

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 774**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**A01H 1/00** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A23L 1/0522** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04737522 .5**  
96 Fecha de presentación: **30.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1649022**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **TRIGO CON ACTIVIDAD DE ENZIMA RAMIFICANTE Y ALMIDÓN ALTERADOS Y PRODUCTOS QUE CONTIENEN ALMIDÓN DERIVADOS DEL MISMO.**

30 Prioridad:  
**30.06.2003 US 484169 P**  
**01.07.2003 US 484360 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.12.2011**

73 Titular/es:  
**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH ORGANISATION  
LIMESTONE AVENUE  
CAMPBELL, ACT 2612, AU y  
LIMAGRAIN CEREALES INGREDIENTS SA**

72 Inventor/es:  
**REGINA, Ahmed;**  
**RAHMAN, Sadequr;**  
**MORELL, Matthew, Kennedy y**  
**LI, Zhongyi**

74 Agente: **Curell Aguila, Marcelino**

ES 2 369 774 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Trigo con actividad de enzima ramificante y almidón alterados y productos que contienen almidón derivados del mismo.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una planta del trigo que presenta un grano de almidón con un contenido de amilosa relativamente elevado. Asimismo, la invención se refiere al trigo con una actividad reducida de enzima Ila ramificador del almidón (SBEIIa) en el endospermo y a los procedimientos para obtener estas plantas. La invención se refiere asimismo al grano y al almidón y a los productos alimenticios y no alimenticios obtenidos a partir de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

En los cereales, el almidón constituye aproximadamente 45% a 65% del peso del grano maduro. El almidón está compuesto de dos tipos de molécula: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal compuesta de cadenas glucosídicas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4, mientras que la amilopectina es muy ramificada, con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 que unen cadenas lineales.

La síntesis del almidón en el endospermo de las plantas superiores la realiza un conjunto de enzimas que cataliza cuatro etapas clave. En primer lugar, la ADP-glucosa pirofosforilasa activa el monómero precursor del almidón a través de la síntesis de la ADP-glucosa a partir de G-1-P y ATP. En segundo lugar, el donador glucosilo activo, la ADP-glucosa, es transferida al extremo no reductor de un enlace  $\alpha$ -1,4 preexistente por almidón sintasas. En tercer lugar, los enzimas ramificadores del almidón introducen puntos de ramificación mediante el corte de una región de glucano unido con enlaces  $\alpha$ -1,4, seguido de la transferencia de la cadena cortada a una cadena aceptora, formando un nuevo enlace  $\alpha$ -1,6. Los enzimas ramificadores del almidón son los únicos enzimas que pueden introducir enlaces  $\alpha$ -1,6 en los  $\alpha$ -poliglucanos y, por lo tanto, desempeñan un papel esencial en la formación de la amilopectina. Finalmente, los enzimas desramificadores del almidón eliminan algunos de los enlaces de ramas, aunque todavía no se ha determinado cuál es el mecanismo mediante el que actúan (Myers *et al.*, 2000).

Aunque resulta claro que resultan necesarias por lo menos dichas cuatro actividades para la síntesis normal del gránulo de almidón en las plantas superiores, se encuentran múltiples isoformas de cada una de las cuatro actividades en el endospermo de las plantas superiores y se han propuesto funciones específicas para las isoformas individuales basándose en el análisis mutacional (Wang *et al.*, 1998; Buleon *et al.*, 1998) o mediante la modificación de los niveles de expresión génica utilizando enfoques transgénicos (Abel *et al.*, 1996; Jobling *et al.*, 1999; Schwall *et al.*, 2000). Sin embargo, las contribuciones exactas de cada isoforma de cada actividad a la biosíntesis del almidón todavía no se conocen, y no se conoce si estas contribuciones difieren marcadamente entre especies. En el endospermo del cereal, se encuentran presentes dos isoformas de la ADP-glucosa pirofosforilasa, una forma dentro del amiloplasto, y una forma en el citoplasma (Denyer *et al.*, 1996; Thorbjornsen *et al.*, 1996). Cada forma está compuesta de dos tipos de subunidad. Los mutantes *shrunken* (*sh2*) y *brittle* (*bt2*) en el maíz representan lesiones en las subunidades grande y pequeña, respectivamente (Giroux y Hannah, 1994). Se encuentran cuatro clases de almidón sintasa en el endospermo del cereal, una isoforma localizada exclusivamente dentro del gránulo de almidón, la almidón sintasa unida al gránulo (GBSS), dos formas que se distribuyen entre el gránulo y la fracción soluble (SSI, Li *et al.*, 1999a; SSII, Li *et al.*, 1999b) y una cuarta forma que se encuentra enteramente localizada en la fracción soluble, SSIII (Cao *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1999b; Li *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la GBSS resulta esencial para la síntesis de la amilosa (Shure *et al.*, 1983), y las mutaciones en SSII y en SSIII se ha demostrado que alteran la estructura de la amilopectina (Gao *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1998). No se han descrito mutaciones que definan un papel para la actividad de SSI.

Se expresan tres formas de enzima ramificador en el endospermo del cereal, el enzima ramificador I (SBEI), el enzima ramificador Ila (SBEIIa) y el enzima ramificador IIb (SBEIIb) (Hedman y Boyer, 1982; Boyer y Preiss, 1978; Mizuno *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1997). Se han caracterizado secuencias genómicas y de ADNc para el arroz (Nakamura y Yamanouchi, 1992), el maíz (Baba *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1997) y el trigo (Repellin *et al.*, 1997; Nair *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 1997). La alineación de secuencias revela un grado elevado de similitud de secuencias a nivel tanto de nucleótidos como de aminoácidos y permite el agrupamiento en las clases SBEI, SBEIIa y SBEIIb. Las clases SBEIIa y SBEIIb generalmente muestran una identidad de secuencia de aproximadamente 80%, particularmente en las regiones centrales de los genes. SBEIIa y SBEIIb también pueden distinguirse por sus patrones de expresión. SBEIIb generalmente se expresa específicamente en el endospermo, mientras que SBEIIa se encuentra presente en todos los tejidos de la planta.

En el endospermo del trigo, se encuentra SBEI (Morell *et al.*, 1997) exclusivamente en la fracción soluble, mientras que SBEIIa y SBEIIb se encuentran en las fracciones tanto soluble como asociada al gránulo de almidón (Rahman *et al.*, 1995). En el maíz y el arroz se ha demostrado que los fenotipos de amilosa elevada resultan de lesiones en el gen *SBEIIb*, también conocido como el gen extensor de amilosa (*ae*) (Boyer y Preiss, 1981; Mizuno *et al.*, 1993; Nishi *et al.*, 2001). En estos mutantes de *SBEIIb*, los granos de almidón del endospermo mostraban una morfología

anormal, el contenido de amilosa se encontraba significativamente elevado y la frecuencia de ramificación de la amilopectina residual se encontraba reducida y la proporción de cadenas cortas (<DP17, especialmente DP8-12) era más baja. Además, la temperatura de gelatinización del almidón se encontraba incrementada. Además, existía un reservorio significativo de material que se definió como "intermedio" entre la amilosa y la amilopectina (Boyer *et al.*, 1980; Takeda *et al.*, 1993b). En contraste, plantas del maíz mutantes del gen *SBEIIa* debido a un elemento de inserción mutador (Mu) y que en consecuencia carecían de expresión de la proteína SBEIIa no podían distinguirse de las plantas de tipo salvaje en la ramificación del almidón del endospermo (Blauth *et al.*, 2001), aunque presentaban alteraciones en el almidón de las hojas. De manera similar, las plantas del arroz deficientes en actividad de SBEIIa no mostraban ningún cambio significativo en el perfil de la cadena de amilopectina en el endospermo (Nakamura, 2002). Tanto en el maíz como en el arroz, los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* no se encuentran ligados en el genoma.

En el maíz, la mutación *dull1* reduce el contenido de almidón e incrementa los niveles de amilosa en el endospermo, dependiendo el grado del cambio del fondo genético, e incrementó el grado de ramificación en la amilopectina restante (Shannon y Garwood, 1984). El gen correspondiente a la mutación se identificó y se aisló mediante una estrategia de etiquetado con trasposones utilizando el mutador trasposón (Mu), y se demostró que codificaba el enzima denominado almidón sintasa II (SSII) (GAo *et al.*, 1998). El enzima se reconoce entonces como un miembro de la familia SSIII en los cereales (Li *et al.*, 2003). El endospermo mutante presentaba niveles reducidos de actividad de SBEIIa asociados a la mutación *dull1*. No se ha informado de ninguna mutación correspondiente en otros cereales. No se conoce si estos resultados son relevantes a otros cereales, por ejemplo al trigo.

El documento WO nº 94/09144 propone la utilización de genes de sentido y antisentido para alterar las proporciones naturales de la almidón sintasa (SS) y SBE en el maíz. Sin embargo, no se proporcionan datos que apoyen las estrategias moleculares propuestas y no se sugiere la reducción específica de la actividad de SBEIIa.

En la patata, la regulación negativa de *SBEI* por sí sola provoca efectos mínimos sobre la estructura del almidón (Filipse *et al.*, 1996), aunque trabajos posteriores han identificado algunos cambios cualitativos (Safford *et al.*, 1998). Sin embargo, en la patata, la regulación negativa de *SBEII* y *SBEI* en combinación incrementaron el contenido relativo de amilosa en mucho mayor grado que la regulación negativa de únicamente *SBEII* (Schwall *et al.*, 2000).

En las plantas superiores se encuentran dos tipos de enzima desramificador, definidos basándose en sus especificidades de sustrato: los enzimas desramificadores de tipo isoamilasa y los enzimas desramificadores de tipo pululanasa (Myers *et al.*, 2000). Las mutaciones Sugary-1 en el maíz y en el arroz se asocian a una deficiencia en ambos tipos de enzima desramificador (James *et al.*, 1995; Kubo *et al.*, 1999). Sin embargo, la mutación causal se localiza en el mismo sitio que el gen del enzima desramificador de tipo isoamilasa. Los genes representativos de la biosíntesis del almidón que han sido clonados a partir de cereales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes de enzima ramificador del almidón caracterizados a partir de cereales.

Especie	Isoforma de SBE	Tipo de clon	Nº de acceso	Referencia
Maíz	SBEI	ADNc	U17897	Fisher <i>et al.</i> , 1995
		Genómico	AF072724	Kim <i>et al.</i> , 1998a
	SBEIIb	ADNc	L08065	Fisher <i>et al.</i> , 1993
		Genómico	AF072725	Kim <i>et al.</i> , 1998
Trigo	SBEIIa	ADNc	U65948	Gao <i>et al.</i> , 1997
	SBEII	ADNc	Y11282	Nair <i>et al.</i> , 1997
	SBEI	ADNc y genómico	AJ237897 (gen SBEI)	Baga <i>et al.</i> , 1999
			AF002821 (pseudogén SBEI)	Rahman <i>et al.</i> , 1997
			AF076680 (gen SBEI)	Rahman <i>et al.</i> , 1999
			AF076679 (ADNc de SBEI)	
	SBEI	ADNc	Y12320	Repellin <i>et al.</i> , 1997
SBEIIa	ADNc y genómico	AF338432 (ADNc)	Rahman <i>et al.</i> , 2001	
		AF338431 (gen)		
Arroz	SBEIIb	ADNc y genómico		Documento WO nº 01/62934
		ADNc		Documento WO nº 00/15810
	SBEI	ADNc	D10752	Nakamura y Yamanouchi, 1992
	SBEI	Genómico	D10838	Kawasaki <i>et al.</i> , 1993
	RBE3	ADNc	D16201	Mizumo <i>et al.</i> , 1993
Cebada	SBEIIa y SBEIIb	ADNc y genómico	AF064563 (gen SBEIIb)	Sun <i>et al.</i> , 1998
			AF064561 (ADNc de SBEIIb)	
			AF064562 (gen SBEIIa)	
			AF064560 (ADNc de SBEIIa)	

El almidón es muy utilizado en las industrias alimenticia, papelera y química. La estructura química del almidón puede presentar un impacto importante sobre las propiedades nutricionales y de manipulación del almidón para productos alimenticios o no alimenticios o industriales. Determinadas características pueden utilizarse como indicación de la estructura del almidón, incluyendo la distribución de longitudes de cadena de la amilopectina, el grado y tipo de cristalinidad y propiedades tales como la temperatura de gelatinización, la viscosidad y el volumen de hinchado. Los cambios de longitud de la cadena de la amilopectina pueden indicar una cristalinidad, gelatinización o retrogradación alteradas de la amilopectina.

