GAT TTT GGA CAT GGT CAT CCT GAT CCT AAT CTA ACA TAC GCA AAG	1010
	Glu Asp Phe Gly His Gly His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys	
	315 320 325 330	

ES 2 268 808 T3

5	GAT CTT GTC AAT ATT ATG TAT GCT GAA AAC GGA CCT GAT TTT GGT GCC Asp Leu Val Asn Ile Met Tyr Ala Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala 335 340 345	1058
10	GCT AGT GAT GGT GAT GGT GAT AGA AAT ATG ATT TTG GGA ACA AGT TTC Ala Ser Asp Gly Asp Gly Asp Arg Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe 350 355 360	1106
15	TTC GTA ACT CCT TCA GAC TCT GTA GCC GTT ATT GCA GCC AAT GCA AAA Phe Val Thr Pro Ser Asp Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys 365 370 375	1154
20	GAA GCG ATT CCG TAC TTT AAG GAC AGT ATC AAG GGT CTT GCA CGA TCA Glu Ala Ile Pro Tyr Phe Lys Asp Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser 380 385 390	1202
25	ATG CCG ACA AGC GGT GCT CTA GAT AGA GTT GCT GAA AAG TTG AAC CTC Met Pro Thr Ser Gly Ala Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu 395 400 405 410	1250
30	CCT TTT TTT GAG GTT CCC ACT GGT TGG AAA TTC TTT GGT AAT CTT ATG Pro Phe Phe Glu Val Pro Thr Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met 415 420 425	1298
35	GAT GCT GGA AAT CTG TCG ATT TGC GGG GAA GAG AGT TTT GGA ACA GGT Asp Ala Gly Asn Leu Ser Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly 430 435 440	1346
40	TCT GAC CAC ATT CGT GAG AAA GAC GGA ATC TGG GCT GTA TTA GCT TGG Ser Asp His Ile Arg Glu Lys Asp Gly Ile Trp Ala Val Leu Ala Trp 445 450 455	1394
45	CTT TCG ATT ATT GCT CAC CGC AAC AAA GAC ACG AAA CCA GGG GAG AAA Leu Ser Ile Ile Ala His Arg Asn Lys Asp Thr Lys Pro Gly Glu Lys 460 465 470	1442
50	TTG GTC TCT GTG TCT GAT GTT GTG AAG GAG CAT TGG GCA ACC TAT GGT Leu Val Ser Val Ser Asp Val Val Lys Glu His Trp Ala Thr Tyr Gly 475 480 485 490	1490
55	AGA AAT TTC TTT TCT AGA TAC GAT TAC GAG GAA TGT GAA TCC GAA GGC Arg Asn Phe Phe Ser Arg Tyr Asp Tyr Glu Glu Cys Glu Ser Glu Gly 495 500 505	1538
60	GCA AAT AAG ATG ATA GAG TAC CTA CGA GAG CTT TTG TCG AAG AGC AAG Ala Asn Lys Met Ile Glu Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Ser Lys Ser Lys 510 515 520	1586
65	CCT GGT GAT AAG TAT GGA AGT TAC GTC CTC CAG TTT GCC GAT GAT TAT Pro Gly Asp Lys Tyr Gly Ser Tyr Val Leu Gln Phe Ala Asp Asp Tyr 525 530 535	1634
	ACA TAC ACT GAT CCT GTA GAT GGA AGT GTA GTA TCA AAA CAA GGG GTT Thr Tyr Thr Asp Pro Val Asp Gly Ser Val Val Ser Lys Gln Gly Val 540 545 550	1682

ES 2 268 808 T3

```

CGG TTT GTT TTC ACC GAT GGT TCA AGA ATT ATT TAC CGT TTA TCA GGA      1730
Arg Phe Val Phe Thr Asp Gly Ser Arg Ile Ile Tyr Arg Leu Ser Gly
555                               560                               565                               570

ACG GGT TCT GCT GGT GCA ACT GTT AGA GTG TAT ATC GAA CAG TTT GAA      1778
Thr Gly Ser Ala Gly Ala Thr Val Arg Val Tyr Ile Glu Gln Phe Glu
                               575                               580                               585

CCA GAT GTT TCT AAA CAC GAC GTC GAT GCT CAA ATT GCC TTG AAA CCA      1826
Pro Asp Val Ser Lys His Asp Val Asp Ala Gln Ile Ala Leu Lys Pro
                               590                               595                               600

TTA ATA GAT TTA GCA TTA TCT GTT TCA AAG CTC AAA GAC TTC ACA GGC A      1875
Leu Ile Asp Leu Ala Leu Ser Val Ser Lys Leu Lys Asp Phe Thr Gly
                               605                               610                               615

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 618 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:14:

