



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 382**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00960838 .1**

96 Fecha de presentación : **18.09.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1218517**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

54

Título: **Secuencias GST del fríjol de soja y su uso en la producción de plantas resistentes a los herbicidas.**

30

Prioridad: **21.09.1999 GB 9922346**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **Syngenta Limited**
European Regional Centre
Priestley Road, Surrey Research Park
Guildford, Surrey GU2 7YH, GB

72

Inventor/es: **Andrews, Christopher, John;**
Jepson, Ian;
Townson, Jane, Karen;
Edwards, Robert;
Cummins, Ian y
Skipsey, Mark

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 316 382 T3

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

ES 2 316 382 T3

DESCRIPCIÓN

Secuencias GST del fríjol de soja y su uso en la producción de plantas resistentes a los herbicidas.

5 La presente invención se relaciona entre otras, con secuencias de Glutación-S-transferasa (GST) y su uso en métodos para la producción de plantas resistentes a los herbicidas. En particular los polinucleótidos según la invención pueden ser usados en métodos para la producción de plantas que son resistentes a los herbicidas que comprenden fomesafen y/o acifluorfen.

10 Las plantas que son sustancialmente “tolerantes” a un herbicida cuando son sometidas a éstos proporcionan una curva de dosis/respuesta que se desplaza a la derecha cuando se compara con aquella proporcionada por plantas parecidas no tolerantes similarmente sometidas. Tales curvas dosis/respuesta tienen puesto en el eje x del gráfico “dosis” y en el eje y “porcentaje de muerte”, “efecto herbicida” etc. Las plantas tolerantes típicamente requerirán por lo menos dos veces más herbicida que las plantas parecidas no tolerantes para producir un determinado efecto herbicida. Las plantas que son sustancialmente “resistentes” al herbicida presentan pocas, o ningunas, lesiones necróticas, líticas, cloróticas u otras cuando son sometidas al herbicida a concentraciones e índices que son empleados típicamente por la comunidad agroquímica para matar malas hierbas en el campo. De aquí en lo adelante cuando sean usadas individualmente las palabras (i) “tolerante” y (ii) “resistente” significan “tolerante y/o resistente”.

20 Las plantas resistentes a los herbicidas ya están disponibles en el arte por ejemplo, la ROUNDUP READY™ Soja que es resistente a los herbicidas que tienen como sitio de acción la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, tal como aquellos agroquímicos que contienen glifosato. Una de las ventajas de estas plantas es que el granjero puede aplicar los herbicidas a los campos que contienen los cultivos de plantas y malas hierbas usando “aplicación over the top”, para matar las malas hierbas.

30 Otros ejemplos de productos para uso en métodos para la producción de plantas resistentes a los herbicidas son proporcionados en la Solicitud Internacional de Patente Número de Publicación WO 93/01294 y WO 99/14337. Aquí la resistencia se logra insertando en la planta un polinucleótido que proporciona la producción de una enzima glutación-S-transferasa (GST) que está involucrada en la detoxificación del herbicida. En este contexto McGonigle y otros. (1998 Pesticide Biochemistry and Physiology. 62 pp15-25) describe plantas transgénicas que comprenden genes que codifican para GST de soja que son tolerantes a los herbicidas de cloroacetanilida y tiocarbamato. Se ha demostrado que las enzimas Glutación-S-transferasas existen en varios organismos tales como bacterias, hongos, levaduras, plantas, mamíferos y peces y pueden existir como homo o heterodímeros con subunidades típicamente entre 24 y 30 kDa. Un ejemplo de una enzima Glutación-S-transferasa conocida es el clon de ADNc *Glicina max* con el número de acceso EMBL A1440996. Sin embargo, para esta enzima no se conoce ningún dato en lo que se refiere a su actividad así como el herbicida sobre el cual actúa. Se ha demostrado que la detoxificación del herbicida se logra por la conjugación del herbicida con el glutatión (GSH) de tiol libre, un tripéptido (gamma-glutamil-cisteinil-glicina) dentro de la planta (Cole D.J. 1994 Pesticide Science. 42 pp209-222). Tal conjugación es catalizada por la GST. También se ha demostrado que la detoxificación de los herbicidas ocurre siguiendo la conjugación del herbicida con homoglutatión, el cual es el tiol predominante en algunas especies de leguminosas. El homoglutatión (hGSH) es también un tripéptido (gamma-glutamil-cisteinil-Beta-alanina) pero difiere de la GSH en la adición de Beta-alanina en vez de una glicina a la parte gamma-glutamil-cisteinil. La síntesis del homoglutatión (hGSH) es catalizada por la actividad de la enzima homoglutatión sintasa (hGSHS). La secuencia parcial de un hGSHS de *Medicago truncatula* ha sido publicada (Frendo y otros. 45 1999 Plant Journal. 17 pp215-219).

De este modo, la presente invención busca proporcionar entre otros, nuevos polinucleótidos que codifiquen para proteínas que puedan ser usadas en métodos para proporcionar plantas con altos niveles de resistencia a los herbicidas que comprenden fomesafen y/o acifluorfen.

50 Según la presente invención aquí se proporciona una Glutación-S-transferasa (GST) que comprende la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 10 o una variante de GST que tenga al menos 80% de identidad con la condición de que dicha variante de GST no comprenda la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 36. (la cual corresponde a la secuencia del clon SE3.03B09 listada como SEQ ID No. 8 en la Solicitud Internacional de Patente Número de Publicación WO 00/18936). En una nueva realización de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 85% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 90% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 91% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 92% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 93% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 94% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 95% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 96% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 97% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 98% de identidad con la secuencia

ES 2 316 382 T3

descrita como SEQ ID No. 10. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de GST tiene al menos 99% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 10.

5 El porcentaje de identidad de secuencia para proteínas se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en la cual la porción de secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (por ejemplo brechas) en comparación con la secuencia inicial de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentra el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Cuando se calcula el porcentaje de identidad de secuencia las secuencias pueden alinearse permitiendo hasta 3 brechas con la condición de que en lo que respecta a las brechas, un total de no más de 15 residuos de aminoácidos sean afectados. La alineación óptima de secuencias para la comparación también puede conducirse por implementaciones computarizadas de algoritmos conocidos. En una realización particular de la presente invención la identidad de la secuencia se calcula usando el algoritmo FASTA versión 3 que usa el método de Pearson y Lipman (Lipman, D.J. y Pearson, W.R. (1985) Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches and Science. 227:1435-1441 y Pearson, W.R. y Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. PNAS, 85:2444-2448) para buscar las similitudes entre la secuencia de referencia (también llamada la secuencia consultada) y cualquier grupo de secuencias (llamadas secuencias extensas). Los métodos que existen también en el arte que permiten calcular el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de polinucleótidos.

La proteína de puede diferir de la secuencia básica de la proteína GST (SEQ ID No. 10) por sustituciones conservativas o no-conservativas de aminoácidos. Una sustitución conservativa será entendida que significa que el aminoácido se reemplaza con un aminoácido con propiedades químicas ampliamente similares. En particular pueden hacerse sustituciones conservativas entre los aminoácidos dentro de los siguientes grupos:

- (i) Alanina y Glicina;
- (ii) Serina y Treonina;
- (iii) Ácido Glutámico y Ácido Aspártico;
- (iv) Arginina y Lisina;
- (v) Asparagina y Glutamina;
- (vi) Isoleucina y Leucina;
- (vii) Valina y Metionina;
- (viii) Fenilalanina y Triptófano.

En general, más sustituciones conservativas que no-conservativas serán posibles sin destruir las propiedades GST de las proteínas. Las variantes adecuadas de las proteínas de acuerdo con la presente invención pueden ser determinadas probando las propiedades de GST de la proteína usando métodos de rutina los cuales son bien conocidos por la persona experimentada en el arte. Tales variantes de proteínas también pueden sintetizarse químicamente usando técnicas estándares.

La presente invención además proporciona una GST o una variante como se describe anteriormente en la cuál dicha GST o la variante es capaz de conferir resistencia y/o tolerancia a un herbicida que comprende fomesafen y/o acifluorfen. El herbicida también puede comprender otros Difenil éteres o Sulfonilureas como el Clorimuron Etilo y/o Cloroacetanilidas como el acetoclor.

La invención presente todavía llega más allá proporcionando un polinucleótido que comprende una región que codifica para una GST o una variante de GST como se describió anteriormente. En una realización particular de la presente invención dicho polinucleótido comprende la secuencia descrita como SEQ ID No. 14.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 1, o una variante de la proteína que tiene al menos 80% de identidad con la cuál dicha proteína o variante es capaz de catalizar la adición de Beta-alanina sobre gamma glutamilcisteína. En una nueva realización de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 75% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 85% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 90% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 95% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 96% de identidad con la secuencia descrita como SEQ

ES 2 316 382 T3

ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 97% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 98% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene al menos 99% de identidad con la secuencia descrita como SEQ ID No. 1. La identidad de secuencia puede calcularse y las variantes de proteína creadas/identificadas de una manera análoga a la descrita anteriormente.

La presente invención aún proporciona adicionalmente una variante de la proteína como se describió en el párrafo precedente que tiene una Km para Beta-alanina la cual es menor que dichas variantes de Km para glicina cuando se calcula usando el mismo método. En una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene una Km para Beta-alanina que es menor o igual a alrededor de 1 mM y una Km para glicina que es mayor que 1 mM cuando se calcula usando el mismo método. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína tiene una Km para Beta-alanina la cual es menor o igual a alrededor de 0.8 mM y una Km para glicina que es mayor que 0.8 mM cuando se calcula usando el mismo método. La Km o la “Constante de Michaelis-Menten” es un parámetro cinético que indica la concentración del sustrato a la que la velocidad inicial de la reacción (V_0) es la mitad de la máxima. Los métodos para el cálculo de la Km son bien conocidos por las personas experimentadas en el arte.

La presente invención proporciona además una variante de proteína como se describió anteriormente que comprende una secuencia que contiene al menos la secuencia de una de las regiones de aminoácidos descritas en el grupo descrito como SEQ ID No. 2 (KKIQQELAKP); SEQ ID No. 3 (CFAGLWSL); SEQ ID No. 4 (VMKPQREGGGN-NIYG) y SEQ ID No. 5 (AAYILMQRIFP). En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína comprende una secuencia la cual contiene al menos la secuencia de dos regiones de aminoácidos seleccionados del grupo descrito como SEQ ID No. 2, 3, 4 ó 5. En aún una realización adicional de la presente invención dicha variante de la proteína comprende una secuencia que contiene las secuencias de todas las regiones de aminoácidos descritas como SEQ ID No. 2, 3, 4 ó 5.

La presente invención aún proporciona adicionalmente un polinucleótido que comprende una región que codifica para la proteína o variante de la proteína como se describió anteriormente. En una realización adicional de la presente invención dicho polinucleótido comprende la secuencia descrita como SEQ ID No. 6.

La presente aún proporciona adicionalmente un polinucleótido que comprende una primera región que comprende un polinucleótido que codifica para una GST o variante de GST según la presente invención y una segunda región que comprende un polinucleótido que codifica para una proteína o variante de la proteína de acuerdo a la presente invención. En una realización adicional de la presente invención dicha primera región comprende un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 10 y dicha segunda región comprende un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 1. Las regiones pueden estar separadas por una región que proporciona un polipéptido para el autoprocésamiento que es capaz de separar tal como el polipéptido de autoprocésamiento descrito en US 5,846,767 o cualquier elemento que funcione similarmente. Como alternativa las regiones pueden separarse por una secuencia la cual actúa como un sitio diana para un elemento externo que es capaz de separar las secuencias de proteína. Como alternativa el polinucleótido puede proporcionar un poliproteína que comprende una pluralidad de funciones de proteína tales como una GST y una homoglutación sintetasa según la invención. En una nueva realización de la presente invención las proteínas de la poliproteína pueden colocarse en tándem. En aún una realización adicional de la presente invención la poliproteína comprende una pluralidad de funciones de proteína que están separadas por secuencias enlazadoras.

La presente invención proporciona aún adicionalmente una construcción de ADN que comprende la secuencia de un promotor operable de planta operablemente enlazado a un polinucleótido operablemente enlazados a una región de terminación de la transcripción según la presente invención. En una realización adicional de la presente invención la construcción de ADN además comprende una región o una pluralidad de regiones que proporcionan el blanco del producto o de los productos de la proteína para una localización o localizaciones particulares. La construcción de ADN puede además comprender una región que proporciona para la producción de una proteína que actúa como un marcador de selección. El marcador de selección puede, en particular, conferir resistencia a la kanamicina; higromicina o gentamicina. Los marcadores de selección más apropiados incluyen genes que confieren resistencia a otros herbicidas como los herbicidas basados en glifosfato o resistencia a toxinas como la eutipina. Otras formas de selección también se encuentran disponibles como los sistemas de selección basados en hormona como el sistema de Multi Auto Transformación (MAT) de Hiroyasu Ebinuma y otros. 1997. PNAS Vol. 94 pp2117-2121; sistemas de selección visual que usan la conocida proteína de fluorescencia verde, la β glucoronidasa y cualquier otro sistema de selección tal como el de manosa isomerasa, el de xilosa isomerasa y el de 2-deoxiglucosa (2-DOG). El promotor operable de planta de la construcción de ADN puede seleccionarse del grupo que consiste en *Agrobacterium rhizogenes* RoID; RoID/Fd; el inhibidor de proteasa de papa II; CaMV35S; CamV35S doble potenciado; FMV35S; NOS; OCS; Patatin; E9; el interruptor alcA/alcR.; el interruptor GST; el interruptor RMS; el oleosin; el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa bisfosfato carboxilasa-oxigenasa. Los terminadores que pueden usarse en las construcciones de acuerdo a la presente invención incluyen Nos, inhibidor de proteinasa II y el terminador del gen de la alfa-tubulina (EP-A 652,286). Es igualmente posible usar, en asociación con la secuencia de regulación del promotor, otras secuencias de regulación las cuales se sitúan entre el promotor y la secuencia que codifica para la proteína según la presente invención, tales como potenciadores transcripcionales o traduccionales, por ejemplo, el activador de traducción del virus del grabado del tabaco (TEV) descrito en la Solicitud Internacional de Patente, PCT número de publicación W0 87/07644 o la se-

ES 2 316 382 T3

cuencia líder de la Glucanasa II. El polinucleótido que codifica para la proteína según la invención también puede ser codón-optimizado, o alterado por otra parte para potenciar por ejemplo, la transcripción una vez que es incorporado en el material de la planta. Tal optimización de codón también puede usarse para alterar la estructura secundaria predicha del transcripto de ARN producido en cualquier célula transformada, o para destruir la inestabilidad de los elementos crípticos de ARN presentes en el transcripto inalterado, de este modo aumentando la estabilidad y/o disponibilidad del transcripto en la célula transformada (Abler and Green, 1996. *Plant Molecular Biology* (32) pp63-78).

La presente invención todavía proporciona adicionalmente un método para proporcionar plantas que son resistentes y/o tolerantes a un herbicida difenil éter que comprende: (a) insertar en el material del genoma de la planta un polinucleótido o secuencia de polinucleótido que proporciona una GST o variante de GST como se describió anteriormente o una construcción de ADN como se describió anteriormente; y (b) regenerar plantas o partes de plantas de allí; y (c) aplicar a dichas plantas o partes de plantas una cantidad de dicho herbicida difenil éter que es fitotóxico a las plantas tipo control y seleccionar estas plantas o partes de plantas que son resistentes a dicho herbicida difenil éter. En una nueva realización de la presente invención el polinucleótido insertado en el material de la planta de acuerdo con el método de la oración precedente codifica para una secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID No. 10.