La composición del almidón, en particular la forma denominada almidón resistente que podría asociarse al contenido elevado de amilosa, presenta importantes implicaciones para la salud intestinal, en particular la salud del intestino grueso. De acuerdo con lo anterior, se han desarrollado almidones ricos en amilosa en determinados cereales tales como el maíz para la utilización en alimentos como medio de incrementar la salud intestinal. Los efectos beneficiosos del almidón resistente resultan de la provisión de un nutriente al intestino grueso en el que la microflora intestinal recibe una fuente energética que fermenta para formar, entre otros, ácidos grasos de cadena corta. Estos ácidos grasos de cadena corta proporcionan nutrientes para los colonocitos, incrementan la incorporación de determinados nutrientes a través del intestino grueso e incrementan la actividad fisiológica del colon. Generalmente, en el caso de que no se proporcionen almidones resistentes u otra fibra dietética, metabólicamente el colon es relativamente inactivo.

Aunque pueden utilizarse almidones modificados químicamente o de otro modo en alimentos que proporcionan funcionalidad no proporcionada normalmente por fuentes no modificadas, dichos procesamiento presenta una tendencia a alterar otros componentes o a percibirse como indeseable debido a los procedimientos implicados en la modificación. Por lo tanto, resulta preferido proporcionar fuentes de constituyentes que puedan utilizarse en forma no modificada en alimentos.

Se produce más trigo en el mundo cada año que cualquier otro cultivo de cereal. La variabilidad conocida en la estructura del almidón del trigo se limita a la variabilidad disponible en el maíz o en el arroz, en parte debido a que la eficiencia de transformación del trigo se ha incrementado más lentamente que la de otros cereales, y debido a la naturaleza hexaploide del trigo panificable. La presencia de tres genomas en *Triticum aestivum* presenta un efecto tamponador, al enmascarar mutaciones en los genomas individuales, en contraste con las mutaciones más fácilmente identificadas en las especies diploides. Los mutantes en *SBEIIb*, correspondientes a los fenotipos de extensor de amilosa en el maíz o en el arroz, no han sido caracterizados en el trigo. El fenotipo conferido por las mutaciones de *SBEIIa* o de *SBEIIb* en el trigo no es conocido. Son mutantes conocidos los del gen *waxy* (GBSS, Zhao y Sharp, 1998) y un mutante que carece completamente de la proteína SGP-1 (Yamamori *et al.*, 2000), que se produjo cruzando líneas que no presentaban las formas específicas de genoma A, B y D de la proteína SGP-1 (SSII) sometidas a ensayo mediante electroforesis de proteínas. El examen de las semillas sin SSII demostró que la mutación resultaba en alteraciones en la estructura de la amilopectina, en gránulos de almidón deformados y en un contenido relativo de amilosa elevado hasta aproximadamente 30% a 37% del almidón, lo que era un incremento de aproximadamente 8% respecto al nivel de tipo salvaje (Yamamori *et al.*, 2000). Se midió la amilosa mediante colorimetría, titulación amperométrica (ambas para la unión de yodo) y un procedimiento con concanavalina A. El almidón del mutante sin SSII mostraba una temperatura de gelatinización reducida en comparación con el almidón de una planta no mutante equivalente. Se redujo el contenido de almidón del 60% en el tipo salvaje hasta menos del 50% en el grano sin SSII.

El documento WO n° 99/14314 describe el aislamiento de un gen *SBEIIa* de *Aegilops tauschii*, una planta diploide relacionada con el trigo, pero no produjo trigo con almidón alterado.

El documento WO n° 00/15810 describe la clonación de ADNc de un gen *SBEIIb* del trigo. No obtuvieron plantas del trigo con niveles alterados de amilosa y no proporcionan ninguna enseñanza de trigo que presente almidón que comprenda por lo menos 50% de amilosa.

El documento WO n° 01/62934 también describe un gen *SBEIIb* del trigo y propone introducir inhibidores de la actividad del enzima ramificador en una planta del trigo, pero no proporciona ninguna enseñanza de trigo que presente almidón que comprenda por lo menos 50% de amilosa.

El documento WO n° 01/32886 caracterizó un ADNc codificante de una forma de SBEI en el endospermo del trigo. Se encontró que el polipéptido codificado se asociaba preferentemente a los gránulos de almidón de tipo A. No suprimía la actividad de SBEI ni mostraba una morfología alterada del gránulo de almidón ni un nivel elevado de amilosa en el trigo.

Por lo tanto, no se conoce trigo que presente almidón con una proporción de amilosa superior a aproximadamente 50%. Aunque se conocen variedades de maíz y de cebada ricas en amilosa, los productos de estos cereales presentan desventajas en comparación con un trigo de contenido muy alto en amilosa para productos en los que el trigo es el cereal preferido, por ejemplo en pan, pasta o fideos.

Aunque los almidones con niveles elevados de amilosa de dichos tipos resultan útiles, un almidón de trigo con un contenido más alto de amilosa resulta preferido, en particular en el caso de que se encuentre asociado con una síntesis mejorada del almidón y otras características, por ejemplo una menor necesidad de modificación posterior a la cosecha. Dichos productos de almidón también son relativamente resistentes a la digestión y proporcionan un mayor beneficio para la salud.

### Parte general

En la totalidad de la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, el término "comprende" y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende", se entiende que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. La presente invención no debe considerarse limitada en su alcance a las formas de realización específicas descritas en la presente memoria, que se proporcionan meramente con fines de ejemplificación. Los productos funcionalmente equivalentes, composiciones y procedimientos se encuentran claramente comprendidos dentro del alcance de la invención, tal como se describe en la presente memoria.

Los datos bibliográficos de las publicaciones a las que hacen referencia en la presente memoria se recogen al final de la descripción. La referencia en la presente memoria a la técnica anterior, incluyendo cualquier documento o documentos de la técnica anterior, no debe considerarse un reconocimiento, o sugerencia, de que dicha técnica anterior es conocimiento general común en Australia o que forma una parte del conocimiento general común en Australia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "derivado de" debe considerarse que indica que un número entero particular o grupo de números enteros se ha originado a partir de la especie indicada, pero que no ha sido obtenido necesariamente de modo directo a partir de la fuente indicada.

La designación de residuos nucleótidos a la que se hace referencia en la presente memoria es la recomendada por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, en la que A representa adenina, C representa citosina, G representa guanina y T representa timidina.

### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un grano obtenido a partir de una planta de trigo en la que la proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 50%, comprendiendo dicho grano un nivel reducido de la proteína SBEIIa, actividad enzimática de SBEIIa o ambas en el endospermo respecto al grano de tipo salvaje, y que comprende una variación genética que conduce a una reducción del nivel de expresión génica de SBEIIa, de la actividad enzimática de SBEIIa en el endospermo o ambas respecto al grano de tipo salvaje, comprendiendo la variación genética una mutación de un gen *SBEIIa* o un ácido nucleico introducido que codifica un inhibidor del gen *SBEIIa*, en el que dicho inhibidor es una molécula antisentido, cosupresora, ribozima o dúplex de ARN que presenta como diana el gen *SBEIIa*. La planta del trigo puede presentar preferentemente un nivel reducido de expresión génica o actividad enzimática de tanto SBEIIa como SBEIIb, o ambos. Además, el grano puede comprender una variación genética similar en *SBEI*. El grano adicionalmente puede comprender un nivel alterado de proteína y/o de actividad enzimática seleccionada de entre el grupo que consiste de ADP glucosa pirofosforilasa, GBSS, SSI, SSII, SSIII, un enzima desramificador del tipo isoamilasa y un enzima desramificador del tipo pululanasa. El grano puede comprender un transgén que codifique una molécula antisentido, cosupresora, ribozima o dúplex de ARN. El transgén preferentemente conduce a un nivel reducido de expresión de ARNm codificante de SBEIIa. El grano puede comprender una mutación en un gen *SBEIIa* y en una forma es una mutación nula del gen *SBEIIa* en por lo menos un genoma y puede ser una mutación nula en dos o tres de los genomas. La proporción de amilosa en el almidón del grano puede ser de por lo menos 50%, 55%, 60%, 70% ó 80%. En otra forma, por lo menos 50% de los gránulos de almidón dentro del grano presentan una apariencia no birrefringente al observarlos bajo luz polarizada. El grano puede ser no arrugado, y puede presentar un peso medio de por lo menos 36 ó 40 mg. En una forma alternativa, el contenido de almidón del grano en estado desnudo es de por lo menos 25% (p/p) o de por lo menos 35% (p/p), y puede ser de por lo menos 90% del contenido de almidón del grano de tipo salvaje. El grano puede ser grano entero, grano descascarillado, molido, partido, laminado, perlado, triturado o precocido.

En otra forma, el primer aspecto de la exposición proporciona un grano obtenido a partir de una planta de trigo, comprendiendo el grano almidón y una variación genética que conduce a una reducción del nivel de expresión del gen *SBEIIa*, de la actividad enzimática de SBEIIa en el endospermo o a ambas, respecto al grano de tipo salvaje, comprendiendo dicha variación genética una mutación de un gen *SBEIIa* o un ácido nucleico introducido que codifica un inhibidor de la expresión del gen *SBEIIa*, en el que la proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 30%.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un producto molido derivado de grano del primer aspecto, que comprende de manera no limitativa harina, harina integral, sémola o almidón obtenido a partir del grano de la invención, o productos alimenticios que incorporan dicha harina, harina integral, sémola o almidón, o productos laminados, en copos o extruidos del grano. El producto puede incluir harina, harina integral, sémola o almidón

obtenidos del grano del primer aspecto de la invención mezclado con harina, harina integral, sémola o almidón de otra fuente.

5 En un tercer aspecto, la invención proporciona gránulos de almidón o almidón obtenido a partir de grano de la planta del trigo del primer aspecto. En una forma específico del tercer aspecto, la planta del trigo además presenta un nivel reducido de actividad enzimática de SBEIIa en el endospermo.

10 En un cuarto aspecto, la exposición podría considerarse que radica en una composición que comprende el almidón según el tercer aspecto de la invención y un ingrediente alimenticio o agua. Este aspecto incluye alimentos y composiciones no alimenticias y mezclas del almidón con otros almidones o productos que contienen almidón.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición que comprende gránulos de almidón del cuarto aspecto de la invención mencionado anteriormente, y otro ingrediente alimenticio o agua.

15 En un sexto aspecto, la invención proporciona una planta del trigo que puede utilizarse para producir el grano o los gránulos de almidón o el almidón de los aspectos anteriores. La planta del trigo puede ser transgénica o no transgénica, al igual que el grano que produce.

20 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta del trigo capaz de producir grano, comprendiendo las etapas siguientes: (i) introducir una variación genética en una planta del trigo madre o semilla, conduciendo dicha variación genética a una reducción del nivel de expresión del gen *SBEIIa*, de la actividad enzimática de SBEIIa en el endospermo, o ambos, respecto al grano de tipo salvaje, comprendiendo la introducción de un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la expresión del gen *SBEIIa* en una célula regenerable de trigo y la regeneración de una planta del trigo transgénica a partir de la célula transformada, en la que dicho  
25 inhibidor es una molécula antisentido, cosupresora, ribozima o dúplex de ARN que presenta como diana el gen *SBEIIa*, e ii) identificar una planta progenie o semilla de la planta del trigo madre o semilla que presenta un nivel reducido de expresión del gen *SBEIIa*, de actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o ambos, respecto a la planta o semilla de tipo salvaje, en el que el grano comprende almidón, en el que la proporción de amilosa en el almidón del grano es por lo menos de 50%.