```

Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe Ile Ile Ser Ala Phe Lys
 1              5              10              15

Pro Lys His Ser Asn Val Pro Leu Ser Ile His His Ser Ser Ser Asn
                20              25              30

Phe Pro Ser Phe Lys Val Gln Asn Phe Pro Phe Arg Val Arg Tyr Asn
 35              40              45

Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser Thr Pro Thr Thr Ile
 50              55              60

Ala Glu Pro Asn Asp Ile Lys Ile Asn Ser Ile Pro Thr Lys Pro Ile
 65              70              75              80

Glu Gly Gln Lys Thr Gly Thr Ser Gly Leu Arg Lys Lys Val Lys Val
 85              90              95

Phe Lys Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Asn Trp Ile Gln Ala Leu Phe Asn
100              105              110

Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Gly Leu Leu Val Leu Gly Gly
115              120              125

Asp Gly Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala Gln Ile Ile Ile Lys Ile
130              135              140

```

ES 2 268 808 T3

Ala Ala Gly Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu Val Gly Lys Glu Gly Ile
 145 150 155 160
 5 Leu Ser Thr Pro Ala Val Ser Ala Val Ile Arg Lys Arg Glu Ala Asn
 165 170 175
 10 Gly Gly Phe Ile Met Ser Ala Ser His Asn Pro Gly Gly Pro Glu Tyr
 180 185 190
 Asp Trp Gly Ile Lys Phe Asn Tyr Ser Ser Gly Gln Pro Ala Pro Glu
 195 200 205
 15 Ser Ile Thr Asp Lys Ile Tyr Gly Asn Thr Leu Ser Ile Ser Glu Ile
 210 215 220
 20 Lys Ile Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu Ser Asn Val Gly Val Thr
 225 230 235 240
 Lys Phe Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile Asp Pro Val Ser Asp Tyr
 245 250 255
 25 Leu Glu Leu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe Gln Leu Ile Lys Ser Leu
 260 265 270
 30 Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe Asp Ala Met His Ala Val
 275 280 285
 Ala Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val Asp Lys Leu Gly Ala Ser
 290 295 300
 35 Pro Asp Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu Glu Asp Phe Gly His Gly
 305 310 315 320
 40 His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys Asp Leu Val Asn Ile Met
 325 330 335
 Tyr Ala Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala Ala Ser Asp Gly Asp Gly
 340 345 350
 45 Asp Arg Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe Phe Val Thr Pro Ser Asp
 355 360 365
 50 Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys Glu Ala Ile Pro Tyr Phe
 370 375 380
 Lys Asp Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser Met Pro Thr Ser Gly Ala
 385 390 395 400
 55 Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu Pro Phe Phe Glu Val Pro
 405 410 415
 60 Thr Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met Asp Ala Gly Asn Leu Ser
 420 425 430
 65 Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly Ser Asp His Ile Arg Glu

ES 2 268 808 T3

	435					440					445					
5	Lys	Asp	Gly	Ile	Trp	Ala	Val	Leu	Ala	Trp	Leu	Ser	Ile	Ile	Ala	His
	450					455					460					
10	Arg	Asn	Lys	Asp	Thr	Lys	Pro	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Ser	Val	Ser	Asp
	465					470					475					
15	Val	Val	Lys	Glu	His	Trp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Arg	Asn	Phe	Phe	Ser	Arg
	485					490					495					
20	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Glu	Cys	Glu	Ser	Glu	Gly	Ala	Asn	Lys	Met	Ile	Glu
	500					505					510					
25	Tyr	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Ser	Lys	Ser	Lys	Pro	Gly	Asp	Lys	Tyr	Gly
	515					520					525					