La presente invención todavía proporciona adicionalmente métodos como los descritos en el párrafo precedente en los cuáles dicho herbicida difenil éter comprende fomesafen y/o acifluorfen. La construcción polinucleótido/ADN puede ser incorporada en el material del genoma de la planta de acuerdo con la presente invención por técnicas de transformación de plantas las cuáles son bien conocidas por las personas experimentadas en el arte. Tales técnicas incluyen pero no se limitan a la transformación por partículas mediada por biolística. La transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación de protoplastos (opcionalmente en presencia de polietilenglicoles); sonicación de tejidos de plantas, células o protoplastos en un medio que comprende el polinucleótido o vector; microinserción del polinucleótido o vector en el material totipotente de la planta (opcionalmente empleando la conocida técnica de “pelos” de carburo de silicio), electroporación y similares. Las técnicas que son específicamente optimizadas para un cultivo particular pueden ser empleadas para los propósitos de transformar un cultivo particular de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, cuando se transforma la soja puede ser preferible usar un método basado en uno descrito por Christou y otros (1990). Dan y otros (1999). Williams y otros (2000) y Hinchey y otros (1999). El método de transformación *per se* no es pertinente a la presente invención y la persona experta puede emplear cualquier método funcional apropiado para el cultivo diana.

La presente invención todavía proporciona adicionalmente plantas o partes de plantas resistentes a los herbicidas obtenidas de acuerdo a los métodos descritos anteriormente. Tales plantas o partes de planta pueden seleccionarse del grupo que consiste de: melones; mangos; soja; algodón; tabaco; remolacha azucarera; colza oleaginosa; canola; lino; girasol; papa; tomate; alfalfa; lechuga; maíz; trigo; sorgo; centeno; bananos; cebada; avena; césped de hierba; césped de forraje; caña de azúcar; guisante; haba; arroz; pino; álamo; manzana; melocotones; uva; fresas; zanahoria; lechuga; berza; cebolla; cítrico; cereal; plantas de nuez u otros cultivos de horticultura. En una realización particular de la presente invención dichas plantas o partes de planta son las plantas o partes de la planta de soja (*Glicina sp.*).

La presente invención todavía proporciona adicionalmente un método de proporcionar una planta con una característica agronómica deseada adicional que comprende: (a) insertar en el material del genoma de la planta o parte de una planta como es descrito anteriormente un polinucleótido que proporciona la característica agronómica deseada; y regenerar plantas o partes de planta de dicho material; o (a) cruzar una primera planta o parte de planta como se describió anteriormente con una segunda planta que proporciona dicha característica agronómica deseada; y (b) seleccionar aquellas plantas resultantes que contienen dicha característica agronómica deseada adicional. Sería apreciado que la planta resultante de tal método contenga las características de las GSTs y/o homoglutiación sintetasa según la presente invención como se describió anteriormente junto con las características asociadas con dichas características agronómicas. En una realización adicional de la presente invención dicha característica agronómica deseada adicional proporciona la resistencia a un herbicida que comprende glifosato o una sal del mismo. La característica agronómica deseada adicional también puede ser seleccionada del grupo que consiste de: mayor resistencia al herbicida; resistencia al insecto; resistencia al nematodo; tolerancia al stress; rendimiento alterado; valor de nutricional alterado; calidad alterada o cualquier otra característica agronómica deseable. En aún una realización adicional de la invención dicha característica agronómica adicional comprende la resistencia y/o tolerancia a insectos lograda por la producción de proteínas insecticidas tales como las lectinas o proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis*, *Xenorhabdus sp.* y de *Photorhabdus sp* en la planta. En aún una realización adicional de la invención dicha característica agronómica adicional comprende la resistencia y/o tolerancia a nemátodos lograda por medio de la producción de proteínas nematocidas tales como los inhibidores de enzima, en la planta.

La presente invención todavía proporciona adicionalmente un método para controlar selectivamente las malas hierbas en un campo dicho campo comprendiendo la cosecha de las plantas y las malas hierbas dicho método comprende la aplicación a dicho de campo de una formulación agrícolamente aceptable de un agroquímico que comprende fomesafen y/o acifluorfen en la cual dicho cultivo de plantas son las plantas según la invención.

La invención será ahora descrita por vía de los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a las figuras y secuencias enumeradas en las que:

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del vector de clonaje pMJB2.

ES 2 316 382 T3

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático del vector de clonaje pMOG1051

La Figura 3 muestra un diagrama esquemático del vector binario pMOG800

5 La Figura 4 muestra un diagrama esquemático del vector pFT2 usado, para la transformación por medio de *Agrobacterium*, para transformar las plantas para dar la resistencia a los herbicidas.

Lista de secuencias

- 10 SEQ ID No.1. Homoglutación sintetasa de *Glicina max*.
- SEQ ID Nos. 2 a 5. Regiones de la proteína Homoglutación sintetasa.
- SEQ ID No. 6. Secuencia polinucleotídica que codifica para la Homoglutación sintetasa de *Glicina max*.
- 15 SEQ ID Nos. 7 a 10. Glutación-S-transferasas 2.6, 3.1, 3.2 y 3.3 respectivamente.
- SEQ ID No. 11 a 14. Polinucleótidos que codifican para las GSTs 2.6, 3.1, 3.2 y 3.3 respectivamente. (GST 3.3 también puede estar referida como GST 3.6).
- 20 SEQ ID Nos. 15 a 24. Los cebadores.
- SEQ ID Nos. 25 a 34. La secuencia de soja derivada de la secuencia de ácidos nucleicos P32110; la secuencia de Fríjol Mungo U20809; la secuencia de Tabaco Q03663; la secuencia de papa derivada de la secuencia de ácidos nucleicos P32111; la secuencia de Arabidopsis P46421; la secuencia (genómica) de Arabidopsis P46421; la secuencia de Papaya AJ000923; la secuencia de Abeto AF051214; la secuencia de trigo AF004358; la secuencia de Abeto AF051238 respectivamente.
- 25 SEQ ID No. 35. El cebador.
- SEQ ID Nos 36 a 43. Las secuencia de clones enumeradas como SEQ ID Nos. 8, 22, 7,21, 31, 15, 23 y 25 en la Solicitud Internacional de Patente Número de Publicación WO 00/18936.

35 Ejemplo 1

Aislamiento e identificación de ADNcs parciales que codifican para GSTs de soja

1.1 Se obtuvieron ADNcs parciales que codifican para GSTs de soja usando la reacción en cadena de la polimerasa 40 reverso-transcriptasa (RT-PCR) con oligonucleótidos cebadores degenerados diseñados para las regiones conservadas dentro de las conocidas GSTs clase tau usando métodos de alineamiento conocidos en el arte. El ARN total se obtuvo de cultivos celulares de soja (*Glicina max* cv. Mandarin) usando el reactivo TRIZOL™ (Life Technologies™) según las pautas de los fabricantes. La primera cadena de ADNc se obtuvo de 5 µg de ARN total usando el oligonucleótido OG2 (SEQ ID No. 35) en conjunto con la reverso transcriptasa Superscript-II (Life Technologies™) usando los protocolos 45 estándares proporcionados por el fabricante. Los oligonucleótidos cebadores degenerados CON2 (SEQ ID No. 17) y CON3 (SEQ ID No. 18) se usaron entonces en las reacciones de PCR independientes con el oligonucleótido cebador OG9 (SEQ ID No. 16) para amplificar parcialmente los genes que codifican para la GST a partir de la primera cadena de ADNc. 2 µl de la primera cadena de ADNc sintetizada se usaron como plantilla en la reacción. Las condiciones de PCR usadas son (94°C, 45 s; 51°C, 30 s y 72°C, 60 s) 35 ciclos usando la Taq ADN polimerasa suministrada 50 por Life Technologies y un termociclador Techne. Los productos amplificados fueron ligados en el vector pCR2.1 (Invitrogen™) y transformados en células de *E. coli* INV F'.

1.2 Las colonias transformadas se seleccionaron en medio LB que contiene 100 ug ml-1 de ampicilina y 40 ug ml de X-GAL. Los plásmidos se recuperaron a partir de cultivos de toda la noche de 5 ml, iniciado cada uno de 90 colonias 55 blancas individuales (45 de cada reacción de RT inicial). Los diferentes plásmidos fueron sometidos entonces a análisis de restricción (EcoRI, SspI, SspI: SphI y RsaI) permitiendo agrupar los clones similares. Los distintos ADNcs fueron identificados por secuencia automatizada de ADN con los cebadores M13, usando un secuenciador automático de ADN ABI 377, y analizados por similitud con las secuencias de GST conocidas mediante la realización de búsquedas en bases de datos usando el algoritmo BLAST (Altschul S.F y otros, 1990).

60

Ejemplo 2

Aislamiento e identificación del ADNc parcial que codifica para la homoglutación sintetasa

65 2.1 Un ADNc de longitud parcial que codifica para la homoglutación sintetasa fue obtenido por RT-PCR. Los oligonucleótidos cebadores degenerados MS-3 (el SEQ ID No.15) y OG9 (SEQ ID No. 16) se usaron para amplificar

ES 2 316 382 T3

específicamente el clon deseado de primera cadena de ADNc, producido por cultivos celulares de soja como se describe anteriormente.

2.2 El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pCR2.1 y fue secuenciado usando un secuenciador automático de ADN AB1377TM. Los productos que exhiben homología con glutatión sintetasas relacionadas fueron identificados buscando en las bases de datos usando el algoritmo BLAST.

Ejemplo 3

Construcción de la librería, aislamiento del clon y secuenciación

3.1 Se construyó una biblioteca de ADNc usando el sistema lambda ZAP-II (Stratagene). El ARN total se aisló de una suspensión celular de cultivos de 5 días de células soja (cv. Mandarin) usando reactivo TRIZOLTM. El ARNm Poli A+ se aisló a partir de ARN total usando PolyATtract (PromegaTM) según los protocolos estándares suministrados. La biblioteca de ADNc se construyó según los siguientes protocolos estándares proporcionados por StratageneTM.

La tabla 1 más abajo muestra las características de la biblioteca de ADNc construida de una suspensión celular de cultivos de 5 días de células soja (cv. Mandarin).

Biblioteca	Título primario	Promedio talla ADNc
Cultivo de células de planta de semillero	2×10^6 pfu	1.4 Kb

3.2 Las secuencias parciales de ADNc identificadas en los ejemplos anteriores fueron marcadas con P³² usando el kit de marcaje Ready-to-go (PharmaciaTM) y usadas para muestrear la biblioteca de ADNc de soja por ADNcs de longitud completa. Fueron muestreados 160,000 pfu y las colonias supuestas hibridaron de forma cruzada con las sondas sometidas a un muestreo secundario y terciario hasta que se observó pureza en la placa. El ADN de los plásmidos se recuperó de las reservas de placas puras usando protocolos de escisión *in vivo* suministrados por StratageneTM. Fueron identificados los ADNcs de longitud completa que codifican para GSTs y los ADNcs de longitud completa que codifican para la homoglutatión sintetasa.

Ejemplo 4

Identificación de GSTs de soja con actividad sobre sustratos herbicidas

4.1 Expresión bacteriana de los clones de ADNc

Los ADNcs de longitud completa que codifican para homoglutatión sintetasa y glutatión S-transferasa se expresaron de forma independiente en *E.coli* usando el sistema de expresión pET (NovagenTM).

4.2 Los sitios *NdeI* o *NcoI* fueron introducidos de forma apropiada en el extremo 5' de los ADNcs que codifican para la glutatión S-transferasa y *BamHI* en el extremo 3' usando PCR. El ADNc se clonó entonces en el pET-24a o pET-24d como es apropiado. Los plásmidos resultantes se introdujeron en *E.coli* BL21 (DE3) usando procedimientos estándares de transformación bacteriana conocidos por aquellos expertos en el arte. La expresión y purificación de la GST recombinante se realizó usando cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad S-Hexil-glutatión según los métodos conocidos en el arte (por ejemplo, Skipsey y otros, 1997). La actividad GST de la proteína recombinante purificada hacia CDNB, acetoclor, acifluorfen, etil clorimuron, fluorodifen, fomesafen y metolaclor en presencia de ambas glutatión y homoglutatión se realizó por medio de ensayos que se describen en Andrews y otros, 1997 y Skipsey y otros, 1997.

4.3 La tabla 2 más abajo muestra la actividad de enzimas recombinantes. \pm SE, n=2, ND = No detectable, *Actividad nkat mg-1, **Actividad pkat mg-1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Clon	GSH	hGSH	GSH	hGSH	GSH	hGSH	GSH	hGSH	GSH	hGSH	GSH	hGSH	GSH	hGSH	
GST 2.6	18.7 ±0	19.0 ±0	352.5 ±106.5	391.0 ±12.0	ND	ND	31.1 ±0	ND	ND	ND	19.3 ±2.8	27.1 ±1.4	350.5 ±78	142.0 ±15.0	95.5 ±12.5
GST 3.1	59.2 ±0	59.2 ±0	190.5 ±13.5	11.0 ±2.5	152.5 ±1.5	238.5 ±2.5	ND	ND	ND	1150 ±50	1350 ±0	213.6 ±2.6	484.6 ±11.8	177.5 ±7.5	67.5 ±1.5
GST 3.2	24.9 ±2.3	10.3 ±1.6	418.0 ±15.0	143.0 ±18.0	7.5 ±0.4	23.2 ±0.1	ND	ND	ND	78.2 ±1.4	68.0 ±4.3	21.3 ±7.0	201.6 ±2.7	253.0 ±56.0	191.5 ±1.5
GST 3.3	82.9 ±4.2	189.0 ±9.7	420.0 ±30.0	ND	123.0 ±2.0	1350 ±31	ND	ND	ND	360.5 ±48.5	602.5 ±100.5	110 ±3.0	6250 ±150	312.0 ±3.0	264.5 ±8.5

ES 2 316 382 T3

Ejemplo 5

Identificación de Homoglutatión sintetasa activa

5.1 Expresión bacteriana del clon de ADNc

Sitios de enzimas de restricción 5' *NcoI* y 3' *XhoI* fueron introducidos en el ADNc de homoglutatión sintetasa por medio de PCR usando los cebadores MS4-*Nco* (SEQ ID No. 20). Además, el uso del cebador MS-4-HIS proporciona una cola de HIS C-terminal para ayudar a la purificación de la enzima.

10

5.2 El fragmento resultante de la PCR fue digerido con *NcoI* y *XhoI* y ligado en el pET-24d similarmente digerido. Este vector fue llamado pET-MS4-His. La purificación de la homoglutatión sintetasa se realizó usando el siguiente método. Las *E.coli* BL21 (DE3) que portaban el plásmido pET-MS4-His (sección 1.3) fueron crecidas a 30°C hasta una DO₆₀₀ = 0.5, luego se añadió isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM. Posterior a una incubación de 3 horas las bacterias fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en tampón A (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol pH 8.0) y lisadas. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación (10,000 g, 10 min) y el sobrenadante aplicado a una columna de 5 ml de ácido iminodiacético (SigmaTM), previamente cargado con NiSO₄ y equilibrado en tampón A. La columna fue lavada con tampón A que contiene 20 mM de imidazol, seguido por tampón A que contiene 300 mM de imidazol para remover las proteínas unidas por afinidad.