30 En una cuarta forma del séptimo aspecto, la exposición proporciona un procedimiento de producción de una planta del trigo que presenta un contenido relativo de amilosa en el almidón de su grano de por lo menos 50%, preferentemente presentando una actividad reducida del enzima SBEIIa en el endospermo, comprendiendo el procedimiento: a) identificar una planta o grano del trigo que presenta una actividad reducida de SBEIIa expresada a partir del genoma A, B o D del trigo, y b) cruzar dicha planta del trigo o una planta del trigo producido a partir del grano de la etapa a), con una segunda planta del trigo que presenta una actividad reducida de SBEIIa, o c) cruzar una planta que presenta una actividad reducida del enzima SBEIIa con una planta que presenta una actividad reducida del enzima SBEIIb, e identificar una planta del trigo que presente una actividad reducida de tanto SBEIIa como de SBEIIb. Preferentemente, la planta del séptimo aspecto es *Triticum aestivum* ssp. *aestivum*.

35 40 En un octavo aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparar almidón alterado, que comprende alterar una planta mediante los procedimientos definidos anteriormente y extraer el almidón que presenta propiedades alteradas.

45 En un noveno aspecto, la exposición proporciona un procedimiento para identificar una planta o semilla del trigo para una mutación en un gen *SBEIIa*, o un gen *SBEIIb*, que comprende las etapas de cribar una población de plantas o semillas del trigo con un marcador molecular ligado al gen *SBEIIb*, o al gen *SBEIIa*, respectivamente, del trigo, e identificar la planta o semilla basándose en la presencia o ausencia del marcador molecular ligado.

50 En una segunda forma del noveno aspecto, la exposición proporciona un procedimiento para identificar una planta o semilla del trigo para una mutación en un gen *SBEIIa*, o en un gen *SBEIIb*, que comprende las etapas de cribar una población de plantas o semillas del trigo con un anticuerpo que es específico para la proteína SBEIIb, o para la proteína SBEIIa, del trigo, e identificar la planta o semilla basándose en la presencia o ausencia de la unión de anticuerpos.

55 En un décimo aspecto, la invención proporciona un grano de la invención obtenido a partir de una planta del trigo, que comprende una mutación en la que el gen *SBEIIa* se encuentra ausente del brazo largo del cromosoma 2A o en el que el gen *SBEIIa* en el brazo largo del cromosoma 2A comprende una mutación que conduce a una proteína SBEIIa reducida, una actividad reducida del enzima SBEIIa, o a ambos, en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje. La mutación puede ser una mutación nula del gen *SBEIIa* o puede ser una deleción de por lo menos parte del gen *SBEIIa*. El grano puede comprender además una mutación en la que el gen *SBEIIb* se encuentra ausente del brazo largo del cromosoma 2A o en el que el gen *SBEIIb* en el brazo largo del cromosoma 2A comprenda una mutación que conduzca a una proteína SBEIIb reducida, una actividad reducida del enzima SBEIIb, o a ambos, en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje. La deleción podría interrumpir la expresión de tanto el gen *SBEIIa* como el gen *SBEIIb* en el brazo largo del cromosoma 2A.  
60  
65

La planta puede ser una planta de trigo Durum que puede comprender además una variación genética que conduzca una actividad reducida de enzima ramificador del almidón codificado por el gen *SBEIIa* en el brazo largo del cromosoma 2B respecto al grano de tipo salvaje. La variación genética adicional puede comprender la ausencia del gen *SBEIIa* del brazo largo del cromosoma 2B o una mutación del gen *SBEIIa* del brazo largo del cromosoma 2B que conduzca a una actividad reducida del enzima SBEIIa en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje.

La planta puede ser *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* que adicionalmente puede comprender una variación genética que conduzca a una actividad reducida de enzima ramificador del almidón codificado por el gen *SBEIIa* en el brazo o brazos largos del cromosoma 2B, del cromosoma 2D o de ambos cromosomas, respecto al grano de tipo salvaje. La variación genética adicional comprende una ausencia del gen *SBEIIa* de por lo menos uno de dichos cromosomas o una mutación del gen *SBEIIa* de por lo menos uno de dichos cromosomas que conduzca a una actividad reducida del enzima SBEIIa en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje.

La planta puede presentar el ácido nucleico introducido que codifica el inhibidor de la expresión, actividad o ambas del gen *SBEIIa*. El nivel de actividad del enzima SBEIIa puede reducir en por lo menos el 40% respecto al grano de tipo salvaje. La proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 50%. El grano puede ser no arrugado y puede presentar un peso medio de por lo menos aproximadamente 36 mg. Por lo menos 50% de los gránulos de almidón del grano pueden presentar una apariencia birrefringente observados bajo luz polarizada. El contenido de almidón del grano en estado desnudo, en una forma de la invención, es de por lo menos 25% (p/p) o presenta un contenido de almidón que es por lo menos 90% del contenido de almidón del grano de tipo salvaje.

La amilopectina del grano de cualquiera de las formas de la presente invención puede presentar una proporción reducida de la fracción de longitud de cadena de 4 a 12 dp respecto a la amilopectina del grano de tipo salvaje, según la medición realizada después de la desramificación de la amilopectina por parte de la isoamilasa.

El grano puede comprender además un nivel reducido de la proteína SBEI, de actividad del enzima SBEI o ambos, y puede comprender además un nivel alterado de un enzima respecto al grano de tipo salvaje, en el que dicho enzima se selecciona de entre el grupo que consiste de ADP glucosa pirofosforilasa, GBSS, SSI, SSII, SSIII, un enzima desramificador de tipo isoamilasa, un enzima desramificador de tipo pululanasa y cualquier combinación de los mismos.

Las formas de dicho décimo aspecto de la invención comprenden grano, gránulos de almidón extraídos del grano, y un producto producido a partir del grano o su almidón, tal como, por ejemplo, harina, harina integral o sémola.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Secuencia del gen ramificador Star Branching Enzyme IIa (wSBE II-D1) [SEC ID nº 1] de *A. tauschii*, correspondiente al gen *SBEIIa* del genoma D del trigo hexaploide (*T. aestivum*).

Figura 2. Secuencia génica parcial de SBEIIb del trigo (wbe2b genómico) [SEC ID nº 2] de *T. aestivum*.

Figura 3. Esquema de los constructos de dúplex de ARN. El orden de los elementos génicos utilizados fue: promotor, secuencia del gen SBEIIa o SBEIIb (exones 1, 2 y 3) en orientación de sentido, intrón (intrón 3), secuencia del gen *SBEIIa* o *SBEIIb* (exones 1, 2, 3 y 4) en orientación antisentido y secuencia de terminador de transcripción/poliadenilación. B. El transcrito de los genes *SBEIIa*-ds y *SBEIIb*-ds forma una estructura de ARN de "horquilla" con una región de doble cadena formada mediante hibridación entre las secuencias de sentido y antisentido. La secuencia del intrón limitada por los nucleótidos GT y AG se desempalmó y se extrajo.

Figura 4. Gránulos de almidón vistos a través de un microscopio óptico, procedentes de: A) una semilla de trigo con gránulos de almidón de tipo salvaje procedentes de la línea transgénica 83.1b de SBEIIa-ds, B) una semilla de trigo con gránulos de almidón distorsionados procedentes de la línea transgénica 50.1b de SBEIIa-ds.

Figura 5. Birrefringencia de gránulos de almidón de una semilla de trigo, tal como en la figura 4, visualizada bajo luz polarizada.

Figura 6. Comparación entre las secuencias parciales de ADNc de *SBEIIa*. sbe9 corresponde a parte de AF338432.1. Se muestran secuencias parciales de las siguientes: Y11282 [SEC ID nº 3], sr997 [SEC ID nº 4], sr995 [SEC ID nº 5] y sbe9 [SEC ID nº 6].

Figura 7. Comparación de PILEUP de secuencias parciales de SBEIIa de trigo basadas en los primeros 63 aminoácidos. Se indica la probable localización genómica de los genes correspondientes a los clones.

- Figura 8. Comparación entre las secuencias de aminoácidos deducidas del polipéptido del genoma D (sr854) [SEC ID nº 7] y el producto del genoma A o B (y11282) [SEC ID nº 8]. La secuencia de tránsito (posiciones 1 a 54) se presenta en cursiva.
- 5 Figura 9. Amplificación por PCR de una región de intrón 3 del gen *SBEIIb* de diversos números de acceso de trigo (carriles 1 a 11) utilizando los cebadores ARA19F y ARA23R seguido de la digestión con *Rsa*I. Las bandas correspondientes a los genomas A, B y D se indican con flechas. El carril 3 (Aus17340) y el carril 5 (Aus10103) no presentan el marcador específico del genoma D, mientras que el carril 8 (Aus12509) y el carril 9 (Aus12565) no presentan el marcador del genoma B.
- 10 Figura 10. Hibridación southern de ADN digerido con *Hind*III de números de acceso de trigo utilizando una sonda de la región del intrón 3 de *SBEIIb*. Los carriles corresponden a: 1) Aus12565, 2) Aus12509, 3) Aus10103, 4) CSDT2DL-4, 5) Aus12530 (trigo Durum), 6) CSDT2BL-9, 7) Aus6323, 8) CSDT2DS, 9) Aus17340, 10) Aus12745, 11) CSDT2DL-4, 12) *Aegilops tauschii*.
- 15 Figura 11. Cribado de la población F2 del cruce Aus17340a X Aus12509 mediante amplificación por PCR de la región del intrón 3 de *SBEIIb* utilizando los cebadores AR2b19cF y AR2b23cR seguido de la digestión con *Rsa*I. El carril 8 no presentaba ni el marcador del genoma B ni el del genoma D, de manera que la línea BD54 representa una línea doble nulo BD.
- 20 Figura 12. Hibridación southern de clones BAC digeridos con *Hind*III (carriles 1 a 4) y con *Eco*RI (carriles 5 a 8) utilizando una sonda de la región del intrón 3 de *SBEIIb*. Los carriles corresponden a: 1) BAC 4, 2) BAC 5, 3) BAC 9, 4) BAC 12, 5) BAC 4, 6) BAC 5, 7) BAC 9, 8) BAC 12.
- 25 Figura 13. A) FISH utilizando una sonda wSBEII-DA1 y una sonda de secuencia repetida de ADN (pSc 119.2) de cromosomas de *A. tauschii* (fotografía principal e inserción inferior) y cromosomas del trigo (inserción superior). B) FISH de sonda de *SBEIIb* de cromosomas del trigo.
- 30 Figura 14. Análisis de SDS-PAGE de proteínas unidas a gránulo en líneas de trigo Chinese Spring (CS) de tipo salvaje y nula para SGP-1 en varios estadios de desarrollo de las semillas (10, 15 y 25 días después de la antesis, M=madura), según se indica. Se midió la intensidad de las bandas de proteínas de la imagen del gel teñido con plata. Se normalizó a 100 la intensidad de las bandas de GBSS en semillas CS maduras y la cantidad de los demás enzimas en el estadio del desarrollo indicado se expresa como porcentaje de GBSS en CS maduras. a) GBSS, b) SSI, c) *SBEII*. Las columnas negras se refieren a nulo para SGP-1. Se muestra un electroforetograma en gel ejemplificativo para las proteínas unidas a gránulo procedentes de las líneas CS y nula para SGP-1.
- 35 Figura 15. Cantidades relativas de *SBEIIa* y *SBEIIb* en la fracción soluble. Se escanearon los filtros inmunológicos del SDS-PAGE y se midió la intensidad de las bandas de proteínas de las imágenes. Se evaluaron las cantidades de proteínas a partir de las proteínas de fusión de *SBEIIa* y de *SBEIIb* utilizadas como estándares en los geles.
- 40 Figura 16. A. Cromatografía de intercambio aniónico de las actividades del enzima ramificador del endospermo del trigo (cv Rosella). Se fraccionaron las proteínas solubles del endospermo con sulfato amónico y se cromatografiaron en una columna Sephacryl S-200 previamente a la aplicación a una columna de intercambio aniónico Resource Q. B) Análisis de inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-WBE1 del *SBEI* del endospermo del trigo separado en un PAGE no desnaturante. Las bandas de proteína *SBEI* denominadas A y B son productos de los genomas A y B, respectivamente, y Di y Dii son los productos del genoma D. Los carriles correspondientes a los extractos de: 1. CS, carril 2. N7BT7A, carril 3. N7AT7B, carril 4. N7DT7A. C) Análisis de inmunodetección de fracciones purificadas que representan los picos activos en el cromatograma de intercambio aniónico utilizando el anticuerpo anti-WBE 1. Carril 1: extracto soluble crudo de endospermo; carril 2: fracciones que representan el pico 1; carril 3: fracción que representa el pico 2.
- 45 Figura 17. Cribado de progenie haploide duplicada del cruce VC3.1.11 X CS7AL-15 para la segregación de las isoformas de *SBEI* mediante inmunodetección utilizando anticuerpo anti-WBE I. Los carriles 1 a 14 corresponden a líneas de progenie haploide duplicada. El carril 6 es una línea mutante de *SBEI* triple nula denominada A113, y el carril 7 es una línea normal para las isoformas de *SBEI* denominadas D28.
- 50 Figura 18. Amplificación mediante PCR de ADN procedente de semillas mutantes inducidas con rayos gamma (carriles 1 a 6) del cruce Veery 3 X Gabo 1BL.1RS utilizando los cebadores AR2b19cF/AR2b23cR. El carril 2 representa la semilla mutante MLT2B8, y el carril 7 representa Chinese Spring.
- 55 Figura 19. Amplificación mediante PCR de ADN procedente de líneas de trigo utilizando cebadores específicos para el genoma A para el gen *SBEIIa* del trigo, ARIIaAF/ARIIaAR. Los carriles en el orden de 1 a 5
- 60
- 65



son: CS, MLT2B8, MLT2D1, Dt2AS y BD219 (planta que es mutante nula para tanto *SBEIIa* como *SBEIIb* en los genomas tanto B como D).