30	Ser	Tyr	Val	Leu	Gln	Phe	Ala	Asp	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Pro	Val
	530					535					540					
35	Asp	Gly	Ser	Val	Val	Ser	Lys	Gln	Gly	Val	Arg	Phe	Val	Phe	Thr	Asp
	545					550					555					
40	Gly	Ser	Arg	Ile	Ile	Tyr	Arg	Leu	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala
	565					570					575					
45	Thr	Val	Arg	Val	Tyr	Ile	Glu	Gln	Phe	Glu	Pro	Asp	Val	Ser	Lys	His
	580					585					590					
50	Asp	Val	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Lys	Pro	Leu	Ile	Asp	Leu	Ala	Leu
	595					600					605					
55	Ser	Val	Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	Phe	Thr	Gly						
	610					615										

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:15:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 2006 pares de bases
(B) TIPO: Ácido nucleico
50 (C) TIPO DE CADENA: único
(D) TOPOLOGÍA: Lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:15:

	CTTCTGTGA CAGACTCGAC AACTTCATCA TCTCTGCGTT TAAACCCAAA CACTCAAATG	60
60	TCCCACTTTC AATTCATCAT TCATCATCCA ATTTTCCTTC TTTCAAAGTT CAAACTTTC	120
	CTTTCAGGGT TCGCTATAAT TCAGCTATTA GAGCCACTTC GTCTTCCTCT TCTACTCCCA	180
65	CAACCATTGC AGAACCTAAT GACATTAAGA TTAACTCTAT TCCTACTAAA CCTATTGAAG	240

ES 2 268 808 T3

	GRCAAAAAAC TGGTACCAGT GGCCTAAGAA AAAAGGTGAA AGTGTTTAAG CAAGAAAATT	300
	ACCTTGCAAA TTGGATTGAG GCACTGTTTA ATTCGTTGCC GCCGGAGGAT TACAAGAATG	350
5	GATTGTTGGT TTTGGGAGGC GATGGTCGAT ACTTCAATAA AGAAGCTGCA CAGATAATAA	420
	TCAAGATTGC TGCTGGAAAT GGTGTTGGAA AAATTCTGCT TGGGAAGGAA GGGATATTGT	480
10	CAACGCCAGC CTTTCTGCT GTGATAAGGA AGAGAGAGGC AAATGGTGGG TTTATCATGA	540
	GTGCGAGCCA TAACCCCTGGT GGACCTGAAT ATGATTGGGG TATTAACTTT AATTACAGTA	600
15	GCGGACAACC TGCACCAGAA TCCATCACC GACAAGATTTA CGGAAACACC CTATCGATTT	660
	CTGAGATAAA GATTGCTGAT ATTCCCGATG TTGACTTATC AAATGTTGGA GTTACGAAAT	720
	TCGGAAGCTT CAGTGTGGAA GTAATAGACC CAGTTTCTGA TTACCTGGAG TTATTGGAGA	780
20	CAGTGTTCGA TTTTCAGCTA ATCAAAAGTC TTATTTCAAG GCCAGATTTT AGGTTTACAT	840
	TTGATGCCAT GCATGCAGTT GCCGGTGCTT ATGCAACACC CATTTTCGTT GATAAACTTG	900
25	GTGCTACTCC GGATTCAATT TCAAATGGAA TACCTTTGGA AGATTTTGGG CATGGTCATC	960
	CTGATCCTAA TCTAACATAC GCAAAGGATC TTGTCAATAT TATGTATGCT GAAAACGGAC	1020
	CTGATTTTGG TGCCGCTAGT GATGGTGATG GTGATAGAAA TATGATTTTG GGAACCAAGT	1080
30	TCTTCGTAAC TCCTTCAGAC TCTGTAGCCG TTATTGCAGC CAATGCAGAA GAAGCGATTC	1140
	CGTACTTTAA GGACAGTATC AAGGGTCTTG CACGATCAAT GCCGACAAGC GGTGCTCTAG	1200
35	ATAGAGTTGC TGAAAAGTTG AACCTCCCTT TTTTGTAGGT TCCCAGTGGT TGGAAATTCT	1260
	TTGGTAATCT TATGGATGCT GGAAATCTGT CGATTTGCGG GGAAGAGAGT TTTGGAACAG	1320
40	GTCTGACCA CATTGCTGAG AAAGACGGAA TCTGGTAAC TTTTATTTT TGTATTGAGA	1380
	ATAGCGGGTC GAGCATTAT CAAACATTAT CTAAGTTTCT CCGACTTATT AATATTATTG	1440
	GGCTGTATTA GCTTGGCTTT CGATTATTGC TCACCGCAAC AAAGACACGA AACGAGGGA	1500
45	GAAATTGCTC TCTGTGCTG ATGTTGTGAA GGAGCATTGG GCAACCTATG GTAGAAATTT	1560
	CTTTTCTAGA TACGATTACG AGGTGGTTTT TGATGCTGCA ATTGAAGTTT TATTTGTTGT	1620
50	ATCACACACT TTGAAGTTTT ATTTTCTTT TGAGTTTGA CAAATATAAA TATAGGAATG	1680
	TGAATCCGAA GGCGCAATA AGATGATAGA GTACCTACGA GAGCTTTTGT CGAAGAGCAA	1740
55	GCCTGCTGAT AAGTATGGAA GTTACGTCCT CCAGTTTGGC GATGATTATA CATACACTGA	1800
	TCCTGTAGAT GGAAGTGTAG TATCAAAACA AGGGGTTGCG TTTGTTTTCA CCGATGGTTC	1860
	AAGAATTATT TACCGTTTAT CAGGAACGGG TTCTGCTGGT GCAACTGTTA GAGTGTATAT	1920
60	CGAACAGTTT GAACCAGATG TTTCTAAACA CGACGTCGAT GCTCAAATTG CCTTRNACCA	1980
	TKDAATAGAT TTAGCATTAT CTGTTT	2006

ES 2 268 808 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 451 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: No relevante
- (D) TOPOLOGÍA: No relevante

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:16:

```

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

```

ES 2 268 808 T3

	195	200	205
5	Thr Asp Lys Ile Tyr Gly Asn Thr Leu Ser Ile Ser Glu Ile Lys Ile 210 215 220		
	Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu Ser Asn Val Gly Val Thr Lys Phe 225 230 235 240		
10	Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile Asp Pro Val Ser Asp Tyr Leu Glu 245 250 255		
15	Leu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe Gln Leu Ile Lys Ser Leu Ile Ser 260 265 270		
	Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe Asp Ala Met His Ala Val Ala Gly 275 280 285		
20	Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val Asp Lys Leu Gly Ala Ser Pro Asp 290 295 300		
25	Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu Glu Asp Phe Gly His Gly His Pro 305 310 315 320		
	Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys Asp Leu Val Asn Ile Met Tyr Ala 325 330 335		
30	Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala Ala Ser Asp Gly Asp Gly Asp Arg 340 345 350		
35	Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe Phe Val Thr Pro Ser Asp Ser Val 355 360 365		
	Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys Glu Ala Ile Pro Tyr Phe Lys Asp 370 375 380		
40	Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser Met Pro Thr Ser Gly Ala Leu Asp 385 390 395 400		
45	Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu Pro Phe Phe Glu Val Pro Thr Gly 405 410 415		
	Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met Asp Ala Gly Asn Leu Ser Ile Cys 420 425 430		
50	Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly Ser Asp His Ile Arg Glu Lys Asp 435 440 445		
55	Gly Ile Trp 450		

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:17:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1055 pares de bases
 - (B) TIPO: Ácido nucleico
 - 65 (C) TIPO DE CADENA: único
 - (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

ES 2 268 808 T3

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 2..753

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:17:

5	G ATT GCT GAT ATT CCC GAT GTT GAC TTA TCA AAT GTT GGA GTT ACU	46
10	Ile Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu Ser Asn Val Gly Val Thr	
	1 5 10 15	
15	AAA TTC GGA AGC TTC AGT GTG GAA GTA ATA GAC CCA GTT TCT GAT TAC	94
	Lys Phe Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile Asp Pro Val Ser Asp Tyr	
	20 25 30	
20	CTG GAG TTA TTG GAG ACA GTG TTC GAT TTT CAG CTA ATC AAA AGT CTT	142
	Leu Glu Leu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe Gln Leu Ile Lys Ser Leu	
	35 40 45	
25	ATT TCA CGG CCA GAT TTT AGG TTT ACA TTT GAT GCC ATG CAT GCA GTT	190
	Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe Asp Ala Met His Ala Val	
	50 55 60	
30	GCC GGT GCT TAT GCA ACA CCC ATT TTC GTT GAT AAA CTT GGT GCT AGT	238
	Ala Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val Asp Lys Leu Gly Ala Ser	
	65 70 75	
35	CCG GAT TCA ATT TCA AAT GGA ATA CCT TTG GAA GAT TTT GGA CAT GGT	286
	Pro Asp Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu Glu Asp Phe Gly His Gly	
	80 85 90 95	