20

5.3 La proteína eluida fue concentrada usando una columna de centrifugación Centriplus 30 (AmiconTM) y resuspendida en tampón A previo a su aplicación a una columna quelante HiTrap de 1 ml (PharmaciaTM), pre-cargada con NiSO₄ y equilibrada como se describió anteriormente. La proteína unida por afinidad es recobrada entonces usando una concentración creciente de imidazol de 20-200 mM y la presencia de la homoglutatión sintetasa recombinante con cola de Histidina fue detectada usando anticuerpos para colas de Histidina de acuerdo a procedimientos conocidos. Las fracciones que contenían la homoglutatión sintetasa recombinante fueron agrupadas, concentradas usando columnas de centrifugación Centricon 30 y resuspendidas en 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT.

25

5.4 Se ensayó la actividad de la homoglutatión sintetasa en 250 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 mM ATP, 1 mM γ-glutamilcisteína y 50 mM glicina o 10 mM β-alanina en un total de 100 μl. Los controles experimentales no contenían la enzima o glicina/β-alanina. Los ensayos se realizaron a 30°C por 60 minutos, con alícuotas de 20 μl removidas a intervalos de tiempo regulares. Entonces se realizó una derivatización monobromobimana en las alícuotas para determinar la presencia de o glutatión o homoglutatión de acuerdo con los métodos descritos por Cummins y otros, 1997.

35

TABLA 3

Características de la homoglutatión sintetasa recombinante

40

	B-alanina	Glicina
Vmax (pkats/mg hGS)	42250 ± 3173	3300 ± 341
Km (mM)	0.84 ± 0.19	54.9 ± 18.7

45

Ejemplo 6

50

Generación de plantas resistentes/tolerantes a los herbicidas

6.1 Las plantas con tolerancia incrementada a los herbicidas acifluorfen y fomesafen fueron obtenidas por expresión en la planta hospedero de ambos la GST 3.3 activa de soja y la homoglutatión sintetasa para incrementar además los niveles de homoglutatión, requeridos para potenciar la eficiencia de la función de GST 3.3.

55

6.2 La PCR, usando los oligonucleótidos cebadores hGSH-*NcoI* (SEQ ID No. 21) y hGSH-*KpnI* (SEQ ID No. 22) se usó para introducir un sitio 5' *NcoI* y un sitio 3' *KpnI* en el ADNc GST 3.6. El producto resultante de la PCR fue purificado, secuenciado, digerido con *NcoI* y *KpnI* y ligado en el vector pMJB2 (Figura 1). El cassette de expresión, que comprende el promotor doble potenciado CaMV35S: Glucanasa II líder, ADNc de hGSH sintetasa y terminador *nos* fue escindido entonces de pMJB2 usando *HindIII/EcoRI* y ligado en el vector binario pMOG800 similarmente digerido (Figura 3).

60

6.3 Los oligonucleótidos cebadores 3.6-*BglIII* (SEQ ID No. 23) y 3.6 *NcoI* (SEQ ID N. 24) fueron usados para introducir los sitios *NcoI* y *BglIII* en los extremos 5' y 3' del ADNc GST 3.6 respectivamente. El producto resultante de la PCR fue purificado, secuenciado y digerido con *NcoI* y *BglIII* y sub-clonado en el vector pMOG1051 (Figura 2). El cassette de expresión que comprende el promotor RoID/Fd, ADNc de GST 3.3 y el terminador PI-II de papa fue

65

ES 2 316 382 T3

escindido entonces de pMOG1051 usando *Bam*HI y ligado en el único sitio *Bam*HI en el vector binario pMOG800 (Figura 3) que porta el cassette de expresión de la homoglutatin sintetasa (ver adelante). La orientación del inserto fue determinada por PCR. El vector binario resultante, llamado pFT2 (Figura 4) fue secuenciado íntegramente para confirmar su autenticidad.

5

Ejemplo 7

Transformación y Regeneración de planta

10

7.1 El vector binario pFT2 fue transformado en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 usando el método de transformación de congelación descongelación proporcionado por Holsters y otros, 1978. La transformación de tabaco y regeneración de la planta entera fue realizada usando *Nicotiana tabacum* var. Samsun según los protocolos estándares detallados por Bevan, 1984. Los eventos de transformación se seleccionaron en medio MS que contiene kanamicina. Pueden ser empleados otros métodos de transformación para la transformación de otros cultivos, tales como la soja. Ejemplos de tales métodos son referidos a continuación.

15

Ejemplo 8

20

Análisis de plantas transgénicas

8.1 Análisis por PCR de los transformantes

25 Se tomaron muestras de hojas de líneas transformadas y se extrajo ADNc según los métodos descritos por Edwards y otros, 1991. Los pares de oligonucleótidos cebadores SEQ ID No. 21 y SEQ ID No. 22 y SEQ ID. No. 23 SEQ ID No. 24 fueron usados para amplificar regiones específicas dentro de la homoglutatin sintetasa y GST 3.3 para permitir la detección de ambos transgenes dentro del material putativo de la planta transformada.

30 Los análisis siguientes fueron realizados en material positivo a PCR para confirmar la funcionalidad de los genes introducidos.

8.2 Análisis de la enzima

35 La actividad GST hacia el fomesafen en líneas transgénicas fue realizado de acuerdo a los métodos descritos en la publicación de Andrews y otros, 1997.

8.3 Actividad sintetasa de tiol libre

40 Las actividades glutatión y homoglutatin sintetasa fueron determinadas en las líneas transgénicas usando el ensayo descrito anteriormente.

8.4 Determinación de tiol libre

45 La presencia de tiol libre en las plantas transgénicas fue determinada usando el método de derivatización monobromobimana. El tejido (1 g) fue pesado con precisión, congelado en nitrógeno líquido, triturado a polvo fino y transferido a un tubo limpio que contiene 3 ml de HCl 0.1 M. Después de una incubación en hielo por 30 minutos con mezcla ocasional, la mezcla fue transferida a un tubo eppendorf y centrifugada (13,000 g, 3 min). Dos alícuotas de 100 μ l de sobrenadante fueron transferidas a tubos eppendorfs limpios, y se añadió 10 μ l de agua a uno y al otro se le añadió 1 mM de glutatión o homoglutatin (10 μ l). El tiol libre presente fue reducido por la adición de 10 μ l de NaOH 1M seguido por 10 μ l de NaOH que contenía 20 mg/ml NaBH₄ y la solución fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente.

50

55 8.4.1 La reacción fue detenida por la adición de 120 μ l de HCl 3.6 M y las muestras centrifugadas (13,000 g, 5 min). El sobrenadante (100 μ l) fue transferido a un tubo fresco y 10 μ l de 5 mg/ml de monobromobimana disueltos en acetonitrilo añadidos, seguido por 5 μ l de N-etilmorfolina al 35% v/v. Las muestras fueron puestas en la oscuridad por un periodo de 20 min, y la reacción fue parada por la adición de 880 μ l de ácido acético al 5% (5 μ l v/v). Una curva estándar fue preparada derivatizando glutatión o homoglutatin (0-20 mmol), y los conjugados S-bimana analizados por HPLC usando metodología conocida en el arte (Cummins y otros, 1997).

60

Ejemplo 9

Pruebas de tolerancia a los herbicidas

65

9.1 A continuación del cultivo de tejidos, las plántulas resistentes a la kanamicina fueron transferidas a recipientes de 5 pulgadas que contienen abono para recipientes John Innes no. 3. Se les permitió a las plantas desarrollarse hasta aproximadamente un estadio 10 de hoja y se aplicó fomesafen a 10 g ai ha⁻¹, formulado con surfactante no iónico, al

ES 2 316 382 T3

tejido aéreo usando un atomizador de pista. La evaluación visual de la fitotoxicidad/necrosis de la planta se realiza a los 5 días posteriores a la aplicación.

TABLA 4

Análisis de líneas de tabaco transgénicas

Línea de planta	% de daño	Actividad GST hacia fomesafen		Actividad GSH	Actividad hGSH	ug GSH	UG hGSH
		GSH	hGSH				
WT	55	1.4	5.0	0.91	ND	71.3	ND
T82 3740	15	5.2	558.5	4.6	113.3	78.3	18.5
T82 3747	5	10.7	1320.4	1.59	145.9	112.2	26.9

Ejemplo 10

Producción de líneas homocigóticas de plantas

10.1 Las líneas transgénicas de planta de una sola copia fueron identificadas por análisis con Southern blot según los métodos descritos por Sambrook, 1989 usando sondas apropiadas radiomarcadas. El análisis de segregación fue realizado en plantas que contenían un solo evento de inserción por germinación en medio MS que contiene kanamicina. La confirmación posterior de líneas homocigóticas puede ser realizada por retro cruzamiento de líneas transgénicas con tabaco tipo salvaje y análisis de segregación genética seguido por selección en kanamicina.

Referencias

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.U y Lipman D.J (1990). Basic local alignment tool. *Journal of Molecular Biology* **215** 403-410.

Andrews C.J., Skipsey M., Townson J.K., Morris C., Jepson I. y Edwards R (1997) Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. *Pesticide Science* **51** 2 13-222.

Bevan M.M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors used for plant transformation. *Nucleic Acids Research* **12** 871 1-8721.

Cummins I., Moss S., Cole D.J y Edwards R (1997) Glutathione Transferases in Herbicide-resistant and Herbicide-Susceptible Black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Pesticide Science* **51** 244-250.

Edwards K., Johnstone C y Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19** 1349.

Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M y Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* **163** 181-187.

Skipsey M., Andrews C.J., Townson J.K., Jepson I y Edwards R (1997) Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. *FEBS Letters* **409** 370-374.

Christou, Paul. Physiol. Plant. (1990), 79(1), 2 10-12. Soybean transformation by electric discharge particle acceleration.

Dan, Yinghui; Reichert, Nancy A. (1999), Patente US No. 5968830 Soybean transformation and regeneration methods.

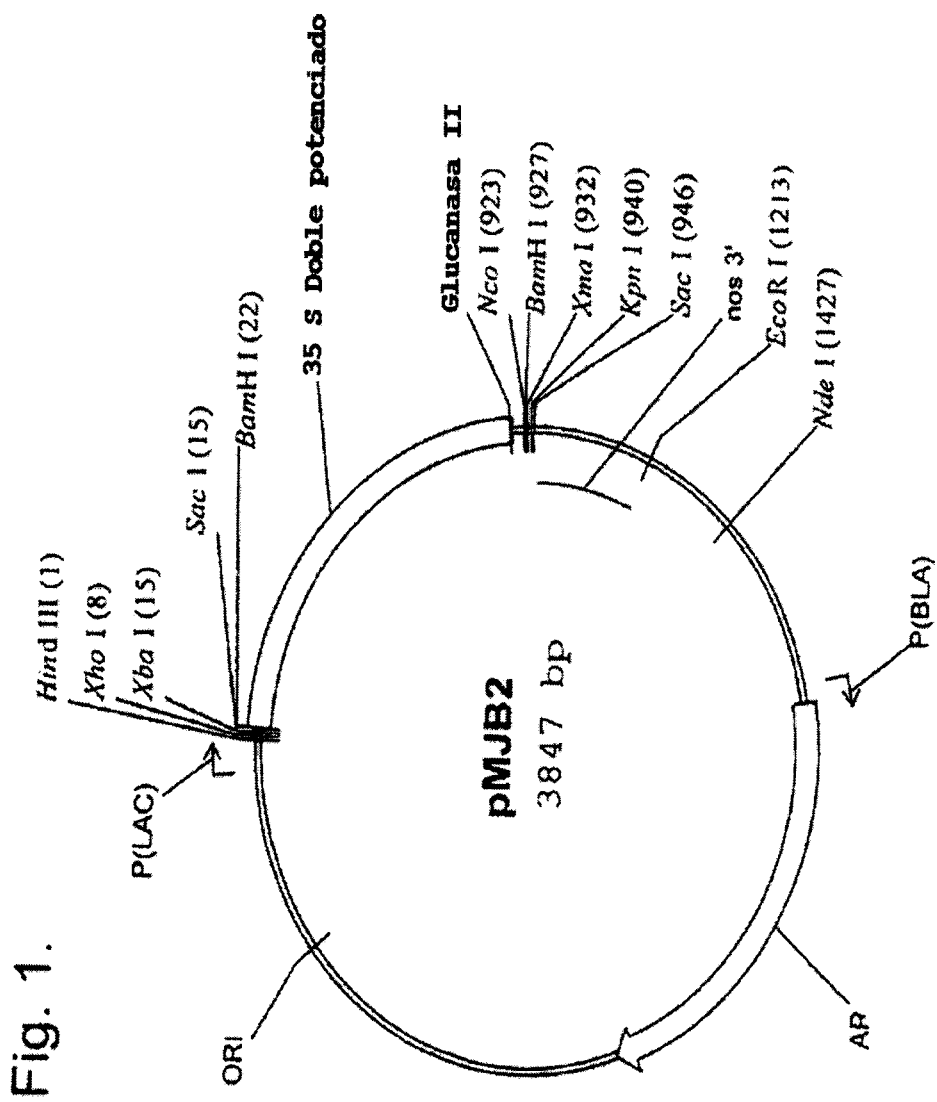
Williams, Edward J.; Emler, Card A.; Julson, Lori S.; Martinell, Brian J.; McCabe, Dennis E.; Huang, Yong. (2000) Solicitud Internacional de Patente Número de Publicación. W0/0042207 Soybean transformation method omitting callus culture.

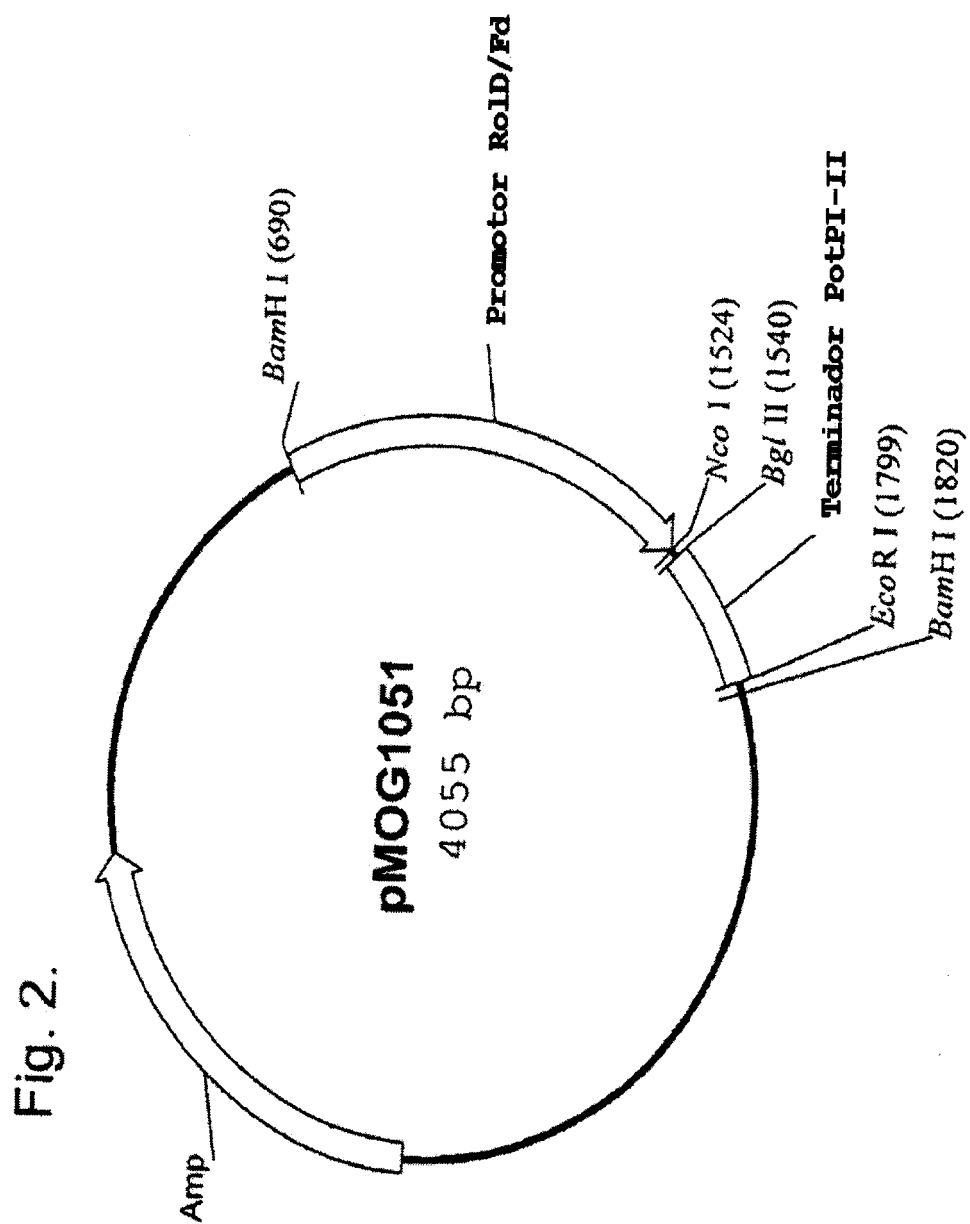
Hinchee, Maud Ann Wrightson; Clemente, Thomas Elmo; Connor-Ward, Dannette Vaudrilyn; Fedele, Mary Jacqueline; Fry, Joyce Ellen; Howe, Arlene R.; Rozman, Renee Jean. Patente US No. 5959179. Method for transforming soybeans.