5 Figura 20. Cromatograma en gel de sefariosa CL 2B de almidón de líneas de trigo, a) Acc144008, y b) Acc 144087, realizado utilizando un kit de ensayo de almidón (Sigma).

10 Figura 21. Comparación de perfiles de longitud de cadenas de almidones de líneas transgénicas de trigo con respecto al del control no transformado, NB1 (trigo). Se substrajo el porcentaje de la masa total de oligosacáridos individuales de almidones del control no transformado, de los valores correspondientes de almidones de líneas transgénicas. Las muestras eran: 085 (◆), 0,25 (▲), 008 (○).

## Descripción detallada de la invención

### *Alteración de SBEIIa en el trigo*

15 La invención se basa en el resultado de que una reducción de la actividad de *SBEIIa* en el endospermo del trigo resulta en una modificación de la producción del almidón, particularmente en niveles relativos elevados de amilosa en el grano del trigo. Este inesperado resultado contrasta con los resultados obtenidos con el maíz y el arroz, en los que la mutación de *SBEIIa* no alteró el perfil amilopectina/amilosa (Blanth *et al.*, 2001; Nakamura, 2002). En una  
20 forma de realización adicional, existe una alteración en una o más actividades adicionales de enzima biosintético del almidón, tales como una reducción de la actividad de *SBEIIb* y de *SBEIIa*. La mutación de los genes codificantes de dichas dos actividades se encuentra apoyada por el resultado inesperado de que *SBEIIa* y *SBEIIb* están estrechamente ligadas en el trigo, en contraste con la falta de ligamiento en el maíz y en el arroz. Los presentes  
25 inventores también han encontrado, inesperadamente, que el grano de la planta del trigo que presenta niveles reducidos de actividad de *SBEIIa* y de *SBEIIb* es no arrugado.

### *Procedimiento de producción de una planta del trigo*

30 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir una planta del trigo que presenta almidón alterado en su grano, en particular para incrementar la proporción de amilosa en el almidón hasta por lo menos 50%. Habitualmente, en los trigos hexaploide y duro, la proporción de amilosa en el almidón se encuentra comprendida entre aproximadamente 18% y aproximadamente 30%, en determinados mutantes (deficientes en SGP-1) hasta  
35 aproximadamente 35%. En una forma de realización, el procedimiento de la invención comprende la etapa de introducir la variación genética en una planta o semilla de trigo madre, con el fin de proporcionar plantas del trigo que producen grano que presenta almidón que comprende por lo menos 50% de amilosa. La proporción de amilosa en el almidón tal como se define en la presente memoria se proporciona en peso/peso (p/p), es decir, el peso de amilosa como porcentaje del peso de almidón del grano. En las formas de realización adicionales, la proporción de amilosa en el almidón es de por lo menos 50%, de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo  
40 menos 70% o de por lo menos 75% (cada uno en p/p). En las formas de realización adicionales de la invención, el procedimiento proporciona una proporción de amilosa de por lo menos 80% o de por lo menos 90% (p/p).

45 En una forma de realización adicional, el procedimiento incluye alterar, preferentemente reducir, el nivel de proteína enzima ramificador IIa del almidón (*SBEIIa*), de la actividad enzimática o de ambas en el endospermo del trigo. Es decir, una variación genética que se introduce en la planta del trigo conduce, directa o indirectamente, al cambio del nivel de *SBEIIa* y en consecuencia a las modificaciones del almidón mencionadas en la presente memoria. En una forma de realización adicional no mutuamente excluyente respecto a la forma de realización adicional, el procedimiento comprende la alteración, preferentemente la reducción, del nivel de expresión del gen *SBEIIa* en el endospermo del trigo, o comprende la mutación de un gen *SBEIIa* en el trigo, de manera que se reduce la actividad de *SBEIIa* en el endospermo. Puede conseguirse una reducción del nivel de expresión del gen *SBEIIa* o de otros genes mediante la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo un transgén, que codifique una molécula inhibidora que sea una molécula antisentido, cosupresora, ribozima o dúplex de ARN que presente como diana el gen *SBEIIa*.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "alterar", "incrementar", "incrementado", "reducir", "reducido", "inhibido" o similares se consideran términos relativos, es decir, en comparación con el estado de tipo salvaje o no alterado. El "nivel de una proteína" se refiere a la cantidad de una proteína particular, por ejemplo *SBEIIa*, que puede medirse mediante cualesquier medios conocidos en la técnica tal como, por ejemplo, el análisis de transferencia western u otro medio inmunológico. El "nivel de una actividad enzimática" se refiere a la cantidad de un enzima particular medido en un ensayo enzimático. Se aprecia que el nivel de actividad de un enzima puede alterarse en un mutante pero no el nivel de expresión (cantidad) de la proteína misma. A la inversa, podría alterarse  
60 la cantidad de proteína, pero la actividad permanece igual en el caso de que se produzca una proteína más o menos activa. Las reducciones de tanto la cantidad como la actividad también resultan posibles, tales como, por ejemplo, al inactivar un gen codificante del enzima. En determinadas formas de realización, la reducción del nivel de proteína o de actividad es de por lo menos 40% o de por lo menos 60% en comparación con el nivel de proteína o actividad en el endospermo del trigo no modificado, o de por lo menos 75%, de por lo menos 90% o de por lo menos 95%. La  
65 reducción del nivel de proteína o de actividad enzimática o de expresión génica puede producirse en cualquier

estadio del desarrollo del grano, en particular durante el estadio de rellenado del grano, mientras se sintetiza el almidón en el endospermo en desarrollo, o en todos los estadios de desarrollo del grano hasta la madurez.

Se define "almidón" en la presente memoria como un polisacárido constituido esencialmente de unidades de  $\alpha$ -glucopiranosas. El almidón es el carbohidrato de reserva principal en el trigo; se sintetiza en los amiloplastos y se forma y se almacena en gránulos. Incluye amilosa, un polímero de  $\alpha$ -1,4-D-glucopiranosas esencialmente lineal, y amilopectina, que presenta cadenas cortas de unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas principalmente por enlaces  $\alpha$ -1,4 con ramas unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,6. El almidón del trigo de las plantas de tipo salvaje comprende entre aproximadamente 20% y 30% de amilosa y entre aproximadamente 70% y 80% de amilopectina. Una diferencia significativa adicional entre las dos moléculas es su peso molecular. La amilosa presenta una conformación helicoidal con un peso molecular de entre  $10^4$  y  $10^6$  Da, mientras que la amilopectina presenta un peso molecular de entre aproximadamente  $10^7$  y  $10^8$  daltons. Algunos estudios recientes han demostrado la presencia de incluso aproximadamente 0,1% de sitios de ramificación  $\alpha$ -1,6-glucosídica en la amilosa, por lo que se describe como "esencialmente lineal". La "amilosa" se define en la presente memoria como incluyendo moléculas esencialmente lineales compuestas de unidades glucosídicas (glucopiranosas) unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,4 y amilopectina de cadena larga similar a amilosa (en ocasiones denominada "material intermedio" o "amilopectina similar a amilosa"; Takeda *et al.*, 1993b; Ferguson, 1994). El contenido de amilosa puede determinarse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos de la técnica, incluyendo la HPLC de exclusión por tamaño, por ejemplo en DMSO al 90% (p/v), los procedimientos basados en la concanavalina A (Megazyme Int., Irlanda) o preferentemente los procedimientos yodométricos, por ejemplo tal como se describe en el Ejemplo 1. El procedimiento de HPLC puede implicar la desramificación del almidón (Batey y Curtin, 1996) o no implicar ninguna desramificación. A partir del peso del grano y del contenido de amilosa, puede calcularse la cantidad de amilosa depositada en cada grano y compararse en líneas transgénicas y de control.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende la etapa que consiste en determinar la cantidad o la actividad de SBEIIa en el endospermo del trigo utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una forma de realización determinada, se mide el nivel de la proteína, por ejemplo mediante procedimientos de inmunodetección tales como la transferencia western o los ensayos ELISA, o se mide el nivel del ARNm correspondiente mediante procedimientos bien conocidos de la técnica, tales como el análisis de hibridación northern o la transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En otra forma de realización, el procedimiento comprende la etapa de seleccionar o cribar para una planta o grano del trigo que presenta un nivel alterado de proteína o actividad enzimática de SBEIIa en su endospermo. La etapa de selección puede basarse en un nivel reducido de actividad o proteína SBEIIa, o puede basarse en el fenotipo del grano de la planta del trigo, tal como una proporción incrementada de amilosa o una proporción reducida de amilopectina, o un fenotipo visual, por ejemplo grano arrugado o alteración de las propiedades del gránulo de almidón.

Se apreciaría que la invención incluyese un procedimiento para identificar una planta del trigo con las propiedades alteradas del almidón en su grano utilizando cualquiera de los procedimientos indicados en la presente memoria, determinando directamente las propiedades del almidón, o indirectamente, por ejemplo, detectando la presencia de una variación genética en la planta o en su grano. La planta puede ser una planta en una población de plantas del trigo, tal como, por ejemplo, en el cultivo del trigo.