40	CAT CCT GAT CCT AAT CTA ACA TAC GCA AAG GAT CTT GTC AAT ATT ATG	334
	His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys Asp Leu Val Asn Ile Met	
	100 105 110	
45	TAT GCT GAA AAC GGA CCT GAT TTT GGT GCC GCT AGT GAT GGT GAT GGT	382
	Tyr Ala Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala Ala Ser Asp Gly Asp Gly	
	115 120 125	
50	GAT AGA AAT ATG ATT TTG GGA ACA AGT TTC TTC GTA ACT CCT TCA GAC	430
	Asp Arg Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe Phe Val Thr Pro Ser Asp	
	130 135 140	
55	TCT GTA GCC GTT ATT GCA GCC AAT GCA AAA GAA GCG ATT CCG TAC TTT	478
	Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys Glu Ala Ile Pro Tyr Phe	
	145 150 155	
60	AAG GAC AGT ATC AAG GGT CTT GCA CGA TCA ATG CCG ACA AGC GGT GCT	526
	Lys Asp Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser Met Pro Thr Ser Gly Ala	

ES 2 268 808 T3

	160		165		170		175	
5	CTA GAT AGA GTT GCT GAA AAG TTG AAC CTC COT TTT TTT GAG GTT CCC							574
	Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu Pro Phe Phe Glu Val Pro							
		180			185		190	
10	ACT GGT TGG AAA TTC TTT GGT AAT CTT ATG GAT GCT GGA AAT CTG TCG							622
	Thr Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met Asp Ala Gly Asn Leu Ser							
		195		200		205		
15	ATT TGC GGG GAA GAG AGT TTT GGA ACA GGT TCT GAC CAC ATT CGT GAG							670
	Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly Ser Asp His Ile Arg Glu							
		210		215		220		
20	AAA GAC GGA ATC TGC TTG GCT TTC GAT TAT TGC TCA CCG CAA CAA AGA							718
	Lys Asp Gly Ile Cys Leu Ala Phe Asp Tyr Cys Ser Pro Gln Gln Arg							
		225		230		235		
25	CAC GAA ACC AGG GGA GAA ATT GGT CTC TGT GTC TG ATGTTGTGAA							762
	His Glu Thr Arg Gly Glu Ile Gly Leu Cys Val							
		240		245		250		
30	GGAGCATTGG GCAACCTATG GTAGAAATTT CTTTCTAGA TACGATTACG AGGAATGTGA							823
	ATCCGAAGGC CCAAATAAGA TGATAGAGTA CCTACGAGAG CTTTGTGCGA AGAGCAAGCC							883
	TGGTGATAAG TATGGAAGTT ACGTCCTCCA GTTTCGGGAT GATTATACAT ACACTGATCC							943
	TGTAGATGGA AGTGTAGTAT CAAAACAAGG GGTTCGGTTT GTTTTCACCG ATGTTTCAAG							1003
35	AATTATTTAC CTTTATCAG GAACGGGTTT TGCTGGTGCA ACTGTTAGAG TG							1055

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 250 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:18:

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

ES 2 268 808 T3

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:19:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1733 pares de bases
 - (B) TIPO: Ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: único
 - 50 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (ix) CARACTERÍSTICA:
 - 55 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) UBICACIÓN: 21..1407
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:19:

60

65

ES 2 268 808 T3

	CACTGTTACA GACTCGATCA ATG GCT TTC TGT TAC AGA CTC GAC AAC TTC																50	
5	Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe																	
	1				5				10									
	ATC ATC TCT GCG TTT AAA CCC AAA CAC TCA AAT GTC CCA CTT TCA ATT	15				20				25								98
10	Ile Ile Ser Ala Phe Lys Pro Lys His Ser Asn Val Pro Leu Ser Ile																	