ES 2 316 382 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una Glutación-S-transferasa (GST) que comprende la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID NO. 10 o una variante de GST que tiene al menos 80% de identidad con la misma cuando se calcula sobre la longitud completa de la SEQ ID NO. 10 con la condición de que dicha variante de GST no comprenda la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID NO. 36, y en la cual la GST o variante de GST sea capaz de conferir resistencia y/o tolerancia a un herbicida el cual comprende fomesafen y/o acifluorfen.
- 10 2. Un polinucleótido que comprende la región que codifica para una GST o variante de GST de acuerdo a la reivindicación 1.
3. Un polinucleótido de acuerdo a la reivindicación 2 que comprende la secuencia descrita como SEQ ID NO. 14.
- 15 4. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID NO. 1 o una variante de proteína que tiene al menos un 80% de identidad con la misma cuando se calcula sobre la longitud completa de la SEQ ID NO. 1, donde dicha proteína o variante es capaz de catalizar la adición de Beta-alanina sobre gamma glutamylcisteína y donde la variante tiene una Km para Beta-alanina la cual es menor que dichas variantes de Km para glicina cuando se calcula usando el mismo método.
- 20 5. Una variante de proteína de acuerdo a la reivindicación 4 cuya variante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo descrito como SEQ ID NOs. 2, 3, 4 ó 5.
- 25 6. Un polinucleótido que comprende una región que codifica para una proteína o variante de proteína según las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Un polinucleótido de acuerdo a la reivindicación 6 que comprende la secuencia descrita como SEQ ID NO. 6.
- 30 8. Un polinucleótido que comprende la primera región que comprende un polinucleótido según las reivindicaciones 2 ó 3 y una segunda región que comprende un polinucleótido según las reivindicaciones 6 ó 7.
9. Un polinucleótido de acuerdo a la reivindicación 8 donde dicha primera región comprende un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID NO. 10 y dicha segunda región comprende un polinucleótido que codifica para un aminoácido descrito como SEQ ID NO. 1.
- 35 10. Un método de proporcionar plantas que sean resistentes y/o tolerantes a un herbicida difenil éter que comprende:
- 40 (a) insertar en el material del genoma de la planta un polinucleótido o una secuencia de polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 8 ó 9;
- (b) regenerar plantas o partes de plantas de la misma; y
- 45 (c) aplicar a dichas plantas o partes de plantas una cantidad de dicho herbicida difenil éter el cual es fitotóxico a las plantas tipo control y seleccionar aquellas plantas o partes de plantas las cuales son resistentes a dicho herbicida difenil éter.
- 50 11. Plantas o partes de plantas, donde dichas plantas o partes de plantas son resistentes a los herbicidas difenil éter debido a la expresión de una GST de acuerdo a la reivindicación 1 codificada por una construcción de ADN que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 8 ó 9.
12. Un método para proporcionar una planta con una característica agronómica deseada adicional que comprende:
- 55 (a) insertar en el material del genoma de la planta de una planta o parte de una planta de acuerdo a la reivindicación 11 un polinucleótido el cual proporciona una característica agronómica deseada adicional y regenerar plantas o partes de plantas de dicho material; o
- 60 (b) el método de la reivindicación 10, seguido por el cruzamiento de la primera planta o parte de planta proporcionada por el paso (c) del método de la reivindicación 10 con una segunda planta la cual proporciona dicha característica agronómica deseada y seleccionar dichas plantas resultantes las cuáles contienen dicha característica agronómica deseada adicional.
- 65 13. Un método de controlar selectivamente las malas hierbas en un campo dicho campo comprendiendo plantas de cultivo y malas hierbas, dicho método comprendiendo aplicar a dicho campo una formulación agrícola aceptable de un agroquímico que comprende fomesafen y/o acifluorfen, donde dichas plantas de cosecha son las plantas de acuerdo a la reivindicación 11.





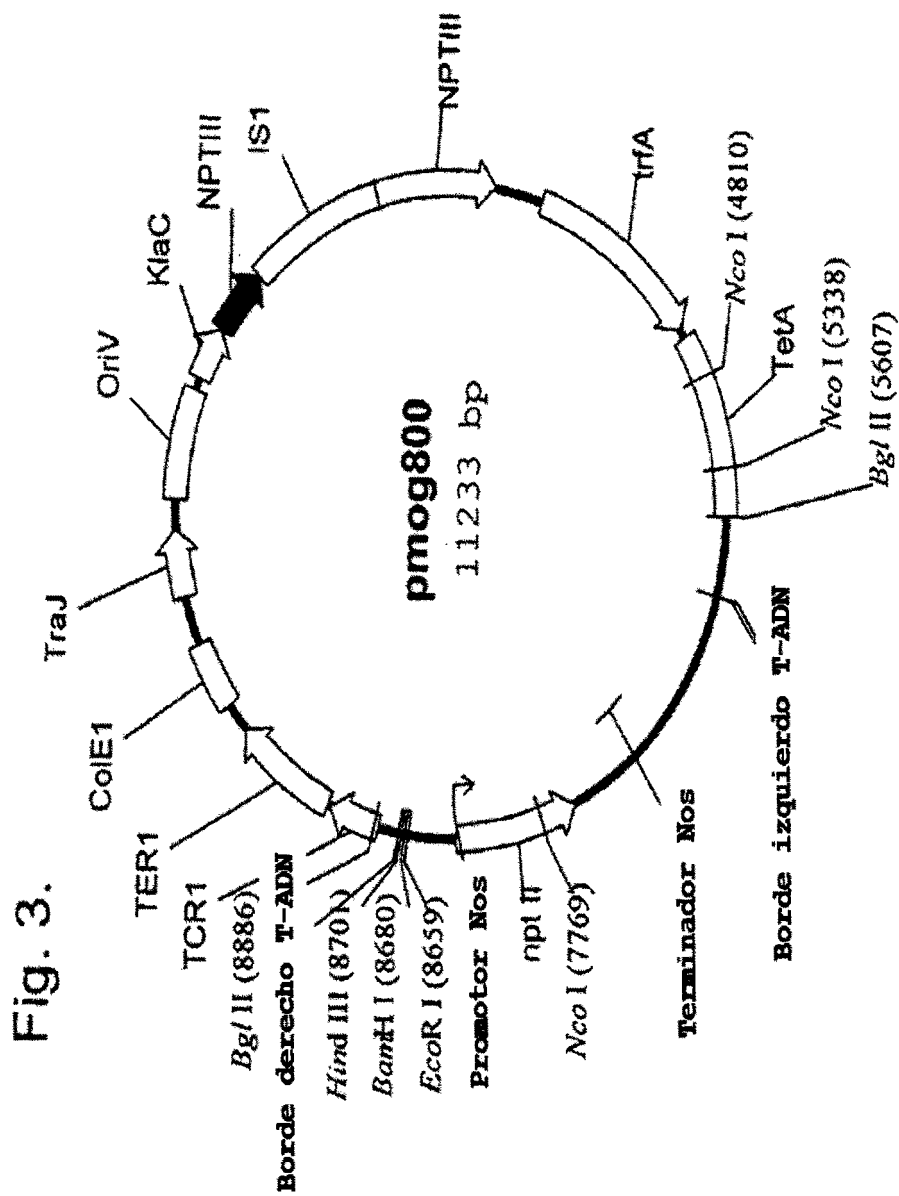
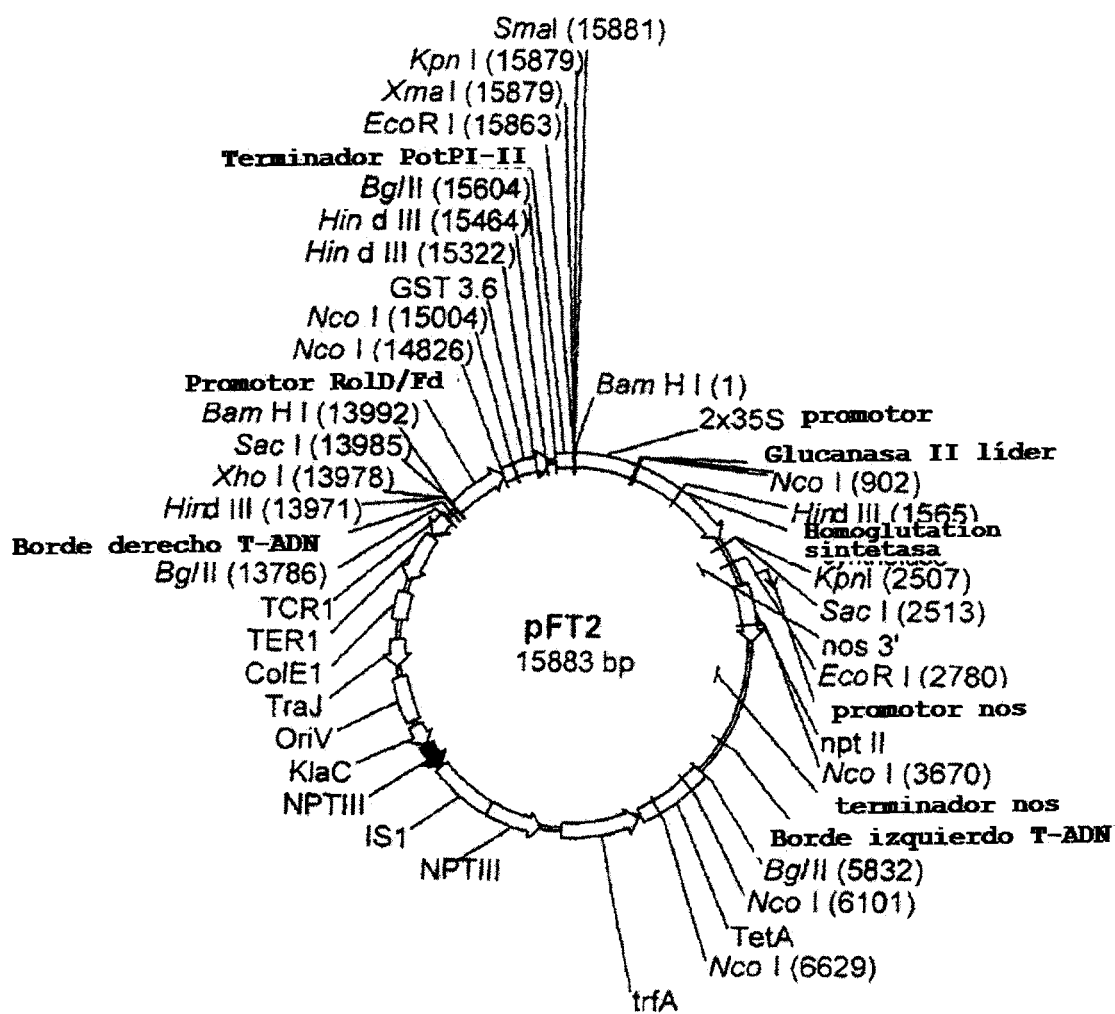


Fig. 4



ES 2 316 382 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZENECA LIMITED

5 <120> SECUENCIAS DE GST DE SOJA Y SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS RESISTENTES A LOS HERBICIDAS

10 <130> CASO ZENECA PPD50449/WO

<140>

<141>

15 <150> GB9922346.3

<151> 1999-09-21

20 <160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

25 <211> 499

<212> PRT

<213> *Glicina max*

30 <400> 1

35 Met Ser Gln Pro Leu Thr Thr Asn Ser Val Leu Val Glu Glu Ala Ala
1 5 10 15

40 Ala Asp Gly Asp Ser Ser Ala Ala Ala Pro Pro Leu Phe Asp Tyr His
20 25 30

45 Arg Ile Asp Gln Lys Leu Leu Gln Asn Ile Val Tyr Asp Ala Leu Val
35 40 45

50 Trp Ser Thr Leu Asn Cys Leu Leu Val Gly Asp Lys Ser Val Gln Arg
50 55 60

55 Ser Gly Arg Val Pro Gly Val Gly Leu Val His Leu Pro Leu Ser Leu
65 70 75 80

60 Leu Pro Gly Pro Phe Pro Glu Ser His Trp Lys Gln Gly Cys Glu Leu
85 90 95

65

ES 2 316 382 T3

Ala Pro Ile Phe Asn Glu Leu Val Asp Arg Val Ser Leu Asp Gly Lys
 100 105 110

5 Phe Leu Gln Glu Ser Leu Ser Arg Thr Lys Asn Ala Asp Glu Phe Thr
 115 120 125

10 Ser Arg Leu Leu Asp Ile His Ser Lys Met Leu Gln Ile Asn Lys Lys
 130 135 140

15 Glu Asp Ile Arg Met Gly Ile Val Arg Ser Asp Tyr Met Ile Asp Glu
 145 150 155 160

20 Lys Thr Lys Ser Leu Leu Gln Ile Glu Met Asn Thr Ile Ser Thr Ser
 165 170 175

25 Phe Ala Leu Ile Gly Cys Leu Met Thr Gly Leu His Lys Ser Leu Leu
 180 185 190

30 Ser Gln Tyr Gly Lys Phe Leu Gly Leu Asn Ser Asn Arg Val Pro Ala
 195 200 205

35 Asn Asn Ala Val Asp Gln Ser Ala Glu Ala Leu Ala Lys Ala Trp Ser
 210 215 220

40 Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ala Ala Ile Leu Val Val Val Gln Val Glu
 225 230 235 240

45 Glu Arg Asn Met Tyr Glu Gln His Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Arg Glu
 245 250 255

50 Lys His His Ile Arg Ser Ile Arg Lys Thr Leu Thr Gln Ile Asp Gln
 260 265 270

55 Glu Gly Lys Ile Leu Pro Asp Gly Thr Leu Ser Val Asp Gly Gln Ala
 275 280 285

60 Ile Ser Val Val Tyr Phe Arg Ala Gly Tyr Thr Pro Lys Asp Tyr Pro
 290 295 300

65 Ser Glu Ser Glu Trp Arg Ala Arg Leu Leu Met Glu Gln Ser Ser Ala
 305 310 315 320

Ile Lys Cys Pro Thr Ile Ser Tyr His Leu Val Gly Thr Lys Lys Ile

ES 2 316 382 T3

		325		330		335	
5	Gln Gln Glu Leu Ala Lys Pro Gly Val Leu Glu Arg Phe Val Glu Asn	340		345		350	
10	Lys Asp His Ile Ala Lys Leu Arg Ala Cys Phe Ala Gly Leu Trp Ser	355		360		365	
15	Leu Glu Asp Ser Asp Ile Val Lys Lys Ala Ile Glu Asn Pro Glu Leu	370		375		380	
20	Phe Val Met Lys Pro Gln Arg Glu Gly Gly Gly Asn Asn Ile Tyr Gly	385		390		395	400
25	Asp Glu Leu Arg Glu Thr Leu Leu Lys Leu Gln Glu Ala Gly Ser Gln		405		410		415
30	Glu Asp Ala Ala Tyr Ile Leu Met Gln Arg Ile Phe Pro Ala Thr Ser		420		425		430
35	Pro Ala Ile Leu Val Arg Asp Gly Asn Trp Asp Thr Gly His Val Ile		435		440		445
40	Ser Glu Ala Gly Ile Phe Gly Thr Tyr Leu Arg Asn Lys Asp Lys Ile		450		455		460
45	Ile Ile Asn Asn Glu Ser Gly Tyr Met Val Arg Thr Lys Ile Ser Ser		465		470		475
50	Ser Tyr Glu Gly Gly Val Leu Pro Gly Phe Gly Val Val Asp Thr Val		485		490		495
	Tyr Leu Thr						

55 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Fragmento de Proteína.
 65

ES 2 316 382 T3

<400> 2

5 Lys Lys Ile Gln Gln Glu Leu Ala Lys Pro
1 5 10

<210> 3

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Fragmento de Proteína.