La actividad de SBE puede medirse directamente mediante ensayo enzimático, por ejemplo mediante el ensayo de estimulación de fosforilasa (Boyer y Preiss, 1978). Este ensayo mide la estimulación por parte de SBE de la incorporación de glucosa 1-fosfato en polímero ( $\alpha$ -D-glucano) insoluble en metanol por parte de la fosforilasa  $\alpha$ . La actividad de SBE puede medirse mediante el ensayo de tinción con yodo, que mide la reducción de la absorbancia de un complejo de glucano-poliyodo, resultando de la ramificación de los polímeros de glucano. La actividad de SBE también puede someterse a ensayo mediante el ensayo de unión de ramificaciones, que mide la generación de extremos reductores a partir de amilosa reducida como sustrato tras la digestión con isoamilasa (Takeda *et al.*, 1993a). Preferentemente, la actividad se mide en ausencia de actividad de SBEI o SBEIIb. Las isoformas de SBE muestran diferentes especificidades de sustrato, por ejemplo SBEI muestra una actividad más alta en la amilosa ramificada, mientras que SBEIIa y SBEIIb muestran tasas de ramificación más altas con un sustrato amilopectina. Las isoformas también pueden distinguirse basándose en la longitud de la cadena de glucano que se transfiere. La proteína SBE también puede medirse mediante la utilización de anticuerpos específicos, tales como los indicados en la presente memoria. La actividad de SBEII puede medirse durante el desarrollo del grano en el endospermo en desarrollo, o alternativamente en el grano maduro, en el que la proteína todavía se encuentra presente en granos equivalentes, aunque no alterados, y puede someterse a ensayo mediante procedimientos inmunológicos.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para alterar, preferentemente para reducir, la actividad de múltiples enzimas de biosíntesis del almidón en el endospermo de trigo, en el que uno de los enzimas es SBEIIa, de manera que la proporción de amilosa en el almidón del grano sea de por lo menos 50%. En determinadas formas de realización, los niveles de las proteínas o actividades enzimáticas de SBEIIa y SBEIIb se encuentran reducidas o los niveles de la totalidad de los tres, SBEIIa, SBEIIb y SBEI, se encuentran reducidos. Otros enzimas de la biosíntesis del almidón que pueden alterarse en combinación con SBEIIa son: SSI, SSII y SSIII. También pueden alterarse los enzimas desramificadores del almidón, por ejemplo la actividad de la isoamilasa o de la pululanasa. También se proporciona cualquier combinación de los enzimas anteriormente indicados, con la

condición de que SBEIIa se encuentre alterado. En una forma de realización adicional, se altera la actividad de uno o más enzimas de la biosíntesis del almidón en la planta en tejidos que no son el endospermo, por ejemplo puede incrementarse la actividad de SBEI o de SBEII en las hojas, para compensar cierta pérdida de actividad causada por un transgén codificante de una molécula inhibidora de SBEIIa destinada principalmente a la expresión en el endospermo. La alteración puede ser un incremento o una reducción de la cantidad, o una alteración en la temporización de la expresión, por ejemplo. Alternativamente, la síntesis del almidón puede mejorarse adicionalmente mediante la sobreexpresión de uno o más enzimas biosíntesis del almidón en combinación con una reducción de SBEIIa. Los genes codificantes de dichos enzimas pueden proceder de cualquiera de entre una diversidad de orígenes, por ejemplo de bacterias o de otras fuentes aparte del trigo, y pueden modificarse para alterar las propiedades catalíticas, por ejemplo para alterar la dependencia térmica de los enzimas (por ejemplo ver el documento WO n° 94/09144).

El fenotipo de elevado contenido en amilosa puede conseguirse mediante la inhibición parcial o total de la expresión del gen *SBEIIa*, o de los genes *SBEIIa* y *SBEIIb*. El grado de inhibición del gen o genes en cierto grado determinará las características del almidón fabricado en el grano de trigo. Cualquiera de entre un abanico de técnicas de electroforesis en gel utilizadas con las proteínas extraídas del endospermo modificado del trigo revelará la naturaleza y grado de la modificación de la actividad de *SBEIIa* y/o de *SBEIIb*. La modificación puede producirse como una reducción de la actividad de *SBEIIa* y/o de *SBEIIb*, como la anulación completa de la actividad enzimática, o como una alteración de la distribución de *SBEIIb* o de otros enzimas dentro del endospermo. Para llevar a cabo dichos ensayos, puede extraerse el almidón del endospermo del trigo y analizarse las proteínas en el mismo, por ejemplo tal como se describe en Rahman *et al.*, 1995. Se llevan a cabo técnicas bien conocidas de la técnica, tales como SDS-PAGE e inmunotransferencia, en las fracciones soluble y de gránulos del almidón, y los resultados se utilizan para identificar las plantas o granos en los que se han producido modificaciones en los enzimas *SBEIIa* y/o *SBEIIb*.

#### *Plantas del trigo*

En un aspecto adicional, la invención proporciona una planta del trigo capaz de producir grano que presenta una proporción de amilosa en el almidón de por lo menos 50%. En una forma de realización adicional, la proporción de amilosa es de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70% o de por lo menos 80%. En otra forma de realización, la planta del trigo cuyo grano comprende cualquier de dichos niveles de amilosa en su almidón, comprende una variación genética que conduce a una reducción del nivel de expresión del gen *SBEIIa*, de la actividad del enzima *SBEIIa* en el endospermo, o a ambos, respecto al grano de tipo salvaje. En una forma de realización preferida, la variación genética comprende una mutación de un gen *SBEIIa* o un ácido nucleico introducido que codifica un inhibidor de la expresión del gen *SBEIIa*. El inhibidor puede comprender un ARN antisentido, cosupresor, ribozima o dúplex de ARN que inhibe la expresión y/o actividad de *SBEIIa*.

Una planta del trigo se define en la presente memoria como cualquier planta de una especie del género *Triticum*, especie que se cultiva comercialmente, incluyendo, por ejemplo *Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum* (trigo común o panificable), otras subespecies de *Triticum aestivum*, *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (trigo Durum, también conocido como trigo macaroni o trigo duro), *Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum* (trigo einkorn o trigo espelta pequeña), *Triticum timopheevi* spp. *timopheevi*, *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccon* (trigo emmer cultivado) y otra subespecies de *Triticum turgidum* (Feldman). El trigo puede ser trigo hexaploide, que presenta un genoma de tipo AABBDD, o trigo tetraploide, con un genoma de tipo AABB. Debido a que la variación genética en el trigo según la invención puede transferirse a determinadas especies relacionadas, incluyendo el centeno y la cebada, mediante hibridación, la invención también incluye las especies híbridas formadas de esta manera, incluyendo el Triticale, que es un híbrido entre el trigo panificable y el centeno. En una forma de realización particular, la planta del trigo es de la especie *Triticum aestivum*, y preferentemente de la subespecie *aestivum*. Alternativamente, debido a que las mutaciones o transgenes pueden transferirse fácilmente del *Triticum aestivum* al trigo Durum, el trigo preferentemente es *Triticum turgidum* L. ssp. *durum*.

La invención proporciona asimismo plantas del trigo con un nivel reducido en el endospermo de proteína *SBEIIa*, de actividad enzimática o de ambas, siendo capaz la planta del trigo de producir grano de la invención, presentando almidón que comprende una proporción incrementada de amilosa en comparación con el almidón extraído de las plantas de tipo salvaje. El nivel reducido de *SBEIIa* puede producirse durante por lo menos parte del proceso de desarrollo del grano, o durante todo el proceso hasta la madurez. En una forma de realización adicional, se reduce el nivel de *SBEIIa* en el endospermo en por lo menos el 50%, en por lo menos el 75%, en por lo menos el 90% o en por lo menos 95%, en comparación con el tipo salvaje. La expresión "tipo salvaje" presenta su significado normal del campo de la genética e incluye cultivares o genotipos de trigo que no han sido modificados tal como se enseña en la presente memoria.

La invención también proporciona plantas y grano progenie que presentan las características deseadas de las plantas de trigo madres, de genotipo y/o de fenotipo. La invención también se extiende a cualquier material de propagación de las plantas del trigo que pueda utilizarse para producir las plantas con las características deseadas, tales como tejido o células cultivadas.

La invención también comprende plantas del trigo que presentan niveles alterados, preferentemente reducidos, de SBEIIb o de otros enzimas biosintéticos del almidón además de una actividad reducida de SBEIIa. Las plantas que presentan actividades reducidas de SBEIIa y de SBEIIb pueden producirse mediante el cruce de una planta con nivel reducido de SBEIIa con una planta con nivel reducido de SBEIIb, o mediante la introducción de un transgén codificante de una molécula que inhibe la expresión de tanto el gen *SBEIIa* como del gen *SBEIIb*. Debido al estrecho ligamiento de los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* en el trigo, tal como se da a conocer en la presente memoria, las plantas que presentan niveles reducidos de ambas actividades también pueden producirse mediante la identificación de variedades que no presenten las isoformas de SBEIIa y SBEIIb codificadas por uno de los genomas del trigo, y el cruce de dichas variedades para producir una planta con un nivel reducido de las isoformas codificadas por como mínimo dos genomas.

La invención también comprende la variación o variaciones genéticas o mutaciones en otros fondos genéticos o en otras especies que pueden hibridarse con la planta del trigo tal como se ha indicado anteriormente. Las plantas alteradas (mutantes) pueden cruzarse con plantas que contengan un fondo genético más deseable. Tras el cruce inicial, puede llevarse a cabo un número adecuado de retrocruces para eliminar el fondo menos deseable. El fondo genético deseado puede incluir una combinación adecuada de genes que proporcionen un rendimiento comercial, y otras características tales como el rendimiento agronómico o la resistencia al estrés abiótico. El fondo genético también podría incluir otros genes alterados de biosíntesis o modificación del almidón, por ejemplo genes de otras líneas de trigo que presenten un endospermo arrugado en los que el gen causal sea desconocido.

Las plantas pueden ser transgénicas o no transgénicas.

La invención también proporciona plantas del trigo que comprenden una mutación en la que se encuentra ausente el gen *SBEIIa* del brazo largo del cromosoma 2A (2AL) o en la que el gen *SBEIIa* en el brazo largo del cromosoma 2A comprende una mutación que conduce a un nivel reducido de actividad del enzima SBEIIa en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje. A pesar de un cribado extensivo de 2.400 números de acceso de trigo, los inventores no encontraron plantas de este tipo que fuesen naturales, sugiriendo que la selección para la retención del gen *SBEIIa* funcional en 2AL podría estar produciéndose en la naturaleza. Sin embargo, pudieron producirse estas plantas e identificarse tras la mutagénesis. Estas plantas son no transgénicas, lo que resulta deseable en algunos mercados. Estas plantas pueden ser trigo panificable, trigo Durum u otro tipo de trigo. En una forma de realización preferida, la planta del trigo comprende una delección de por lo menos parte del gen *SBEIIa*, que puede extenderse a por lo menos parte del gen *SBEIIb*, en el cromosoma 2AL. Tal como se entiende en la técnica, los trigos hexaploides tales como el trigo panificable comprenden tres genomas que se denominan comúnmente genomas A, B y D, mientras que los trigos tetraploides tales como el trigo Durum comprenden dos genomas denominados comúnmente genomas A y B. Cada genoma comprende 7 pares de cromosomas que pueden observarse mediante procedimientos citológicos durante la meiosis. Los cromosomas se denominan comúnmente en orden según su tamaño de más grande a más pequeño, siendo el cromosoma-2, por lo tanto, el segundo cromosoma más grande en cada genoma. Cada cromosoma presenta un centrómero, que en el cromosoma 2 se encuentra situado asimétricamente; por lo tanto, los dos brazos del cromosoma 2 se denominan "corto" y "largo". El "brazo largo del cromosoma 2A" se define en la presente memoria como la región de dicho cromosoma entre el centrómero y la punta a lo largo del brazo largo, según el significado estándar del término. Las expresiones "brazo largo del cromosoma 2B" y "brazo largo del cromosoma 2D" se definen del mismo modo, excepto en que se refieren al cromosoma 2 de los genomas B o D del trigo, respectivamente.

Los presentes inventores han descubierto que los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* se encuentran estrechamente ligados en el cromosoma 2 del trigo. En una forma de realización particular, la planta del trigo comprende la mayoría (>50%) de 2AL, comprendiendo este brazo cromosómico una mutación de por lo menos el gen *SBEIIa*. Es decir, el cromosoma 2AL se encuentra esencialmente presente, comprendiendo una mutación en por lo menos el gen *SBEIIa* del genoma A. La presencia de 2AL puede determinarse mediante técnicas citológicas tales como, por ejemplo, las técnicas de hibridación *in situ* (ver el Ejemplo 9) o mediante la utilización de marcadores moleculares específicos de 2AL. En una forma de realización preferida, la planta del trigo es homocigótico para dicha mutación. La mutación puede ser una mutación nula. La mutación puede ser una delección.

En una forma de realización particular, el alelo con delección se deriva de las plantas MLT2B8 ó MLT2D1. Debido a que los alelos mutantes de *SBEIIa* en estas plantas se encuentra en el cromosoma 2AL, estos alelos pueden introducirse en variedades de trigo panificable o trigo Durum mediante cruce, y la invención por lo tanto incluye planta y grano y productos de almidón obtenidos a partir de los mismos. Estos alelos pueden combinarse con otros genes o alelos de biosíntesis del almidón útiles, o con otros rasgos genéticos útiles.