	CAT CAT TCA TCA TCC AAT TTT CCT TCT TTC AAA GTT CAA AAC TTT CCT	30				35				40								146
15	His His Ser Ser Ser Asn Phe Pro Ser Phe Lys Val Gln Asn Phe Pro																	
	TTC AGG GTT CGC TAT AAT TCA GCT ATT AGA GCC ACT TCG TCT TCC TCT	45				50				55								194
20	Phe Arg Val Arg Tyr Asn Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser																	
	TCT ACT CCC ACA ACC ATT GCA GAA CCT AAT GAC ATT AAG ATT AAC TCT	60				65				70								242
25	Ser Thr Pro Thr Thr Ile Ala Glu Pro Asn Asp Ile Lys Ile Asn Ser																	
	ATT CCT ACT AAA CCT ATT GAA GGA CAA AAA ACT GGT ACC AGT GGC CTA	75				80				85				90				290
30	Ile Pro Thr Lys Pro Ile Glu Gly Gln Lys Thr Gly Thr Ser Gly Leu																	
	AGA AAA AAG GTG AAA GTG TTT AAG CAA GAA AAT TAC CTT GCA AAT TGG	95				100				105								338
35	Arg Lys Lys Val Lys Val Phe Lys Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Asn Trp																	
	ATT CAG GCA CTG TTT AAT TCG TTG CCG CCG GAG GAT TAC AAG AAT GGA	110				115				120								386
40	Ile Gln Ala Leu Phe Asn Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Gly																	
	TTG TTG GTT TTG GGA GGC GAT GGT CGA TAC TTC AAT AAA GAA GCT GCA	125				130				135								434
45	Leu Leu Val Leu Gly Gly Asp Gly Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala																	
	CAG ATA ATA ATC AAG ATT GCT OCT GGA AAT GGT GTT GGA AAA ATT CTG	140				145				150								482
50	Gln Ile Ile Ile Lys Ile Ala Ala Gly Asn Gly Val Gly Lys Ile Leu																	
	GTT GGG AAG GAA GGG ATA TTG TCA ACG CCA GCC GTT TCT GCT GTG ATA	155				160				165				170				530
55	Val Gly Lys Glu Gly Ile Leu Ser Thr Pro Ala Val Ser Ala Val Ile																	
	AGG AAG AGA GAG GCA AAT GGT GGG TTT ATC ATG AGT GCG AGC CAT AAC	175				180				185								578
60	Arg Lys Arg Glu Ala Asn Gly Gly Phe Ile Met Ser Ala Ser His Asn																	
	CCT GGT GGA CCT GAA TAT GAT TGG GGT ATT AAG TTT AAT TAC AGT AGC	190				195				200								626
65	Pro Gly Gly Pro Glu Tyr Asp Trp Gly Ile Lys Phe Asn Tyr Ser Ser																	
	GGA CAA CCT GCA CCA GAA TCC ATC ACC GAC AAG ATT TAC GGA AAC ACC	205				210				215								674
70	Gly Gln Pro Ala Pro Glu Ser Ile Thr Asp Lys Ile Tyr Gly Asn Thr																	

ES 2 268 808 T3

5	CTA TCG ATT TCT GAG ATA AAG APT GCT GAT ATT CCC GAT GTT GAC TTA Leu Ser Ile Ser Glu Ile Lys Ile Ala Asp Ile Pro Asp Val Asp Leu 220 225 230	722
10	TCA AAT GTT GGA GTT ACG AAA TTC GGA AGC TTC AGT GTG GAA GTA ATA Ser Asn Val Gly Val Thr Lys Phe Gly Ser Phe Ser Val Glu Val Ile 235 240 245 250	770
15	GAC CCA GTT TCT GAT TAC CTG GAG TTA TTG GAG ACA GTG TTC GAT TTT Asp Pro Val Ser Asp Tyr Leu Glu Leu Leu Glu Thr Val Phe Asp Phe 255 260 265	818
20	CAG CTA ATC AAA AGT CTT ATT TCA CGG CCA GAT TTT AGG TTT ACA TTT Gln Leu Ile Lys Ser Leu Ile Ser Arg Pro Asp Phe Arg Phe Thr Phe 270 275 280	866
25	GAT GCC ATG CAT GCA GTT GCC GGT GCT TAT GCA ACA CCC ATT TTC GTT Asp Ala Met His Ala Val Ala Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Ile Phe Val 285 290 295	914