<400> 3

20

Cys Phe Ala Gly Leu Trp Ser Leu
1 5

25

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Fragmento de Proteína

35

<400> 4

40

Val Met Lys Pro Gln Arg Glu Gly Gly Gly Asn Asn Ile Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 5

45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Fragmento de Proteína

<400> 5

55

Ala Ala Tyr Ile Leu Met Gln Arg Ile Phe Pro
1 5 10

60

<210> 6

<211> 1854

<212> ADN

65

<213> *Glicina max*

ES 2 316 382 T3

<400> 6

```

5      gggggcttgg tttgtcttac ttctctttac actgggatte gaacaaggcg tttgtgcact 60
      tctaacacca ccacccttcc ctcccccaaa caacctcaat cactctcttt cgctaaacct 120
      ctcaaaactca tglctcaacc ttgaccacc aactctgttc ttgttgaaga ggctgctgct 180
      gatggtgatt cctcggcggc cgcacctccc ctcttcgatt atcatcgtat cgaccaaaaa 240
10     ctgctccaaa acatagtta cgtctctctt gtctggagaa cctcaactg cctccttgtt 300
      ggtgacaaat ctgttcagag atcaggaaga gttcctgggt tgggcctggt acatctccca 360
      cttcctttat tacctgggac atttcttgae agtcattgga agcaagggtg cgaattagct 420
      cctatattta atgaacttgt tgatcgggtg agtttggatg ggaattttct ccaggaatct 480
15     ctctccagaa ctaagaatgc ggatgaattt acctcaagac ttttagatat cacttctaag 540
      atgctacaga ttaacaaaaa agaggacata cgcctgggaa tagttcgttc agatttatg 600
      attgatgaga agacteaatc acttttacia atagagatga acactatttc cacttcattt 660
20     gctttgattg gttgtcttat gactggactt cataagactt tactttctca atatggaaaa 720
      ttctttggac taaattccaa tagggttctt gcccaaatg ccgttgatca gctctcagag 780
      gctctggcta aagcttggag tgagtataac aatcccaggc ctgcaattct ggctctggtt 840
25     caggttgaag aaagaaacat gtacgagcag catttatatt ctgcacttct aagagaaaag 900
      catcatatta gaagcatacg caaaaacttg accgaattg atcaggaagg aaaaattctg 960
      ccagatggaa cactttctgt ggatggacaa gcaetctcag ttgtttactt ccggcctggc 1020
      tacacgccaa aggactatcc ttccgaatca gaatggagag ctaggctact gatggaacaa 1080
30     tottctgcta tcaaatgcc tacaatatct tatcatttgg ttggcaccaa aaagattcaa 1140
      caggaacttg caaagcctgg tgttcttgag aggtctgttg aaaaacaaqa ccacattgcc 1200
      aaattggctg catgctttgc aggtttgttg agtttggag actcagatat tgttaaaaaa 1260
35     gcaattgaaa atccagagct atttgtgatg aagcctcaaa gagaaggagg aggaaacaat 1320
      atttatgggtg atgagttgag ggaaccctc cttaaatlac aggaagcagg ttctcaagaa 1380
      gatgcagcat acatccttat gcagaggata ttccccca cttctccagc aatttlgglg 1440
40     cgtgatggtt attgggatac gggctatgtc atttcagaag ctggaatatt tggtaactat 1500
      ttaaggaata aggacaagat taccatcaat aacgaagtg gctatatggt gcgtacaaaa 1560
      atarcatcat ctatgaagg aggaqttttg cctggttttg gagtggtaga tactgtatad 1620
      ctaacttgat ggagctaacc ccccaagtta tcaagcaat tcaaaaacatt atgtatggtt 1680
45     tatatataac cactcaagtc tctcactcc tgattttctt tgtatggagg cattgctggt 1740
      tcttttaatt gttctatgg gatggggtct aattattaac tgtactcaac gacctgtttg 1800
      attctaacca ataaagattg atgaactgtt ctacaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1854

```

50

<210> 7

<211> 222

<212> PRT

55

<213> *Glicina max*

60

65

ES 2 316 382 T3

<400> 7

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

ES 2 316 382 T3

<210> 8

<211> 235

<212> PRT

5 <213> *Glicina max*

<400> 8

10 Met Ala Glu Gln Asp Lys Val Ile Leu His Gly Met Trp Ala Ser Pro
1 5 10 15

15 Tyr Ala Lys Arg Val Glu Leu Ala Leu Asn Phe Lys Gly Ile Pro Tyr
20 25 30

20 Glu Tyr Val Glu Glu Asp Leu Arg Asn Lys Ser Asp Leu Leu Leu Lys
35 40 45

25 Tyr Asn Pro Val His Lys Lys Val Pro Val Leu Val His Asn Gly Lys
50 55 60

30 Ala Ile Ala Glu Ser Met Val Ile Leu Glu Tyr Ile Asp Glu Thr Trp
65 70 75 80

35 Lys Asp Gly Pro Lys Leu Leu Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Arg Ala Gln
85 90 95

40 Ala Arg Phe Trp Cys His Phe Ile Gln Asp Gln Leu Met Glu Ser Thr
100 105 110

45 Phe Leu Val Val Lys Thr Asp Gly Glu Ala Gln Gln Lys Ala Ile Asp
115 120 125

50 His Val Tyr Glu Lys Leu Lys Val Leu Glu Asp Gly Met Lys Thr Tyr
130 135 140

55 Leu Gly Glu Gly Asn Ala Ile Ile Ser Gly Val Glu Asn Asn Phe Gly
145 150 155 160

60

65

ES 2 316 382 T3

Ile Leu Asp Ile Val Phe Cys Ala Leu Tyr Gly Ala Tyr Lys Ala His
 165 170 175
 5
 Glu Glu Val Ile Gly Leu Lys Phe Ile Val Pro Glu Lys Phe Pro Val
 180 185 190
 10
 Leu Phe Ser Trp Leu Met Ala Ile Ala Glu Val Glu Ala Val Lys Ile
 195 200 205
 15
 Ala Thr Pro Pro His Glu Lys Thr Val Gly Ile Leu Gln Leu Phe Arg
 210 215 220
 20
 Leu Ser Ala Leu Lys Ser Ser Ser Ala Thr Glu
 225 230 235
 25
 <210> 9
 <211> 223
 <212> PRT
 30 <213> *Glicina max*
 <400> 9
 35 Met Ala Glu Val Lys Leu His Gly Phe Trp Tyr Ser Pro Tyr Thr Leu
 1 5 10 15
 40 Arg Val Val Trp Thr Leu Lys Leu Lys Asp Ile Pro Tyr Gln Asn Ile
 20 25 30
 45 Glu Glu Asp Arg Tyr Asn Lys Ser Leu Gln Leu Leu Glu Tyr Asn Pro
 35 40 45
 50 Val Tyr Lys Lys Thr Pro Val Leu Val His Asn Gly Lys Pro Leu Cys
 50 55 60
 55 Glu Ser Met Leu Ile Val Glu Tyr Ile Asp Glu Ile Trp Ala His Asn
 65 70 75 80
 60 Ser Leu Leu Pro Ala Asp Pro Tyr Glu Arg Ala Leu Ala Arg Phe Trp
 85 90 95
 65 Val Lys Tyr Ala Asp Asp Asp Met Phe Ser Ala Val Ile Ala Phe Phe
 100 105 110

ES 2 316 382 T3

Leu Ser Asn Asn Asp Glu Glu Arg Glu Lys Ser Ile Glu Lys Ile Trp
 115 120 125

5

Glu His Leu Arg Val Val Glu Asn Gln Cys Phe Gly Asp Gln Lys Lys
 130 135 140

10

Phe Phe Gly Gly Asp Ile Ile Asn Ile Met Asp Ile Ala Phe Gly Ser
 145 150 155 160

15

Ile Phe Lys Ile Leu Val Val Ala Glu Asp Ile Leu Asp Ala Lys Val
 165 170 175

20

Leu Glu Asp Glu Lys Phe Pro His Leu His Ser Trp Tyr Asn Asn Phe
 180 185 190

25

Lys Asp Val Ala Val Ile Lys Glu Asn Leu Pro Asp His Glu Lys Met
 195 200 205

30

Val Ala Phe Ala Lys Phe Ile Arg Glu Lys Arg Leu Ala Cys Thr
 210 215 220

35

<210> 10
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Glicina max*

40

<400> 10

Met Ala Glu Arg Asp Leu Arg Leu Leu Gly Ala Trp Phe Ser Pro Phe
 1 5 10 15

45

Ala Leu Arg Val Gln Ile Ala Leu Asn Leu Lys Gly Leu Asp Tyr Glu
 20 25 30

50

Val Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Ser Glu Leu Leu Leu Lys Ser
 35 40 45

55

Asn Pro Val His Lys Lys Ile Pro Val Phe Phe His Gly Asp Lys Val
 50 55 60

60

Ile Cys Glu Ser Ala Ile Ile Val Glu Tyr Ile Asp Glu Val Trp Ser
 65 70 75 80

65

ES 2 316 382 T3

Asn Asn Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gln Asn Ala Tyr Asp Arg Ala Asn
 85 90 95

5
 Ala Arg Phe Trp Val Ser Tyr Ile Asp Asp Lys Trp Leu Thr Ser Leu
 100 105 110

10
 Lys Ser Val Leu Ala Thr Glu Asp Asp Glu Ala Lys Lys Leu His Phe
 115 120 125

15
 Glu Gln Ala Glu Glu Val Leu Glu Lys Val Glu Glu Val Phe Asn Lys
 130 135 140

20
 Cys Ser Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Gly Gly Asp Thr Ile Gly Phe Val
 145 150 155 160

25
 Asp Ile Gly Phe Gly Ser Phe Leu Ser Phe Ile Arg Val Ser Glu Asn
 165 170 175

30
 Met Asn Glu Arg Lys Leu Leu Asp Glu Thr Lys Tyr Pro Gly Leu Thr
 180 185 190

35
 Leu Trp Ala Glu Thr Phe Ala Ala Asp Pro Ala Val Lys Gly Leu Leu
 195 200 205

40
 Pro Glu Thr Glu Lys Leu Val Glu Phe Ala Lys Ile Leu Gln Leu Lys
 210 215 220

45
 Trp Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys
 225 230

<210> 11

50 <211> 885

<212> ADN

<213> *Glicina max*

55 <400> 11

ctgcaatgtc ttcaagtcag gaagagggtga ccccttttggg agttgtggga agcccatttc 60
 tacacagggt tcagattgct ctcaagttga agggagttga atacaaatat ttggaagacg 120
 60 atttgaacaa caagagtgat ttgctctcca agtataaccc agttfacaaa atgattccag 180
 tgcttgttca caatgagaag cccatttcag agtcccttgt gattgttgag tacattgatg 240
 acacatggaa aaacaatccc atcttgccct crgatcccta ccaagagacc ttggctcgtt 300
 65 tctgggctaa gttcattgat gacaagtgtg tggttcagc atggaaatct gcttttatga 360

ES 2 316 382 T3

```

    ctgatgagaa agagaaagag aaggctaaag aagagttatt tgaggctctg agtctctctg 420
    agaattgagtt gaagggcaag ttttttggtg gagaggagtt tggctttgtg gatattgctg 480
    ctgtgttaat acctataatt caagagatag cagggttcca attgttcaca aqtgagaaat 540
5    tcccaaagct ctctaaatgg agccaagact ttcacaacca tccagttgtc aacgaagtta 600
    tgcctcttaa ggatcaactt ttggcttatt tcaaggctcg ggtcaaaagc ttctgtgcta 660
    aaagaaagaa ttaabtatgt gagactcaga atttccatcg aggtttcagt attgtatgaa 720
10   atgaaagcta cttgtctatg tttctgtact gcggttctat ttctctctt caatgaatta 780
    tgtgatatag gatttctcca tgtcaaaaga tagttcaatt caatcaataa aataaaagaa 840
    tgagtcgtgt tagagcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 885

```

15

<210> 12

<211> 899

<212> ADN

20

<213> *Glicina max*

<400> 12

25

```

    atggcagagc aagacaaggt gatcctacac gggatgtggg ccagccctta tcccaagagg 60
    gtggaattgg cctttaattt taagggcata cctctgagt atgttgaaga agacttgaga 120
    aataagagtg atttgcctct aaagtacaac cctgttcaca agaaggtccc tgtacttgtt 180
30   cataatggaa aggcattgca tgaatccatg gtgatccttg agtatattga tgaaacatgg 240
    aaagatggtc ctaaactgct tccaaigtat tottacaaac gagcccaagc tggattctgg 300
    tgtcatttca tccaggatca gttaatggag agcaactttc tagtagtcaa aactgatgga 360
35   gaagcacaac aaaaggcnaa tgaccacgtg tatgagaaac tgaagtgtc agaagatgga 420
    atgaagacct atctgggaga aggcaatgct attatctctg gtgttgaaaa caactttgga 480
    atccttgaca ttgtcttttg tgctttatat ggtgcctaca aggtcctatga agaagttatt 540
    ggctcaagt tcatagtgcc agaaaagttt cctgtgttgt tttcttgggt gatggctatt 600
40   gctgaggttg aagctgtgaa aattgcaact cctccacatg aaaaaacagt gggcaattctt 660
    cagttgttca ggctgtctgc actgaaatct tctctgcca cagaatgata tatacttcaa 720
    cactttaata gactgtccat cgtttgcttc tctgtcagat ctttaatgta tgtatcttct 780
45   aataacagga tgagtaaac ctgagtatgt aaagcgtgat gatatagaga tatacctcta 840
    tatatcaaat actcttctat aaacacttct tctcttctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 899