La invención comprende procedimientos para producir o identificar dichas plantas del trigo o al grano producido por dichas plantas.

#### Grano

La invención también proporciona grano de trigo que comprende un almidón alterado en comparación con almidón extraído del grano de trigo de tipo salvaje. Se define el grano en la presente memoria como grano esencialmente

maduro. Lo anterior incluye grano tal como se recolecta en un contexto comercial. En una forma de realización, el almidón alterado es por lo menos parcialmente una consecuencia de una actividad reducida de SBEIIa durante el desarrollo del endospermo del grano de trigo. En una forma de realización adicional, que no es mutuamente excluyente con la forma de realización anterior, el grano comprende una proporción incrementada de amilosa (en porcentaje del total de almidón). Lo anterior puede determinarse como proporción reducida de amilopectina en el almidón en comparación con grano de una planta de tipo salvaje. El almidón del trigo de tipo salvaje presenta aproximadamente 20% a 30% de amilosa y 70% a 80% de amilopectina. El grano de la invención comprende almidón que comprende por lo menos 50% (p/p) de amilosa. En una forma de realización adicional, se encuentran reducidas las actividades tanto de SBEIIa como de SBEIIb durante el desarrollo del endospermo. En una forma de realización adicional, también se reduce la actividad de SBEI. En formas de realización adicionales, la proporción de amilosa, medida mediante procedimientos bien conocidos de la técnica, es de por lo menos 55%, de por lo menos 60%, de por lo menos 65%, de por lo menos 70%, de por lo menos 75%, de por lo menos 80% o de por lo menos 90% (cada uno en p/p) del almidón del grano. Los niveles incrementados de amilosa pueden ponerse de manifiesto por una morfología anormal de los gránulos de almidón o una pérdida de birrefringencia de los gránulos observados bajo un microscopio óptico u otro procedimiento conocido en la técnica. En una forma de realización particular, se mide la proporción de amilosa mediante un procedimiento yodométrico, que puede ser un procedimiento espectrofotométrico tal como, por ejemplo, el procedimiento de Morrison y Laignelet (1983) o mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por ejemplo Batey y Curtin, 1996).

En formas de realización adicionales, el grano de trigo comprende almidón que presenta características físicas alteradas, tales como, por ejemplo, una temperatura de gelatinización incrementada o reducida, características de hinchado alteradas durante o después de la gelatinización, viscosidad alterada, una distribución alterada de longitudes de cadena en la amilopectina, o cualquier combinación de los mismos. La temperatura incrementada o reducida de gelatinización puede referirse al primer pico de gelatinización, el segundo pico, o ambos. Una o más propiedades del almidón, tales como, por ejemplo, la entalpía de gelatinización, puede no encontrarse alteradas. La temperatura del primer pico (ápex) de gelatinización medida mediante calorimetría de barrido diferencial puede incrementar en por lo menos 3°C ó 5°C, preferentemente en por lo menos 7°C ó 8°C, y más preferentemente en por lo menos 10°C en comparación con la temperatura del primer pico para el almidón correspondiente del grano de tipo salvaje. En una forma de realización particular, el incremento se encuentra comprendido en el intervalo de 3°C a 12°C.

El grano puede ser arrugado ("shrunken") o no arrugado presentando preferentemente un fenotipo no arrugado. La expresión "no arrugado" tal como se utiliza en la presente memoria se define como el caso en que la mayoría de los granos, preferentemente por lo menos 90% de los granos individuales, muestra un fenotipo carnoso o totalmente lleno. Éste habitualmente se asocia a un nivel normal o prácticamente normal de acumulación de almidón. En contraste, un fenotipo "arrugado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la mayoría de granos, en particular a que por lo menos 90% de los granos, presente una acumulación reducida de almidón. El grano ligeramente arrugado se refiere a una reducción del contenido medio de almidón de por lo menos 30%, el grano moderadamente arrugado se refiere a una reducción del contenido medio de almidón de por lo menos 50%, el grano altamente arrugado se refiere a una reducción del contenido medio de almidón de por lo menos 70%, cada uno respecto al grano de tipo salvaje. El grado de "rugosidad" también puede medirse a partir del contenido relativo de almidón, como porcentaje del peso del grano maduro. El grano de trigo cultivado en el campo no alterado presenta un contenido de almidón de aproximadamente 65%, mientras que en el grano arrugado éste se ha reducido a menos del 50%.

En formas de realización adicionales, el grano presenta un peso medio de por lo menos 36 ó 40 mg. El peso medio del grano se determina mediante medición del peso de un número conocido de granos, siendo una muestra representativa del lote de grano, y dividiendo el peso total por el número de granos. Se aprecia que las características del grano, tales como el contenido de almidón, el peso medio y un fenotipo no arrugado, a niveles prácticamente de tipo salvaje resultarían deseables para la producción comercial del grano.

La invención también proporciona harina, harina integral, masa u otros productos producidos a partir del grano o utilizando el grano. Estos pueden ser no tratados o tratados, por ejemplo mediante fraccionamiento o blanqueado. La invención proporciona además grano de trigo que resulta útil para la producción de alimentos obtenidos de la planta del trigo de la invención. Además, la invención comprende grano que ha sido tratado de otras maneras, de manera que el grano puede haber sido molido, triturado, laminado, perlado, tronzado o partido, o precocido (polenta), por ejemplo como el cuscús.

#### *Almidón*

En otro aspecto, la invención proporciona almidón obtenido a partir del grano de las plantas del trigo tal como se describe en la presente memoria, presentando el almidón una proporción incrementada de amilosa y una proporción reducida de amilopectina. En una forma de realización preferida, el almidón se obtiene a partir del grano de una planta del trigo que presenta un nivel reducido de la proteína SBEIIa, de actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o de ambas, respecto al trigo de tipo salvaje. En una forma de realización adicional, se reduce tanto la

actividad de SBEIIa como de SBEIIb, o se reduce la totalidad de las tres actividades, SBEIIa, SBEIIb y SBEI, respecto al trigo de tipo salvaje.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona almidón obtenido del grano de las plantas del trigo tal como se describe en la presente memoria, que comprende por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de amilosa. El almidón ha sido por lo menos parcialmente purificado, es decir, ha sido separado de por lo menos otro componente del grano. El almidón purificado puede obtenerse del grano mediante un procedimiento de molienda, por ejemplo un procedimiento de molienda en húmedo, que implica la separación del almidón de las proteínas, aceite y fibra. El producto inicial del procedimiento de molienda es una mezcla o composición de gránulos de almidón, y la invención, por lo tanto, comprende dichos gránulos, que comprenden el almidón modificado tal como se describe en la presente memoria.

15 El almidón puede presentar una temperatura de gelatinización incrementada o reducida, preferentemente una temperatura de gelatinización incrementada. En formas de realización particulares, por lo menos una de entre la temperatura al inicio del primer pico o la temperatura en el ápex del primer pico se incrementa en por lo menos 3°C, en por lo menos 5°C, en por lo menos 7°C o en por lo menos 10°C según mediciones de DSC en comparación con el almidón extraído del grano de trigo de tipo salvaje. En una forma de realización particular, el incremento se encuentra comprendido en el intervalo de entre 3°C y 12°C. Cabe destacar que la temperatura de gelatinización puede presentar una temperatura reducida al inicio del primer pico en combinación con una temperatura incrementada en el ápex del pico. En otra forma de realización que no es mutuamente excluyente con la anterior, el almidón presenta una temperatura de gelatinización alterada del primer pico pero muestra una temperatura sustancialmente inalterada en el segundo pico, que corresponde a la disociación amilosa-lípido, según se determina mediante DSC. En una forma de realización adicional, el almidón muestra una entalpía reducida durante la gelatinización, tal como, por ejemplo, una reducción de por lo menos 25% o de por lo menos 40% en comparación con la correspondiente al almidón de trigo de tipo salvaje.

30 En otra forma de realización, el almidón comprende un nivel elevado de almidón resistente, con una estructura alterada indicada por características físicas específicas. Dichas características pueden incluir la inaccesibilidad física a los enzimas digestivos, lo que puede producirse por presentar una morfología alterada de los gránulos de almidón, la presencia de cantidades apreciables de lípidos asociados al almidón, una cristalinidad alterada, una distribución alterada de la longitud de cadena de la amilopectina, o cualquier combinación de los mismos. La elevada proporción de amilosa también contribuye al nivel de almidón resistente.

35 La invención también proporciona almidón de grano de la planta del trigo ejemplificada que comprende cantidades incrementadas de fibra dietética, preferentemente en combinación con un nivel elevado de almidón resistente. Este incremento también es, en parte, resultado del nivel relativo elevado de amilosa.

40 La invención comprende procedimientos para producir el almidón de trigo indicado en la presente memoria. En una forma de realización, el procedimiento comprende las etapas que consisten en obtener grano de trigo tal como se indica en la presente memoria y extraer el almidón del grano. El grano de trigo puede obtenerse mediante cultivo de plantas del trigo indicadas en la presente memoria y la recolección del grano, o de un producto del grano o de un importador del grano.

45 *Procedimientos para reducir la actividad génica*

50 La expresión y/o actividad de SBEIIa, SBEIIb o de otros genes de biosíntesis o modificación del almidón pueden alterarse mediante la introducción de una o más variaciones genéticas en la planta del trigo. Tal como se utiliza en la presente memoria, "variación genética" se refiere a cualquier alteración heredable en el genoma de la planta del trigo que, en el presente contexto, afecte a la expresión o actividad del gen de interés. Entre las variaciones genéticas se incluyen mutaciones tales como las mutaciones puntuales, las inserciones, las sustituciones, las inversiones, las duplicaciones, las traslocaciones y preferentemente las deleciones, y la introducción de uno o más transgenes en el genoma.

55 Las expresiones "molécula de ácidos nucleicos" y "secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a un polímero de nucleótidos, que puede ser de una sola cadena o de doble cadena. Puede comprender ADN tal como, por ejemplo, ADN genómico o ADNc, o ARN, ARNm o cualquier combinación de los mismos. Para la introducción en células del trigo, puede modificarse químicamente una molécula de ácidos nucleicos para mejorar su administración o estabilidad, o protegerse como parte de un vector, tal como un vector vírico. La molécula de ácidos nucleicos puede obtenerse mediante técnicas de clonación o sintetizarse mediante técnicas bien conocidas de la técnica. La molécula de ácidos nucleicos puede comprender una cadena codificante o no codificante (antisentido) o una combinación de ellas, tal como, por ejemplo, en constructos de repeticiones invertidas. En referencia a las secuencias de ácidos nucleicos que "corresponden" a un gen, el término "corresponden" se refiere a una relación entre secuencias de nucleótidos, de manera que la secuencia de nucleótidos presenta una secuencia de nucleótidos que es igual al gen de referencia o a una parte indicada del mismo, o que presenta una secuencia de nucleótidos que es exactamente complementaria en el apareamiento de

bases normal de Watson-Crick, o es un equivalente de ARN de dicha secuencia, por ejemplo un ARNm, o es un ADNc derivado a partir de un ARNm del gen.

Las secuencias de nucleótidos se presentan en la presente memoria mediante una secuencia de una sola cadena en la dirección 5' a 3', utilizando las abreviaturas estándares de una letra para los nucleótidos. El término "complementario" se refiere a la relación entre dos moléculas o secuencias de una sola cadena de ácidos nucleicos que se hibridan mediante apareamiento de bases. Por ejemplo, 5'-GACT-3' se aparea con su complemento, 5'-AGTC-3'. El término "homología" u "homólogo" se refiere a la similitud o identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos o entre dos o más secuencias polipeptídicas, según el contexto. La expresión "porcentaje de identidad" tal como se aplica a secuencias de nucleótidos se refiere al porcentaje de correspondencias de nucleótidos entre dos secuencias de nucleótidos alineadas utilizando un algoritmo estandarizado tal como, por ejemplo, el algoritmo CLUSTAL V o los programas de secuenciación Blastn o BLAST 2 disponibles del National Center for Biotechnology Information, disponible en Internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, y preferentemente ajustado en parámetros por defecto. De manera similar, "porcentaje de identidad" puede referirse a secuencias de polipéptidos.