30	GAT AAA CTT GGT GCT AGT CCG GAT TCA ATT TCA AAT GGA ATA CCT TTG Asp Lys Leu Gly Ala Ser Pro Asp Ser Ile Ser Asn Gly Ile Pro Leu 300 305 310	962
35	GAA GAT TTT GGA CAT GGT CAT CCT GAT CCT AAT CTA ACA TAC GCA AAG Glu Asp Phe Gly His Gly His Pro Asp Pro Asn Leu Thr Tyr Ala Lys 315 320 325 330	1010
40	GAT CTT GTC AAT ATT ATG TAT GCT GAA AAC GGA CCT GAT TTT GGT GCC Asp Leu Val Asn Ile Met Tyr Ala Glu Asn Gly Pro Asp Phe Gly Ala 335 340 345	1058
45	GCT AGT GAT GGT GAT GGT GAT AGA AAT ATG ATT TTG GGA ACA AGT TTC Ala Ser Asp Gly Asp Gly Asp Arg Asn Met Ile Leu Gly Thr Ser Phe 350 355 360	1106
50	TTC GTA ACT CCT TCA GAC TCT GTA GCC GTT ATT GCA GCC AAT GCA AAA Phe Val Thr Pro Ser Asp Ser Val Ala Val Ile Ala Ala Asn Ala Lys 365 370 375	1154
55	GAA GCG ATT CCG TAC TTT AAG GAC AGT ATC AAG GGT CTT GCA CGA TCA Glu Ala Ile Pro Tyr Phe Lys Asp Ser Ile Lys Gly Leu Ala Arg Ser 380 385 390	1202
60	ATG CCG ACA AGC GGT GCT CTA GAT AGA GTT GCT GAA AAG TTG AAC CTC Met Pro Thr Ser Gly Ala Leu Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Asn Leu 395 400 405 410	1250
65	CCT TTT TTT GAG GTT CCC ACT GGT TGG AAA TTC TTT GGT AAT CTT ATG Pro Phe Phe Glu Val Pro Thr Gly Trp Lys Phe Phe Gly Asn Leu Met 415 420 425	1298
	GAT GCT GGA AAT CTG TCG ATT TGC GGG GAA GAG AGT TTT GGA ACA GGT Asp Ala Gly Asn Leu Ser Ile Cys Gly Glu Glu Ser Phe Gly Thr Gly 430 435 440	1346

ES 2 268 808 T3

TCT GAC CAC ATT CGT GAG AAA GAC GGA ATC TGG AAT GTG AAT CCG AAG 1394
Ser Asp His Ile Arg Glu Lys Asp Gly Ile Trp Asn Val Asn Pro Lys
445 450 455

GCG CAA ATA AGA T GATAGAGTAC CTACGAGAGC TTTTGTGGAA GAGCAAGCCT 1447
Ala Gln Ile Arg
460

GGTGATAAGT ATGGAAGTTA CGTCCTCCAG TTTGCCGATG ATTATACATA CACTGATCCT 1507

GTAGATGGAA GTGTAGTATC AAAACAAGGG GTTCGGTTTG TTTTCACCGA TGGTTCAAGA 1567

ATTATTTACC GTTTATCAGG AACGGGTTCT GCTGCTGCAA CTGTTAGAGT GTATATCGAA 1627

CAGTTTGAAC CAGATGTTTC TAAACACGAC GTCCATGCTC AAATTGCCTT GAAACCATTAA 1687

ATAGATTTAG CATTATCTGT TTCAAAGCTC AAAGACTTCA CAGGGA 1732

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 462 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:20:

Met Ala Phe Cys Tyr Arg Leu Asp Asn Phe Ile Ile Ser Ala Phe Lys
1 5 10 15

Pro Lys His Ser Asn Val Pro Leu Ser Ile His His Ser Ser Ser Asn
20 25 30

Phe Pro Ser Phe Lys Val Gln Asn Phe Pro Phe Arg Val Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Ala Ile Arg Ala Thr Ser Ser Ser Ser Thr Pro Thr Thr Ile
50 55 60

Ala Glu Pro Asn Asp Ile Lys Ile Asn Ser Ile Pro Thr Lys Pro Ile
65 70 75 80

Glu Gly Gln Lys Thr Gly Thr Ser Gly Leu Arg Lys Lys Val Lys Val
85 90 95

Phe Lys Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Asn Trp Ile Gln Ala Leu Phe Asn
100 105 110

Ser Leu Pro Pro Glu Asp Tyr Lys Asn Gly Leu Leu Val Leu Gly Gly
115 120 125

Asp Gly Arg Tyr Phe Asn Lys Glu Ala Ala Gln Ile Ile Ile Lys Ile

ES 2 268 808 T3

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

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 19 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: único

10

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:21:

15

GGAGATCTGG TAAGCTTGT

19

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65