```

50

<210> 13

<211> 840

<212> ADN

55

<213> *Glicina max*

<400> 13

60

```

    atggcagagg tgaagcttca tggattttgg tatagtcctt acactttgag ggtggtatgg 60
    accttaaagt taaaggatat accatatcaa aacatagaag aagaccgcta caataagagt 120
    cttcaacttc ttgaatacaa cccagtatac aagaaaactc cagtgttgt ccataatgga 180
65   aaacccttat gtgagtcctt gcttattgtt gaatacattg atgagatttg ggcacataat 240
    tcaactcttc ctgctgctcc ctacgagaga gctctggcaa ggttttgggt caaatatgct 300

```

ES 2 316 382 T3

```

gatgatgaca tgttttctgc agttattgca ttcttcttta gcaataatga tgaagagcga 360
gaaagagcga tagagaagat atgggagcat ctcaagggtg ttgagaacca gtgttttggg 420
gatcagaaga aatttttttg gggagacatt attaacatta tggacatagc ttttgggtcc 480
5 atattcmeta tctttgtggt tgcagaagat attctttagc cgaaggtctt ggaagatgag 540
aaattccctc acttgcattc atgggtataat aatttcaagg atgttgcagt tattaaagaa 600
aacctcccag accatgagaa aatgggtggt tttgctlaagt ttattagaga aaaaagtttg 660
10 gcatgtaact aagaaagtaa tcttatatga gatcaagtat gaatcaactt gtatctgtct 720
gaatcgtttt gttatgcttg tttctttagt ttccactcca ttattaggat gtcttgacat 780
atctgtgaaa gcaataaaa gttaatggga tgtactggat taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

```

```

15
<210> 14
<211> 918
<212> ADN
20 <213> Glicina max
<400> 14

```

```

25 cataaaactc cacatttctt gctgagtaac ctacacaaac aaacacaata ttgctccgtg 60
tttgacctgt tatagtaaac agtgatggct gaaagggact tgaggctttt ggggtccttg 120
ttcagtcctt ttgcccag ggtgcagatc gcccttaacc tcaagggttt ggattatgag 180
30 gttgttgaag agactttgaa tccccaaaagt gaattgcttc ttaagtccaa cctctgtgac 240
aagaaaatcc cagttttctt ccatggagat aaagtcatat gtgaatctgc aatcatagtl 300
gagtacatag atgaggtttg gtcacaacat gctctctcca tctttccaca aaatgcatat 360
35 gatcgagcta atgcccagatt ttgggtttct tacatcgatg acaagtggct taagtccttg 420
aaaagtgttc tagcgactga agatgatgag gcaagaagc tacaacttgn gcaagcggaa 480
gaagtgtctg agaaggtgga agaagtgttc aacaagtgca gtgaagggaa ggctatattc 540
40 ggaggagata cgattggatt tgttgacatt ggttttgaa gctttttgag tttcattaga 600
gtctcagaga atatgaatga aagaaaattg cttgatgaaa cgaagtacc ttggtttgac 660
ctatgggtgt aaacttttgc tgotgatctt gctgtgaag gcttctgccc agagactgaa 720
aagcttcttg agttttgaaa gatcttctag ctaaaatggg ctgctgcagc tcttgcaaa 780
45 taaatggaat caaattaatt gctggatgaa ttcaaaaat tgtttgtgaa gttatttata 840
ctgaggcta tgtttgttgc aactttatat attcaaaagt caaaataaat gttatgata 900
tatagtaaaa aaaaaaaaaa 918

```

```

50
<210> 15
<211> 26
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
60 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador
<400> 15

```

```

65 gcgaagochc armgagargg hggagg

```

26

ES 2 316 382 T3

<400> 19		
5	ccctctcaaac ccctgggtca acc	23
	<210> 20	
	<211> 31	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 20	
20	gcgctcggaga gttcgggtata cagtatctac c	31
	<210> 21	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
	<400> 21	
35	ccctctcaaac ccctgggtca acc	23
40	<210> 22	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 22	
	cgcggtacct ccatacaaaq aaaaatca	27
55	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador	

ES 2 316 382 T3

<400> 23

gagatctgca acaaacatag cctc

24

5

<210> 24

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

<400> 24

tacaccatgg ctgaaaggga cctg

24

20

<210> 25

25 <211> 2763

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de ácidos nucleicos derivada de SOJA P32110

<400> 25

35

```
ccatacaaac aatacataac taaataaactg taattttatg ttttctttca ttgtattgtg 60
cgttttttat taatgtatta attatgttgt ttttlaattt ttattgataa attattttaa 120
ctttaaataa aaaaacttta aagtaaacta taataaaaaa atatacaaca tgttttlaa 180
aattaaacat taaaataaaa taataacata taaaataaaa taacaaaaaa tataactaatg 240
aaatcaactt aatattattt attatatatt taaatatata ttttttaact tttttatttt 300
aaaaaataa aattgttaac attataaaat taaaaaaca aattatgaaa aaaaaggtra 360
acaaattaaa aacaaactac aaatagtaaa ataactttt taaaaaaaaa aggaggttac 420
gatctcaaaa tcgtataact catgaaattt taaaaaata agtaagacag ttttacaact 480
ttaaagtaat aaaacaaaa acgagtttt tttteatag actttaaagt cgtaaaaaaa 540
ttatatctac attgaagttg taaataatat ttttacgatt tcagttaaaa aataaagaaa 600
actaaaaagt cgtaataggt gctaacact gttacaactt aaccogttt agataatttt 660
ttaaataata ccccaaatga aaaattgagg attattttat cccaatttg taazaaagca 720
cctgaatact aqaacaagg gtggcaaga ttcaagtaa tgaatttata aaaaaaaaaa 780
gaaaatattt atataattac acaaaaactt aaaaaatggt gttattttt actactaatt 840
```

60

65

ES 2 316 382 T3

5 tataattcga atcgagtata ttaaggcaa agttctctac gcggtttacg taatctctta 900
 catcatttat ttttccacgt ttglttactc tgaggcatct tottgatagg ggaagtttt 960
 ttcatatttt ttctagatcc ttctcatgtg caatgtctcc gcattccatcc gcagcaatca 1020
 aaatggaaat aatcacaggc agcactttcc cacttttttg ttatcgtccc cactattgac 1080
 tatacccatg atatgtatat aggtatatct ttcttaathg attacgtatc tgcctgaatc 1140
 10 tagctagctc tgattcctag ctctataaaa ggagaatacc ataggaattc atcacagaca 1200
 aacaacaat ttaccagcta tacttgttcc ttttgaaggc tagaagtgcg acaatacaaa 1260
 caatggcagc tactcaggaa gatgtgaagc ttttgggtat tgtgggaagc ccaatttgcg 1320
 gcagggtcca gattgccttt aagltgaagg gagttgaata caaatttttg gaagaaaatt 1380
 15 tgggcaacaa gagtgtttg ctctcaaat acaaccctgt tcacaagaag gttccagctg 1440
 ttgttcacaa tgagcagccc atagcagagt ctcttctgat tgttgaatcc attgatgaga 1500
 catggaagaa caaccccatc ttaccctctg atccttacca aagagccttg gctcgtttct 1560
 20 ggtccaaatt cattgatgat aagctaaact aacatttcaa aaatcttctt agctttccatg 1620
 atttgcgctg atttgcagc aaaaacatcc gatgaaatct atatatgtga aatcttctctg 1680
 gtgtggaata tatatglgaa atctttgaat atgttagaga actcaaaagt caacagccaa 1740
 ccatgatttt ttttaatgt atcaactttt tgtaaaacaa tattagtgat ttgaaacttt 1800
 25 atggaatcat ataactatgat ttgggagaa attttatattt attttactat ttttatctgg 1860
 ggtgggggga ttctgcccag tatttgttcc tatataactc gatctaaatt ctgtttctcc 1920
 taatcacttt atgaaataat tactaataaa tatttctgatt tgcgaaatca gatttctgg 1980
 30 gctgtatcga aatctgtttt caccggtgat gagaagagc gtgagaagaa tcttgaagaa 2040
 acatattgag ctcttcagtt ttctgagaat gagctgaagg acaagaagtt ttttggagga 2100
 gaggaatttg ggttggtaga tattgctgct gctctcatag cactttggat cccaattttt 2160
 35 caggaatag cagggttga gtatttacc agtgagaat ttctatact ctacaaatgg 2220
 agccaagaat tccctaacca cctttttgtg caggaagctc ttctctctag agaccactt 2280
 tttgctact tcaagcccg ctatgaaagt cttctctgct caaaatagac ttatttaagg 2340
 atatttgttg aacaacttgt gtcttcttga gttattctct tctgaatttc atglaaaatg 2400
 40 atactagcta tatgtaaat ccagaaaaaa aaaaaaaga atcctaggat cttgtttctg 2460
 ttttggccat ttcagtatat aaagaaatta tatttttoga tataaatttt gttgtgaaaa 2520
 gctttattct tccctcataa aatccctcaa tgtgcataat cttattctga gagagactta 2580
 45 gagcggctag tagctactac ctgaaattt ttcttcaat tcaagagaca acgtatatat 2640
 tatataataa taattattgc aagttggaa tctgtgaagc atgtttctat actatatgag 2700
 ttaacaatat actctctctc ctctgcaacc tctcaggatt ctaaaattat tcccttggct 2760
 50 gca 2763

<210> 26

<211> 1137

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Fríjol mungo U20809

65

ES 2 316 382 T3

<400> 26

```

5   gaat taaagt gcttcgatgg gttcaagtca ggaagaagt accctctctgg aattattgga 60
   agcccatttg tttgcagggg gaagatagcc ctgaagttag agggagttag atacaaatac 120
   gttgaagaaa atttcogcaa caagagtga cagcttctga aatacaacc agttcacaag 180
   aaggtrccag tgtttgttca tggtgacaaa ccccttccag agtcccttgt gattggttag 240
10  tacatogatg agacatggaa caacaacccc atcttggctt ctgatcetta ccagagagcc 300
   tgggctcgtt cctggtcocaa attcatogal gacaagattg tgggtgcttc gtggaatct 360
   gttttcacag ttgatgagaa agagcgtgag aagaatattg cagaacata tgagagtctg 420
15  cagtttcttg agaatgagat aaaggagaag aagttctttg gaggagaaga gcttggcttg 480
   gtagatattg ctgctgtcta tghagcattt tggatccctt tgattcaaga aatagcagga 540
   ttggagttaa tgacaagtga gaaattccct aatctctaca ggtggagcca agaatttttg 600
   aacctccaa ttgtcaaaaga aagtcttccc cctagagacc cagtttttgc ctttttcaaa 660
20  ggagcctatg aaggcccttt ttcttcgaaa tagatttcat gttgtgagag atttagaatt 720
   talaaggaaa attgtgttga gtacttagtt aggatttggg ttcaaaatta tggttgaagt 780
   tgaatcctag gatttgccca tgtcaaaaca ataacctggg atgttctgtg ttgatatttt 840
25  actatttcaa tcaataaatt atgcagcttc ttaccgagtt aacattogat cgaataaagg 900
   accaacaaga ttaagtaagg ctgcattatt tgtctttttg ttaaatnaga tattagtatg 960
   cccccaaaag tgagtatttc cttacagaag ctttttaaac attaagtagt taattccata 1020
30  ggtotaccat tatagctcaa gttatataca tattatgggt gccattctct actcaacaat 1080
   tatgactata aaatcttctg gttatnattg cacgaacaag tgaactatct caattca 1137

```

35 <210> 27

<211> 2038

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Tabaco Q03663

45 <400> 27

```

   ctgcaggalt tcaaaactota gottcactaa aadttgagct ttcttttcca ctaatgtoga 60
50  aaaacgaaat aaacataagc tatttcaaaa aaataaaaaa atactccatt tgaatctaaa 120
   gtcaagtcgt gattgggata agaaaataga aatttattta tactccagat caagccqtsa 180
   ttggaatgag ataatagaaa agtatgatag tacatgagta acatcaagtt ggaattaag 240
55  ggaaggaaat tagaqaaga actgaagaat atocaaatat tctttacgtc caaatttgat 300
   agttatttaa cgtcatcgag atgaaggcca tgttcaagtt tccacaaat attgagaaa 360
   gaaagaagaa gacacaaact ggtttggta ttattatagt tttttctttt agagaattga 420
60  ttgtacatat aagaaatata atataagatt tagaaataag attattagaa aaatcaaca 480
   tcaaagtatt caatttaaat tctttttcca atggacatto ccattctgaa aaaaaagaga 540
   tataaatatg gaagtaaaaa ttaatcagat cgttaaatgt agaaatatt aattaacaca 600
   ttaaccataa ccagctctact ttatttaaca aaaagcacat ctgaratarc aaaaaagigt 660
65  ttaacttcat gcattgacaa tttaaaatta ttltgcaaca tgggtaaaa ctattttaca 720

```

ES 2 316 382 T3

```

acaattgqta actgcatata taagtttaal atggtaacct agaaaatagg ataaattatc 780
tataacagga tatattacat tgatattacc atgtcaaaaa atttagtaag tacatgaata 840
atcacctgga aatcttcaag atttctccta taaataacct tggtagtaaa tctagctctt 900
ccattcaaga tacaacattt ctctatagc caagggattt gttctatttt caccaattgoc 960
tccatttctt ctgtctctca cacttctctt attcttagta atalcccact cttgcccgtgc 1020
ccaaaattct caacaagact atttggatgc ccataacaca gctctgtcag atgttaggtgt 1080
agaacctttg aactgggacg accaggtagc agcctatggg caaaattatg cttcccaatt 1140
ggctgcagat tgaacctctg tacattctca tggtaacac ggcgaaaacc tagctgaggg 1200
aagtggcgat tccatgacgg ctgctaaggg tgttgagatg tgggtogatg agaaacagta 1260
ttatgaccat gactcaata ctgtgcaca aggacagggt tgtggacact atactcaggt 1320
ggtttggcgt aactcggctc gtgttgatg tgcctagcgt cagtgtaca atggagaata 1380
tgttctctct tgaactatg atctccagg taattataga ggcgaaagt cactactaatt 1440
gaaacgacct acgtccattt caagttaata tgtatggatt gttctgcttg atatcaaga 1500
cttaataeat tgcctcaaaa agcaacttaa agtcaagtat atagtaatag tactatattt 1560
gtaactctct gaagtggatc tataaanaa caagtggctc ataattaagg ggaaaaatat 1620
gagttgatga ttagcttgat gtatgatctg atattattat gaacactttt gtactcctac 1680
gaatcatgtg ttgatggct agctacttgc gatattacga gcaaaattct taactacatg 1740
ccttaggaac aagcttacac agttcctata atctactaga gggccaaaaa catgaaaatt 1800
accaatttag atggtaggag gatattgaaa gtggagcagc tagttttaa aactgaccgt 1860
tagctttaa attgacggta taaaaatatt tacataatca ggtcatttat aaggttaatta 1920
taggtaataa tttatgacga attctcaata gtaactgaa aaaaaattgt aactaaccta 1980
ttatactaaa actactataa tgggttagat tacattaatc atgtcattag aagatctt 2038

```

35 <210> 28

<211> 2796

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de ácidos nucleicos derivada de Papa P32111