La referencia en la presente memoria a un "gen", incluyendo un gen *SBEIIa*, *SBEIIb* u otro gen biosintético del almidón, o genes codificantes de moléculas de ARN antisentido, cosupresor, ribozima o dúplex o similares, debe interpretarse en su contexto más amplio, e incluye un gen genómico clásico que presenta una región transcrita asociada a regiones reguladoras, tales como promotores y secuencias de terminador de transcripción-poliadenilación. La región transcrita incluye secuencias transcritas pero no traducidas (secuencias no traducidas, UTR) y opcionalmente puede incluir una región codificante de proteína o intrón, que se desempalman y extraen formando un ARN maduro, o cualquier combinación de ellos. Un "gen" incluye formas obtenidas a partir de ADNc, correspondientes a exones, y genes de ARN tales como los presentes en genomas de ARN. El término "gen" también se utiliza para describir moléculas sintéticas o de fusión codificantes de la totalidad o parte de un producto funcional.

En el caso de que se encuentre presente en una célula, preferentemente en una célula de trigo, un "gen" dirige la "expresión" de una molécula "biológicamente activa" o "producto génico", que puede ser ARN o un polipéptido. Este procedimiento se produce más comúnmente mediante transcripción para producir ARN y mediante traducción para producir proteína. Dicho producto puede modificarse posteriormente en la célula. El ARN puede modificarse mediante, por ejemplo, poliadenilación, corte y empalme, adición de caperuza, fragmentación en fragmentos de 21 a 23 nucleótidos, o exportación del núcleo o mediante interacciones covalentes o no covalentes con proteínas. Las proteínas pueden modificarse mediante, por ejemplo, fosforilación, glucosilación o lipidación. Todos estos procedimientos se encuentran comprendidos en la expresión "expresión de un gen" o similar tal como se utiliza en la presente memoria.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "gen *SBEIIa* del trigo" y "gen *SBEIIb* del trigo" y expresiones relacionadas se refieren a los genes que han sido identificados del trigo que codifican los enzimas *SBEIIa* o *SBEIIb*, respectivamente, y genes homólogos presentes en otras variedades del trigo. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, las secuencias génicas listadas en la Tabla 1. Se entiende que existe variación natural en las secuencias de los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* de diferentes variedades de trigo. Los genes homólogos son fácilmente reconocibles por el experto en la materia. El grado de identidad de secuencia entre genes *SBEIIa* homólogos o las proteínas se cree que es de por lo menos 90%, de manera similar a los genes o proteínas *SBEIIb*.

Los genes para la utilización en la invención pueden derivarse a partir de un *SBEIIa*, *SBEIIb* u otro gen biosintético del almidón natural mediante técnicas de recombinación estándares. Una "molécula de ácidos nucleicos recombinante" o expresión similar tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia que no es natural o que presenta una secuencia construida mediante una combinación artificial de dos o más segmentos de secuencia de otro modo separados. Esta combinación artificial puede formarse mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo mediante técnicas de ingeniería genética bien conocidas de la técnica. El término "recombinante" incluye ácidos nucleicos que han sido alterados únicamente mediante adición, sustitución o delección de una parte del ácido nucleico. Con frecuencia, un ácido nucleico recombinante puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos operablemente ligada a una secuencia de promotor. Dicho ácido nucleico recombinante puede ser parte de un vector que se utiliza, por ejemplo, para transformar una célula.

Generalmente, un gen puede someterse a mutagénesis para producir sustituciones, deleciones y/o adiciones individuales o múltiples de nucleótidos, por ejemplo la modificación de codones. Entre los derivados por inserción de nucleótidos de dichos genes se incluyen las fusiones 5' y 3'-terminales, así como las inserciones intrasecuencia de nucleótidos individuales o múltiples. Las variantes de secuencia por inserción de nucleótidos son aquéllas en las que se introducen uno o más nucleótidos en un sitio predeterminado en la secuencia de nucleótidos, aunque también resulta posible la inserción aleatoria con el cribado adecuado del producto resultante. Las variantes por delección se caracterizan por la eliminación de uno o más nucleótidos de la secuencia. Las variantes por sustitución de nucleótidos son aquéllas en las que por lo menos un nucleótido en la secuencia ha sido eliminado y se ha insertado un nucleótido diferente en su sitio. Dicha sustitución puede ser "silenciosa" en el sentido de que la sustitución no

cambia el aminoácido definido por el codón. Alternativamente, se diseñan sustituyentes conservadores para alterar un aminoácido por otro aminoácido de acción similar. Las sustituciones típicas son las realizadas según lo siguiente:

Residuos adecuados para las sustituciones conservadoras de aminoácidos

5

<u>Residuo original</u>	<u>Sustituciones ejemplificativas</u>
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

### *Transgenes*

10 La expresión y/o actividad de *SBEIIa*, *SBEIIb* u otros genes de biosíntesis o modificación del almidón pueden alterarse mediante la introducción de uno o más transgenes en la planta del trigo. El término "transgén" tal como se utiliza en la presente memoria presenta el significado normal de la técnica de la biotecnología e incluye una secuencia genética que ha sido producida o alterada mediante tecnología de ADN o ARN recombinante y que ha sido introducida en el organismo o célula, preferentemente célula de trigo, de interés. El transgén puede incluir secuencias genéticas derivadas del organismo o célula, por ejemplo una secuencia antisentido. El transgén típicamente incluye un ácido nucleico exógeno que no se deriva de dicho organismo o célula. El término "transgénico" se refiere al organismo o célula que contiene un transgén. La expresión "no transgénico" se refiere a la ausencia de cualquier transgén en el genoma. Un transgén preferentemente se integra en el genoma del organismo o célula, para su herencia estable.

20 El experto en la materia apreciará que la expresión de un gen, o de una secuencia complementaria al mismo, en una célula, requiere que dicho gen se sitúe en relación operable con una secuencia de promotor. La elección de promotor para el presente objetivo puede variar dependiendo del nivel de expresión necesario y/o del tejido, órgano y especie en el que debe producirse la expresión, en particular los promotores específicos del endospermo.

25 La situación de una molécula de ácidos nucleicos bajo el control regulador de una secuencia de promotor implica situar dicha molécula de manera que la expresión se encuentre contaminada por la secuencia de promotor. Un promotor habitualmente, aunque no necesariamente, se encuentra situado cadena arriba, o en el extremo 5', de la molécula de ácidos nucleicos que regula. Además, los elementos reguladores que comprenden un promotor habitualmente se sitúan a menos de 2 kb del sitio de inicio de transcripción del gen. Durante la construcción de las combinaciones heterólogas de promotor/gen estructural, generalmente resulta preferente situar el promotor a una distancia del sitio de inicio de transcripción del gen que sea aproximadamente la misma que la distancia entre el promotor y el gen que controla en su contexto natural (es decir, el gen a partir del que se deriva el promotor). Tal como es conocido en la técnica, existe cierta flexibilidad en la variación de esta distancia sin pérdida de función del promotor. De manera similar, el posicionamiento preferido de un elemento de secuencia reguladora con respecto a un gen heterólogo que deba situarse bajo su control se define por la situación del elemento en su contexto natural (es decir, el gen del que se deriva). Nuevamente, tal como es conocido en la técnica, también puede darse cierta variación en la distancia.

40 Entre los ejemplos de promotores adecuados para la utilización en constructos génicos de la presente invención se incluyen promotores derivados de genes de virus, levaduras, mohos, bacterias, insectos, aves, mamíferos y plantas, preferentemente los que pueden funcionar en las células vegetales, más preferentemente los que pueden expresarse en el endospermo del trigo. El promotor puede regular la expresión constitutivamente, o diferencialmente, con respecto al tejido en el que se produce la expresión. Alternativamente, la expresión puede ser diferencial con respecto al estadio de desarrollo en el que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos tales como tensiones fisiológicas o la temperatura.

45



El procedimiento para reducir la actividad de *SBEIIa* o de otro gen biosintético del almidón puede comprender la etapa de introducir un transgén en una célula regenerable de trigo y regenerar una planta de trigo transgénica a partir de la célula transformada. Entre los enzimas ramificadores implicados en la síntesis de la amilopectina se incluyen *SBEI*, *SBEIIa* y *SBEIIb*, y la invención comprende una expresión reducida de *SBEIIa* solo o en combinación con la alteración de la expresión de *SBEIIb* o de *SBEI*. Por lo tanto, el transgén o transgenes pueden inactivar más de uno de estos genes. Además, la inactivación de *SBEIIb* y/o de *SBEI* puede ser directa, en el aspecto de que el transgén (por ejemplo codificante de ARN dúplex, antisentido o ARN ribozima, ver posteriormente) presenta como diana directa la expresión del gen *SBEIIb* o *SBEI*, o puede resultar indirectamente en la alteración de la expresión de *SBEIIb* o de *SBEI*. Por ejemplo, el transgén de ARN puede presentar como diana únicamente el gen *SBEIIa*/ARN en términos de identidad de secuencia o apareamiento de bases, aunque resultar también en la reducción de la actividad de *SBEIIb* o de *SBEI* al alterar la estabilidad o distribución de las proteínas en el endospermo. Además, algunas formas de la presente invención residen en la combinación de una actividad alterada de *SBEIIa* y una alteración de otro u otros enzimas de síntesis de la amilopectina, entre los que pueden incluirse SSI, SSII, SSIII y enzimas desramificadores tales como la isoamilasa o la pululanasa. La expresión de cualquiera de ellos, o de la totalidad de ellos, podría resultar alterada por la introducción de un transgén.

Se conocen varias secuencias de ADN de los genes de síntesis de la amilopectina en el trigo, cualquiera de las cuales podría ser la base para el diseño de transgenes para inactivar los genes en el trigo. Entre ellas se incluyen *SBEIIa* (números de acceso de GenBank Y11282, AF338431 y AF338432) y *SBEIIb* (documentos WO 00/15810 y 01/62934). El gen *SBEI* del trigo se describe en Rahman *et al.* (1997) y en Rahman *et al.* (1999). La secuencia de *SBEI* de *Triticum tauschii*, que es altamente homóloga respecto al gen *SBEI* del genoma D del trigo, puede encontrarse en la memoria de patente publicada WO 99/14314. Puede accederse a una secuencia de ADN para el *SBEI* del trigo en la base de datos GenBank bajo el número de acceso AF076679. También pueden utilizarse homólogos de otros genes de síntesis de la amilopectina procedentes de la cebada o de otras especies estrechamente relacionadas, para modificar los niveles de expresión génica en el trigo. Dichos genes o fragmentos de los mismos pueden obtenerse mediante procedimientos bien conocidos de la técnica, incluyendo la amplificación por PCR o la hibridación con sondas marcadas.

La expresión de "condiciones astringentes de hibridación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la hibridación generalmente se produce en el caso de que exista una identidad de secuencia de por lo menos 90% y preferentemente de por lo menos 95%, entre la sonda y la secuencia diana. Son ejemplos de condiciones astringentes de hibridación la incubación durante la noche en una solución que comprende formamida al 50%, 5xSSC (1xSSC=NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, dextrán sulfato al 10% y 20 µg/l de ADN portador fragmento y desnaturalizado, tal como ADN de esperma de salmón, seguido del lavado del soporte de hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Otras condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas y se ejemplifican en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989, en particular el capítulo 11.

La región o regiones de los homólogos utilizadas para preparar el constructo de transgén debería presentar una identidad de por lo menos 85% con el gen del trigo correspondiente, preferentemente por lo menos 90% y todavía más preferentemente una identidad de 95% a 100% en la región apropiada. También resulta preferente que el transgén con diana específicamente en los genes de síntesis de la amilopectina expresados en el endospermo del trigo y presenta un efecto menor o mínimo sobre la síntesis de la amilopectina en otros sitios de la planta. Lo anterior puede conseguirse mediante la utilización de secuencias reguladoras adecuadas tales como promotores específicos del endospermo en el transgén.