45 <400> 28

```

aagcttacat tcaacgtgtt gctgcttcaa aataagggtc tttaaaaaat ttaaaaaata 60
taaagaagaa ttttgaattt tataattaaa gccgtcagaa aggacttgac ctttgaagcc 120
aacccaactc aatattagaa aatcaaaaaat tttagtgcct tcatttataa asaaaaaaa 180
aattactttat gcagttcttg aacctcttgt gagacgagag ggaattgctc ggatggtaag 240
cacccttcac ttcaaccccg aaggttgcga gtttgagtca ccaacgcagc aaaaagggtta 300
ggagctccta gaaagggtaa aaaaaaaaaa aaaaattaat aaaaaatac cctttatgaa 360
atttctcatt ccgctactgc actctctccc tgatcttctt cgtgttttca atttattaatt 420
ctatattcat gacacctgt gatgtttctc tgggtagtcc taaaaataga ggtattgaaa 480
attatgttqt ttctctctgg ctatattact ttcttctgtt actttattgt attcctattt 540
gttaattttt ggcttcggtt tataacatgt tattagcaca aaactttaat catatcaggt 600

```

65

ES 2 316 382 T3

	Laaacttttca	atTTTTgcttca	tcaacgtaaa	agacaagata	tgtgatcggc	atgrataact	660
	atgtttttaa	taggtataat	acataaatat	ttcctttaat	tttatctcat	tttatattta	720
5	tgtcgtttta	ctttggagcg	tacaagtgtc	tacttgtgat	ccagttaggt	atcaaagctg	780
	gcattgcttag	ttttactttc	caaattgaaa	tttatattag	aattgaattc	aggaagaatt	840
	ttgttaggtc	aactaaatta	tatatatata	tataaaaaaa	taaaaattat	tagaccgctc	900
	gactattttac	ttactttaaa	atttgaattt	tctgtcgaat	aaaattcttt	gtcagagaaa	960
10	agtcttttag	ctattcacat	gctaggaagt	ttcacttttg	gtggatcagt	gattgtatat	1020
	tatttaatat	atatcaattt	tctcatcaaa	ctgaaaatga	aaqataaaat	taattattaaa	1080
	aactccattc	attttaattt	attgtcatgt	tttgacttga	tccaaaattc	aaqaatttaa	1140
15	aaaggttttaa	atTTTTgtgc	ttttttttta	attaaaaata	tgtcaaatat	attaaaaat	1200
	attttrtaaa	ttttatacta	aaaaacatgt	caatgaata	tttgaattta	taaaatttat	1260
	aaaaataaaa	aaagaatatt	tctttaacaa	attaaaaatg	aaaatatgat	aaataaatta	1320
	aactatctca	tcattgattt	tcttagccac	cagattctgc	caaaccagtg	gtgacatgag	1380
20	ccataagctc	atctttattg	tattttatta	ctcactccaa	aaatatagg	aatatgttta	1440
	ctacttaatt	tagtcaata	taattttata	ttagaataat	tgaatagtca	aaqaagaac	1500
	tttaattgat	ccttattttt	tctctataaa	aaaaaagct	agacaccaag	ggagaccaac	1560
25	caacataaat	taagatggca	gaagtgaagt	tgtttgctc	aaagtatagt	ccttttagcc	1620
	atagagttga	atgggctcta	aaaattaagg	cagtgaata	tgaatttata	gaggaagatt	1680
	tacaaaaata	gagcccttta	cttcttcaat	ctaactcaat	tcacaagaaa	attccagtgt	1740
	taattcacia	tggcaagtgc	atTTgtgagt	ctatggctat	tcttgaatac	attgatgggg	1800
30	catttgaagg	cccttccatt	ttgcctaaag	acccttatga	tggccttta	gcacgatttt	1860
	gggctaaata	cgtcgaagat	aaggatattt	gcttttaagt	tattccaatt	gattgaaaag	1920
	tttgttttag	ttacgttatt	acataacttt	taggtctcat	gctttttaat	aatcttttat	1980
35	aaaattcgac	taagacgaac	ttctcgtata	gtcaacaata	ctaacatatt	tgtctagtag	2040
	ttggttagga	aaataagttat	cogaatatta	aattctggat	aagtaatgaa	taccatattt	2100
	gatagttgat	ttggagataa	attattcgtg	tataaaatta	atatgatatt	tgatttgcaa	2160
40	tttagaata	cataactatt	tttatatgat	agatccatta	taactaattg	atatattatt	2220
	aatatctgta	taactotaac	cagctatoga	aacgagtcaa	cgaaccttat	taagttttgt	2280
	ttgttggcca	gggggcagca	gtgtggaaaa	gtttcttttc	gaaaggagag	gaacaagaga	2340
	aagctaaaga	ggaagcttat	gagatgntga	aaattcttga	taatgagttc	aaggccaaga	2400
45	agtcttttgt	tgggtgacaaa	tttggatttg	ctgatattgt	tgc aaatggt	gcagcacttt	2460
	atTTggcaat	tcttgaagaa	gtatctggaa	ttgttttggc	aaqaagtgaa	aaatttccaa	2520
	atTTttgtgc	ttggagagat	gaatattgca	caaaaaacga	ggaatatttt	ccttcaagag	2580
50	atgaattgct	tatcgtttac	cgagcctaca	ttcagcctgt	tgatgcttca	aaatgagtat	2640
	acctcaagtg	aaTTtcaaga	ttttgtgtgg	caataaaaaat	tgaqTTTTtg	taaaTTcaat	2700
	tgaatatata	taaagttgca	tgttataaga	tttatcttta	tttcaactagt	taataraaat	2760
55	tttggattca	cgtataaata	aaagtattgt	taagag			2796

<210> 29

<211> 1289

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Arabidopsis P46421

ES 2 316 382 T3

<400> 29

```

5      aagtcaaggt acacatgctc cagggataag gcaaggttag gaattaggac acatctccc 60
      ttactaaaa agagataaaa aaaaattgta tagggaacgt tataaatatg ttgtaaagtc 120
      aacatctggt tcctctctaga ctcttcgcat ttacatcaca ctgcccacca tataaaaagg 180
      caaagttcgt cgtcgtttta tcacaagacc atcaacacca taaggctata aatccaagct 240
10     aaaaggtagt gattaactcc acaaaaccag aaaaactaca ttctaacat ategaagaaa 300
      cagagaaaa gagagagaga cccctaattg ctgagaaaga agaagtgaag cttttgggga 360
      tatgggagag ccccttttag cgtcgggtcg agatggctct caaactcaaa ggcanaccgt 420
      acgagtacgt ggaagagata ctggagaaca aaagcccttt gcttcttggc cttaacccta 480
15     ttcaacaaga agtccctggt cttgtccaca atggttaaac cattctcgag tctcatgtga 540
      ttcttgaata catcgatgag acttggccac aaaatccaat tctccctcaa gatccttatg 600
      aaagatccaa agctcgttbc ttgtctaac tgcctgatga acaggtaat gaattgggtc 660
20     aaaattgcat gtcaataat aaacaattgg ttctgctttg ttaatttata aaacaagtaa 720
      tttctatta acattagcga ttatatgtct ctgtcattgt agattatgaa cgtggggtt 780
      atatcaatgg caagagcaga cgaqaaagga agagaagttt tagccgagca ggtaagagaa 840
      ctgattatgt atctcgagaa agaacttgtc ggaaaagatt acttcggagg caagactgtc 900
25     ggattcttgg actttgtcgc cggaaagtta attccgtttt gtttggagag aggttgggaa 960
      ggaataggat tggaaagtgt tacagaggag aagtttccag agttcaagag atgggttagg 1020
      aatttggaga aggttgagat tgttaagat tgtgttccac caagagagga acatgtagaa 1080
30     cacatgaact atatgqcaga gagagtgaga tcttcttaag aaaacaatc atgtttagtt 1140
      cttgatcatg caatgtttgt atggttatgt tgttgtttat tttattgaat atctttgtat 1200
      gttgtgtggt tgagaagtga ggttttatca tcactctcca cgttatctta ttgggtccca 1260
      gccactattt agaattaatg gtaaaqctt 1289
35

```

<210> 30

<211> 1339

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia genómica de Arabidopsis

50

55

60

65

ES 2 316 382 T3

<400> 30

```

5   gaattaattc ttgacgaagc atggggttgt ctccagaaaa tqaalggatc aagtcaaggt 60
   acacatgctc cagggataag gcaaggttag gaattaggac acatctccac ttactaaaaa 120
   agagataaaa aaaaattgta tagggaaogt tataaatatg ttgtaaagtc aacatctgtt 180
   tcctcttaga ctcttcgcat ttacatcaca ctggcgacca tataaaaagg caaagttcgt 240
10  cgtcgtttta tcacaagacc atcaacacca taaggctata aatccaagct aaaaggtagt 300

```

```

   gattaactcc acaaaaccag aaaaactaca tttctaecat atagaagaaa cagagaaaaa 360
15  gagagagaga cccctaattg cggagaaaga agaagtgaag cttttgggga tatggggag 420
   ccccttttagc cgtcgggtcg agatggctct caaactcaaa ggcatatcgt accagttagt 480
   ggaagagata ctggagaaca aaagcccttt gcttcttgcct cttaacctta tcacaagaa 540
20  agtccctggt cttgtccaca atggtaaaac cttctcagag tctcatgtga ttcttgaata 600
   catcgatcag acttggccac aaatccaat tctccctcaa gatccttatg aaagatccaa 660
   agctcgtttc ttgcctaac tcctcagatga acaggttaatt gaattcgttc aaaattgcat 720
   gtcaaaataat aaacaattgg tctcgtttg ttaatttatc aaacaagtaa ttttctatta 780
25  acattagcga ttatatgtct ctgtcattgt agattatgaa cgtggggttt atatcaatgg 840
   caagagcaga cgagaaagga agagaagctt tagccagca ggtaaagayaa ctgattatgt 900
   atctcgagaa agaacttgtc gcaaaagatt acttcggagg caagactgtc ggattcttgg 960
30  acrttgtcgc cggaaagttt atcccgcttt gtttggagag aggttgggaa ggaataggat 1020
   tggaaagtgt tacagaggag aagtttccag agttcaagag atgggttagg aatttggaga 1080
   aggttgagat tgttaaagat tgtgtccac caagagagga acatgtagaa cacatgaact 1140
35  atatggcaga gagagtgaga tcttcttaag aaaacaaac atgtttagtt ctgcatcatg 1200
   caatgthtgt atggttatgt tgtgtttat tttattgaat atctttgtat gttgtgtcgt 1260
   cgagaagtga ggttttatca tcactctca cgttatctta tttgggtcca gccactatct 1320
40  agaantaatg gtaaagctt

```

<210> 31

<211> 968

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Papaya AJ000923

55

60

65

ES 2 316 382 T3

<400> 31

```

tagaactagt ggatcccccg ggctgcagga atthggcaag agagatttta tcttttagga 60
gctccqtttt acaacaatgg cggacgaggt tgtctctttg gatttctggc caagcccttt 120
5  tggaatgaga atcagaatcg ctctagccga gaagggtatt cactacgagt acaaggaaga 180
gaatctgaga aacaagagtc ccttactcct gcagatgaac ccggtacaca agaaaatccc 240
ggttctcctc cacaatggta aaccocatctg tgagtctttg atccagatcc agtacataga 300
10  tgaggtatgg agcgacaagg ctctctctgt tccctctgat ccttatcaga gagctcaagc 360
caggttctgg gctgactatg ttgacaagaa gatgtatgaa gctgggagga gagtttggac 420
gactaaaggq gaagaacagg agggggccaa gaaagagttc atagaaatct tgaagacttt 480
15  ggagggagaa cttggggaga agccttattt tgggtgggaa agttttgggt atgtggattt 540
gactctttatc ccattctaca cttggttcag tgtgtatgaa agttttggga agatgagcat 600
agaggcagaa tgccccagt tgtttagttg ggtgaaaagg tgtttggaga aggagagtgt 660
20  ttcaaaatct ctgctctatc aagetaaggt atccggcttc gttttggaac tcaggaaggc 720
tcttgggatt tgagtttttt gagagacttc aaaatccttg ttccatttc attagggttc 780
gtcttccaag tattgattaa aaaaggttct ggatcaacta ctttatttct ctagtctttt 840
actgttgtat tggataaag ggggtgctct ttgtggatta ggtgagattt ctatcaaat 900
25  tgtggtgacg tcaatttctt gtgtgttcta ggcaatcat atttgaataa aatctttctt 960
tcattctgt                                     968

```

<210> 32

30 <211> 1040

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Abeto AF051214

<400> 32

```

gaaaagacag atacatagaa agtttagagac agttaceata ctttttcaga gcaatcgcga 60
tgagggctct tggagaagag gcgcaagtga agctgttggg tgggaatata agtccctttg 120
45  tgctgggggt ccgtatagca ctgtctctta aagggatcga ttacgagttc atcgaagaga 180
acargcaaaa taagagccat ctgctgctgc aatcgaacc tcgtaacaag aagattccag 240
tgctcattca caatggaaag cctgtttgtg agtccatgat tatttggcag tacatagacg 300
aggcatggga ccggaaggcg ccagttctaa tgccaaaaga tctttatgan cgagncartg 360
50  cccgcttctg ggtgcccctt gttagacgata agctgctgcc atgcccctcg ggagttttca 420
agggccaggg agagcagcaa cagaaagcgt tggagaatc gggggcaagc tttcttttac 480
tggaggagcc tctccgaacg agccactgct tctcgggaaa accgtatttc ggaaggagatg 540
agatcggctt tcttgacatc gcattgggtg gtatgttagc atttgtcaaa gccctcgaga 600
55  agtttactaa tttagtttta atagaccagq agaagatgcc gctgttaagc acatggatga 660
atcagttctg tgaggccgat ggagtgaag acgttatgcc ggatccggcc aagttgcagg 720
aatttatatc cgcctatcaga gtcagattta catcaccacc tgetgccaat taggggaagc 780
60  cattcggcca ttaaattgat gttatcgtcc gcattgtttt tggttttatg ctgtcagttt 840
gaatgttgtt atgctttttg aattgttggg gtttaattgg aataattcta tgcgccatc 900
tagcacctgt tgattcgtta tcagtttctc ccgtgttcca tgtaacttcg atttcatgat 960
65  tttggagat agaacaaaa ttcatggaaa tctctgttag tgttttatat ttgaaaaggg 1020
ttggatttgc agagaatgga                                     1040

```

ES 2 316 382 T3

<210> 33

<211> 902

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Trigo AF004358

10

<400> 33

```
15  ggcacgaggc aagcacaagc agctaaagca atctcagtgg tcttcaaaac acacacacac 60
    acactgacac acatcgatcg aggtagttag aqatggccgg aggagatgac ctgaagctgc 120
    tcggcgcatg gccaaagcca tttgttacca ggggtgaagct ggcgctcgcc ctgaagggcc 180
    tgagctacga ggacgtggag gaggacctgt acsagaagag tgagcttctc ctcaagtcca 240
20  acccggtgca caagaagata ccggtgctca tccacaacgg agcccgggtc tgcgagtcca 300
    tgatcattct ccagtacatc gacgaagtgt tggccagcac cggcccgtcc ctctctccag 360
    cggaccccba ccagcccgcc attgctcgct tctgggtggc ttacgttgac gacaagctgg 420
25  taqccccatg gaggcagtgg ttgaggggca agacagagga ggagaaatcc gagggaaaga 480
    agcagggcgt cgcgcgggtg ggggtcctcg aaggggcctt gagggagtgc tccaaggcag 540
    gggccttctt cggtgccgac ggcgtcgggc tcttcgacgt tggcctggga ggcgtgctct 600
30  cgtggatgaa ggtgacccag ggcgtgtctg gtgacaagat tttcgagccc gccaaagactc 660
    cgtcctctgg ccgatgggtg gagcgttca ttgagctcga cggggccaag gcccccctgc 720
    cggacgtggg caggctgctt gagtctgcca aggcacgaga ggcctgocgt gcagcgtcca 780
35  agtgagccgc cagcacatat ccagaataat taaaaattgt tatttlaaat gttgtttgtt 840
    cggctgcttg atgtaataat gtagtaactg atgicgtcca tttaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
    aa 902
```

40

<210> 34

<211> 1127

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Abeto AF051238

50

55

60

65

ES 2 316 382 T3

<400> 34

```

5      gagacatata actcacaggc aaaaaaatat tcaattacaa tacattttcc gtgcaatggc 60
      gacggaggct tgtggagaaa aggggcaagt gcagctgcta ggtgggagtc tgagttcctt 120
      cgtgctgogg gttcgcatag cacttgcctt taaaggcctc gattaccagt tcatogaaga 180
      gaacatgcaa aataggagcc agctgctgct gcaatcaaac cctgttcaca ggaagattcc 240
10     agtgcttata cacaatggaa agcccgtttg tgaatccatg attattgtgc agtacatoga 300
      tgaggcatgg gacactaagg cacccaatct tatgcccata gatccatag acctagccat 360
      tgcccgcttc tgggctgctt ttgtagacga taagctcgtt ccattgtatgc ggagagtttt 420
15     cgctggccat ggcgagcagc tacagaaaga agcggaaagt ctggttaca actttcattt 480
      gatagaggaa gctctgcgaa ccaacagctg ctctcagga aaagcgtatt ttggagggga 540
      taagataggg ttgcttgaca tgcattggg tggtatgttg gcggttctca aaggcctcga 600
      gaaggctacc gataccgtta taatagatcc ggagaagatg ccgttgctga gcgcattgat 660
20     ggaccgatct tgtcaatcca atggagtga agaagtatg ccggtccgg ccaagcagct 720
      ggaatctcta tcagctagga gagccagact tgcattccct gctggcaatt agggcaagcc 780
      atgtcggcct tataactga ggalagacag atggattata aacttattat tcgtagtact 840
25     tctcctctta ttcattggtt cagcttcagc gttttaattc ttgctgtttt atgtgaataa 900
      gtctgaataa tgtttgggtg aatctcgcct gtactatagc tggcattcac ctgtttattg 960
      tacgctgatt tagttgaac aagttttggt gaatctcccc tgtactgaag ctggcattcc 1020
30     cctgttcaat gtgcctgat ttagtctgaa taagtttttg atgaatctcg ctgttactgt 1080
      agctatgtgc gatgattttt aatgcaatag aaacgagaat gaaatgc 1127

```

35 <210> 35

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador

45 <400> 35

gagagaggat cctcagattt tttttttttt tttt

34

50

<210> 36

<211> 234

<212> PRT

55

<213> *Glicina max*

60

65

ES 2 316 382 T3

<400> 36

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

ES 2 316 382 T3

<210> 37

<211> 222

<212> PRT

5 <213> *Glicina max*

<400> 37

10 Met Ala Ser Ser Gln Glu Glu Val Thr Leu Leu Gly Val Val Gly Ser
1 5 10 15

15 Pro Phe Leu His Arg Val Gln Ile Ala Leu Lys Leu Lys Gly Val Glu
20 25 30

20 Tyr Lys Tyr Leu Glu Asp Asp Leu Asn Asn Lys Ser Asp Leu Leu Leu
35 40 45

25 Lys Tyr Asn Pro Val Tyr Lys Met Ile Pro Val Leu Val His Asn Glu
50 55 60

30 Lys Pro Ile Ser Glu Ser Leu Val Ile Val Glu Tyr Ile Asp Asp Thr
65 70 75 80

35 Trp Lys Asn Asn Pro Ile Leu Pro Ser Asp Pro Tyr Gln Arg Ala Leu
85 90 95

40 Ala Arg Phe Trp Ala Lys Phe Ile Asp Asp Lys Cys Val Val Pro Ala
100 105 110

45 Trp Lys Ser Ala Phe Met Thr Asp Glu Lys Glu Lys Glu Lys Ala Lys
115 120 125

50 Glu Glu Leu Phe Glu Ala Leu Ser Phe Leu Glu Asn Glu Leu Lys Gly
130 135 140

55 Lys Phe Phe Gly Gly Glu Glu Phe Gly Phe Val Asp Ile Ala Ala Val
145 150 155 160

60 Leu Ile Pro Ile Ile Gln Glu Ile Ala Gly Leu Gln Leu Phe Thr Ser
165 170 175

65 Glu Lys Phe Pro Lys Leu Ser Lys Trp Ser Gln Asp Phe His Asn His
180 185 190

70 Pro Val Val Asn Glu Val Met Pro Pro Lys Asp Gln Leu Phe Ala Tyr
195 200 205

75 Phe Lys Ala Arg Ala Gln Ser Phe Val Ala Lys Arg Lys Asn
210 215 220

ES 2 316 382 T3

<210> 38

<211> 895

<212> ADN

5 <213> *Glicina max*

<400> 38

```

10      cacaaactttg ccccccttcta aaactttotta ttgtgatgtc taaaagcga gacttgaagc 60
      ttttgggagg ctggttcagc ccatttgccc tgaggggtca gattgccctt aacctcaagg 120
      gtcctagaata tgaggttctt gaagagacct tgaatcccaa aegtgacctg ctctctaagt 180
      ccaaccctgt gcacaagaaa atcccagttt tcttccatgg agataaagtc atttgtgaat 240
15      ctgcaatcat agttgagtao attgatgagg cttggactaa tgttccctcc atccttccac 300
      aaaatgctta tgatcgtgct aatgctcgat tttggtttgc ctacattgat gagaagtggc 360
      ttacgtcctt gagaagtgtt ctagtggctg aagatgatga ggcaaagaag ccacactttg 420
20      agcaagcaga agaagggtct gagaggttgg aagaagtgtt caacaagtac agtgaaggga 480
      aggcctatct cggaggagat agcattggat tcattgacat tggttttggg agcttcttga 540
      gttggatgag agtcatagag gagatgagtg gaageaaatt gcttgatgaa aagaagcacc 600
25      ctggtttgac ccaatgggct gaaccytltg ctgctgaccc tgcgtgnaag ggcattcttc 660

      cagagactga taagcttctt gactttgcca agattcttca gctaaaatgg actgctgcag 720
      cagctgcagc tgcaaaqtaa atggaatcaa attaatgag agagtatctt caaaattgtt 780
30      gtccaagtgg tctccatctc aggcctatgtt gttgcaactt tatttattta aaagtattct 840
      taaatttaaa atgtaaaata ttaagaaagt ttaagtaagt tggttgaaa atctt 895

```

35 <210> 39

<211> 895

<212> ADN

40 <213> *Glicina max*

<400> 39

```

45      aaataagtat ctctgtagtt gcataagtca agagaagaag tgaagtggct gcaatggctt 60
      caagtcaagg agaggtgacc cttttgggag ttgtgggaag cccatttcta cacagggttc 120
      agatctctct caagttgaag gcagttgaat acaaatattt ggaagacgat ttgaacaaca 180
      agagtgattt gctcctcaag tataaccag tttacaaaat gattccagtg ctgtttcaca 240
50      atgagaagcc catttcagag tcccttctga ttgttgagta cattgatgac acatggaaaa 300
      acaatcccat cttgccctct gatccctacc aaagagcctt ggctcgttct tgggctaagt 360
      tcattgatga caagtgtgtg gttccagcat ggaatctgc ttttatgact gatgagaaaag 420
      agaaagagaa ggctaaagaa gacttatttg aggtctgag ttttcttgag aatgagttga 480
55      agcccasgtt ttttggggga gaggagtctg gctttgtgga tattgctgct gtgtkaatac 540
      ctataattca agagatagca gggttgcaat tgctcacaag tgagaaattc ccaagctct 600
      ctaaatggag ccaagaactt cacaaccatc cagttgtcaa cgaagttatg cctcctaagg 660
60      atcaactttt tgccatttct aaggctcggg ctcaaaqctt cgttgctaaa agaaagaatt 720
      aatctagtga gactcagaat tcccatcgag gttccagtat tgtatgaaat gaaagctact 780
      tgtctatggt tcttatttgc ggttctatct tcatttttca atgaattatg tgatatagga 840
65      tttctccatg tcaaaagata gttcaattca atcaataaaa taaacgaatg agcgg 895

```

ES 2 316 382 T3

<210> 40

<211> 977

<212> ADN

5 <213> *Glicina max*

<400> 40

10 ctgattcccg gctcaataag aggagaatag ctttaggaatc cataagaaac attaatccac 60
 cactatagtt gttctggttag aagtgctaca aacaadaatg gctgctaato aggaagatgt 120
 gaagcctttg ggagctactg gaagcccatt tgtgtgcagg gttcagattg cctcaagtt 180
 gaagggggtt caatacaaat ttttggaaga aaatttgagg aacaagagtg aactgcctct 240
 15 caaatccaac ccagttcaca agaaggttcc agtgtttatt cacaatgaga agcccatagc 300
 agagtctctt gtgattgttg aatagattga tgagacatgg agagaacacc ccatcttggc 360
 ttctgatcct taccaaagag ccttggctcg tttctggctc aaattcattg atgacaagg 420
 tgtgggtgct gcatggaaat atatttatac tgttgatgag aaagagcgtg agaagaatgt 480
 20 tgaagagtca tatgaggctc tgcagtttct tgagaatgag ctgaaggaca agaagttttt 540
 tggaggagag gaaattgggt tggtagatat tgcctgctgc ttcatagcct tttggatccc 600
 tataattcaa gaagtattgg gtttgaagtt attcacaagt gagaaatttc ctaagctcta 660
 25 caaatggagc caagagttca tcaaccacc tgttgcataa caagtccttc ctcttagaga 720
 tcaacttttt gccttctaca aagcctgcca tgaagttctt tctgcttcaa aatagactta 780
 ttttaaggata gttgtgtgaa ctactggtct ctcatcttgg agttattgca gtttgaattt 840
 30 catgtcaatt tggttttata tgaatttag taacctggga tatctcccat ggagaaaata 900
 atccttggat cttgtttcca ttttggccat ttcagttaat aaagaatttc attttttcca 960
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 977

35 <210> 41

<211> 1006

<212> ADN

40 <213> *Glicina max*

<400> 41

45 atagtgtctg aatggcttca agtcaggagg aggtgaccct tttgggagct actggaagcc 60
 catttgtgtg cagggttcat attgcccaca agttgaaggg agttcaatac aaatatgtcg 120
 aagaaaattt gaggaacaag agtgaactgc ttctcaaatc caaccagtt cacaagaagg 180
 ttccagtggt tattcacaat gagaagccca tagcagagtc tottgtgatt gttgaataca 240
 50 ttgatgagac atggaaqaac aaccccatct tgcctctgca tccctaccaaa agagccttgg 300
 ctggtttctg gtccaaattc attgatgata aggtttttgg tgcctgcatg aaatccggtt 360
 tcacagctga tgagaaagag cgtgagaaga atgttgagga agcaattgac ctctgcagtt 420
 tcttgagaat gagataaagg acaagaagtt ctttggagga gaggagattg ggttggtaga 480
 55 tattgctgct gtctacatag cattttgggt cccatggtt caagaaattg cagggttgga 540
 gttattcaca agtgagaaat ttccaaagct ccacaattgg agccaagaat ttttgaacca 600
 tccaattgtc aaagaaagtc tgcoccttag agatcctgtt tctctctttt tcaagggctc 660
 ctargaaagc ctttttgggt caaaatagat ttgatgatgt ggtgtgagac ttagtatttc 720
 60 taagaattat gtgtttggtt aaggcttcta tgaagccctc actgcttcaa aatagattca 780
 tgtatgtgag actcagaatc tctggggaaa attgtgtgtg gttgtgactc ctctgtttgt 840
 ttgtcattga gctatatcgc tgttaattag gatttctgtt caaaatgatg ctLabaagtt 900
 gtaatctagg atttctccct tugaatcct aggttctctc tgacatttgc tatttcaaaag 960
 65 aataaabata tagcatcttt ctatttttca aaaaaaaaaa aaaaaa 1006

ES 2 316 382 T3

<210> 42

<211> 885

<212> ADN

5 <213> *Glicina max*

<400> 42

```

10      ccacagcaat ggcagagcaa gacaagggtga tccacacacgg gatgtgggoc agcccttatg 60
      ccaagaggggt ggaattggcc cttaatttta agggcatacc ctatgaglat gttgaagaag 120
      acttgagaaa taagagtgat ttgcttctaa agtacaaccc tgttcacaag aagggttcctg 180
15      tacttgctca taatggaaaag gccattgctg aatccatggt gatccttgag tatattgatg 240
      aaacatggaa agatggctct aaactgcttc caagtgattc ttacaaacga gcccaagctc 300

      gattctgggtg tcatttcctc caggatcagt taatggagag cacttttcta glagtcaaaa 360
20      ctgatggaga agcacaacaa aaggccattg accacgtgta tgagaaactg aaagtgcctag 420
      aagatggaat gaagacctat ctgggagaag gcaatgctat tatctctggt gttgaaaaca 480
      actttggaat ccttgacatt gtgtttgtg ctcttatatgg tgcctacaag gctcatgaa 540
25      aagtatttgg cctcaagttc atagtgccag aaaagtttcc tgtgttgtt tcttggttga 600
      tggctattgc tgaggttgaa gctgtgaaaa ttgcaactcc tccacatgaa aaaacagttg 660
      gaattcttca gttgttcagg ctgtctgca tgaatcttc tctgcccaca gaatgatata 720
      tactcaaca ctttaalaga ctgtccatcg ttgcttctt ctgagagct ctagtgtatg 780
30      cctctctcaa taacaggatg agtaacacct gagtatgtaa accgtgatga tatagagata 840
      tccctctata tatcaaatac tcttctataa aaaaaaaaaa aaaaaa 885
  
```

<210> 43

35 <211> 991

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <400> 43

```

      ctgctgcctt tcttataaag gccaaaatca caaaccacac cctaacaat tcatcttatt 60
45      ttgcaacaca attcaatttt gagcacttac caacaccact tccaatgggt tcatatcatg 120
      aagaagaagt gaggtctattg ggcaagtggg ccagcccatt tagcaacaga gtagaccttg 180
      ctctcaagct caaggggtgt cctacaat actccgagga agatcttgcct aacaagagtg 240
      ctgatcttct caagtacaac ccgctcaca ageaggttcc ggttttggtc cacaatggga 300
50      acccattgcc cgaqtcactc atcattgttg aatacataga tgagaagtgg aaaaataacc 360
      cactattgoc tcaagacca tatgaaagag ccttggtctg tttttggtct aagaccttag 420
      atgacaagat cttgccagct atatggaatg cttgctggag tgacgagaat gggcctgaga 480
55      aagcagtggg ggaagccttg gaagcattga aaatcctaca ggaaacactg aaagacaaga 540
      aattcttttg aggagagagc ataggattgg tagatattgc tgccaatttc attgggtatt 600
      gggctgccc attgcaagag attgcagggt tggagttgct caccattgag aaatttccca 660
      agttatataa ttggagtcaa gactttatca accaccctgt gatcaaggag ggtctgctc 720
60      ctgagatgga attgtttgct tcttcaaaag cttctgctaa aaagtagaac catcttagag 780
      gtaggattca taataagtta ghatgatctt gttgggaaac aattatcttg ttgtgagcaa 840
      aggatgttcc tgttttaaat ttaattgact gtgatctggt tgggtatttg ctattttaat 900
65      ttttaactaaa aaaagtgttc agttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 960
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 991
  
```