#### *Antisentido*

Los enfoques a la ingeniería genética para alterar, en particular específicamente reducir, la actividad génica en plantas tales como el trigo son bien conocidos de la técnica. Entre estos procedimientos se incluyen la introducción de constructos génicos para la expresión de una molécula antisentido adecuada que es complementaria al ARN del gen diana y puede hibridarse con el mismo. Se cree que las moléculas antisentido interfieren con la traducción o procesamiento o estabilidad del ARNm del gen diana, inactivando de esta manera la expresión del gen. Los procedimientos para diseñar secuencias antisentido son bien conocidos de la técnica y pueden encontrarse ejemplos de ellos en la patente estadounidense nº 5190313, la memoria de patente europea 0467349-A1, la memoria de patente europea nº 0223399-A1 y la memoria de patente europea nº 0240208, que se incorporan como referencia en la presente memoria. La utilización de procedimientos con secuencias antisentido en plantas ha sido revisada en Bourque (1995) y Senior (1998). Bourque lista un gran número de ejemplos de inactivación génica utilizando secuencias antisentido en sistemas vegetales. También afirma que alcanzar una inhibición del 100% de una actividad enzimática puede no resultar necesario, debido a que la inhibición parcial resultará más probablemente en un cambio medible en el sistema. Senior (1998) indica que los procedimientos que utilizan secuencias antisentido en la actualidad son técnicas muy bien establecidas para manipular la expresión génica en plantas.

Las moléculas antisentido para *SBEIIa*, *SBEIIb* y *SBEI* del trigo o para otros genes de biosíntesis o modificación del almidón pueden basarse en las secuencias de ARNm del trigo o derivarse a partir de secuencias homólogas de ADN

o ARNm obtenidas de otras especies, por ejemplo de la cebada. Las secuencias antisentido pueden correspondiente a la totalidad o parte de los transcritos de cualquiera de estos genes o a secuencias que controlan su expresión, por ejemplo su corte y empalme. La secuencia de antisentido puede corresponder a una región codificante diana de *SBEIIa* del trigo u otro gen, o la región 5' no traducida (UTR) o la UTR 3' o una combinación de ellas. Puede ser complementaria en parte respecto a secuencias de intrón, que pueden cortarse y empalmarse durante o después de la transcripción, preferentemente sólo respecto a secuencias de exón del gen diana. En vista de la divergencia generalmente mayor de las UTRs, utilizar como diana estas regiones proporciona una mayor especificidad de inhibición génica. En las formas de realización particulares, la longitud de la secuencia antisentido es de por lo menos 19 nucleótidos contiguos, por lo menos 50, por lo menos 100, por lo menos 200, por lo menos 500 ó por lo menos 1.000 nucleótidos, correspondiente al complemento de la secuencia de ARN del gen. Puede utilizarse la secuencia de longitud completa complementaria del transcrito entero del gen. En una forma de realización particular, la longitud de la secuencia antisentido es de entre 100 y 2.000 nucleótidos. En las formas de realización adicionales, el grado de identidad de secuencia de la secuencia antisentido respecto al complemento del transcrito diana es de por lo menos 85%, de por lo menos 90% o de entre 95% y 100%. La molécula de ARN antisentido puede evidentemente comprender secuencias no relacionadas que pueden funcionar estabilizando la molécula.

#### *Cosupresión*

Otro enfoque biológico molecular que puede utilizarse es la cosupresión. El mecanismo de cosupresión no se entiende bien pero se cree que implica el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) y que, en este aspecto, podría ser muy similar a muchos ejemplos de supresión con secuencias antisentido. Implica introducir una copia adicional de un gen o un fragmento del mismo en una planta en la orientación de sentido con respecto a un promotor para su expresión. El tamaño del fragmento de sentido, su correspondencia con las regiones génicas diana, y su grado de identidad de secuencia con el gen diana son equivalentes a los de las secuencias antisentido indicadas anteriormente. En algunos casos, la copia adicional de la secuencia génica interfiere con la expresión del gen vegetal diana. Se hace referencia a la memoria de patente WO 97/20936 y a la memoria de patente europea 0465572 para procedimientos para implementarla los enfoques de cosupresión.

#### *Silenciamiento génico mediado por ARN de doble cadena*

Un procedimiento adicional que puede utilizarse para introducir variación genética en la planta del trigo es el silenciamiento génico mediado por ARN dúplex o de doble cadena. Este procedimiento también implica el PTGS. En este procedimiento, se introduce un ADN que dirige la síntesis de uno o más productos de ARN por lo menos parcialmente de doble cadena con homología con el gen diana que debe inactivarse. Por lo tanto, el ADN comprende secuencias tanto de sentido como antisentido que, al transcribirse en ARN, pueden hibridarse para formar la región de ARN de doble cadena. En una forma de realización preferida, las secuencias de sentido y antisentido se encuentran separadas por una región espaciadora que comprende un intrón que, al transcribirse en ARN, se desempalma. SE ha demostrado que esta disposición resulta en una eficiencia más alta del silenciamiento génico. La región de doble cadena puede comprender una o dos molécula de ARN, transcritas a partir de una o dos regiones del ADN. La presencia de la molécula de doble cadena induce una respuesta de un sistema endógeno de la planta que destruye tanto el ARN de doble cadena como también el transcrito de ARN homólogo del gen vegetal diana, reduciendo o eliminando eficientemente la actividad del gen diana. Se hace referencia a la memoria de patente australiana 99/29514-A y a la memoria de patente WO 99/53050 para procedimientos de implementación de esta técnica. En formas de realización particulares, la longitud de las secuencias de sentido y antisentido que se hibridan es de por lo menos 19 nucleótidos contiguos, de por lo menos 30, de por lo menos 50, de por lo menos 100, de por lo menos 200, de por lo menos 500 ó de por lo menos 1.000 nucleótidos. Puede utilizarse la secuencia de longitud completa correspondiente al transcrito entero del gen. En una forma de realización particular, las longitudes se encuentran comprendidas en el intervalo de entre 100 y 2.000 nucleótidos. En formas de realización adicionales, el grado de identidad de secuencia de las secuencias de sentido y antisentido respecto al transcrito diana es de por lo menos 85%, de por lo menos 90% o de entre 95% y 100%. La molécula de ARN evidentemente puede comprender secuencias no relacionadas que pueden funcionar estabilizando la molécula. La molécula de ARN puede expresarse bajo el control de un promotor de ARN polimerasa II o ARN polimerasa III. Entre los ejemplos de estos últimos se incluyen los promotores de ARNt o de ARNsn. La molécula de ARN de doble cadena también puede comprender secuencias de más de un gen unidas entre sí y de esta manera presentar como diana múltiples genes.

#### *Ribozimas*

La variación genética responsable de la inactivación deseada de la expresión génica en el trigo puede comprender una molécula de ácidos nucleicos codificante de uno o más ribozimas. Los ribozimas son moléculas de ARN con función enzimática o catalítica que pueden cortar otras moléculas de ARN en sitios específicos definidos por una o con frecuencia dos secuencias hibridantes. El corte del ARN inactiva la expresión del gen diana. Los ribozimas también pueden actuar como una molécula antisentido, lo que podría contribuir a la inactivación génica. Los ribozimas contienen uno o más dominios catalíticos, preferentemente del tipo cabeza de martillo o del tipo horquilla, entre las secuencias hibridantes. Pueden utilizarse otros motivos ribozima, incluyendo ARNasaP, intrones de grupo I o II y tipos de virus de la hepatitis delta. Se hace referencia a la memoria de patente europea n° 0321201 y a la

patente US nº 6.221.661. La utilización de ribozimas para inactivar genes en plantas transgénicas ha sido demostrado, por ejemplo, por Wegener *et al.*, 1994.

5 *Constructos/vectores génicos*

La invención también proporciona moléculas aisladas de ácidos nucleicos que comprenden ARN o ADN, preferentemente ADN, que codifican la molécula inhibidora de gen. En determinadas formas de realización, las moléculas de ácidos nucleicos codifican moléculas de ARN o ribozima antisentido, de sentido (cosupresoras) de doble cadena que presentan como diana la secuencia del gen *SBEIIa* del trigo y que inactivan su expresión en el endospermo del grano del trigo. La invención también proporciona constructos génicos que comprenden o codifican la molécula aislada de ácidos nucleicos, que comprenden uno o más elementos reguladores, tales como promotores, intensificadores y secuencias de terminación de transcripción o de poliadenilación. Dichos elementos son bien conocidos de la técnica. Los constructos genéticos también pueden comprender secuencias de intrón que ayudan a la expresión del transgén en las plantas, particularmente en plantas monocotiledóneas tales como el trigo. El término "intrón" se utiliza en su sentido normal como referido a un segmento genético que se transcribe pero que no codifica una proteína y que se desempalma de un ARN antes de la traducción. Pueden incorporarse intrones en una región UTR 5' o en una región codificante en el caso de que el transgén codifique un producto traducido, o en cualquier sitio en la región transcrita en el caso de que no lo haga.

La invención proporciona además vectores, por ejemplo vectores plásmidos, que comprenden los constructos genéticos. El término "vector" incluye un vector de expresión, que es capaz de expresión *in vitro* o *in vivo*, y un vector de transformación, que es capaz de ser transferido de una célula u organismo a otro. Los vectores comprenden secuencias que proporcionan la replicación en las células, por ejemplo en células procarióticas tales como *E. coli* o *Agrobacterium*. En una forma de realización particular, el vector es un vector binario que comprende una secuencia de ADN-T, definida por, como mínimo, una secuencia de límite de ADN-T, que puede introducirse en células de trigo. La invención proporciona además células que comprenden los vectores, por ejemplo células de *Agrobacterium* o de trigo, que pueden ser células regenerables tales como las células del escutelo de los embriones inmaduros. Alternativamente, las células pueden ser células de trigo transformadas que comprenden el transgén.

30 *Promotores/terminadores*

En otra forma de realización, el transgén u otro constructo genético de la invención incluye una región de inicio de transcripción (promotor) que puede proporcionar la expresión regulada o constitutiva en el endospermo del trigo. El promotor puede ser específico del tejido, confiriendo la expresión selectiva o exclusivamente en el endospermo. El promotor puede seleccionarse de entre promotores específicos del endospermo (tales como el promotor de glutenina de alto peso molecular, el promotor SSL del trigo, el promotor SBEII del trigo y el promotor GBSS del trigo) o promotores no específicos del endospermo (tales como el promotor ubiquitina o los promotores CaMV35S ó 35S intensificado). El promotor puede ser modulado por factores tales como la temperatura, la luz o el estrés. Habitualmente, el promotor se proporciona en el lado 5' de la secuencia genética que debe expresarse. El constructo también puede contener otros elementos que intensifican la transcripción, tales como las regiones de poliadenilación nos 3' ó ocs 3' o los terminadores de transcripción. Las regiones del ADN ilustradas se incorporan en vectores que contienen secuencias de gen marcador seleccionable adecuadas y otros elementos, o en vectores que se han cotransformado con vectores que contienen dichas secuencias.

45 *Procedimientos de transformación para el trigo*

Los procedimientos de transformación de plantas monocotiledóneas tales como el trigo, es decir, para introducir variación genética en la planta mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno, y para la regeneración de plantas de protoplastos o embriones vegetales inmaduros son bien conocidos de la técnica; ver, por ejemplo, Becker *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1997; He *et al.*, 1994; Hess *et al.*, 1990; Nehra *et al.*, 1994; Vasil *et al.*, 1992; Vasil *et al.*, 1993; Weeks *et al.*, 1993; Weir *et al.*, 2001; solicitud de patente australiana nº AU 7546094, solicitud de patente europea nº 709462, publicaciones de patente internacional WO nº 93/04178, nº 89/12012, nº 94/13822 y nº 99/14314. Los vectores que portan la secuencia de nucleótidos o constructo genético deseado y un marcador seleccionable pueden introducirse en células regenerables de trigo de plantas cultivadas a partir de tejidos o explantes, o sistemas vegetales adecuados, tales como protoplastos. El gen marcador seleccionable puede proporcionar resistencia a antibióticos o a herbicidas a las células de trigo, o permitir la utilización de sustratos tales como la manosa. El marcador seleccionable preferentemente confiere resistencia al asulam, a la geneticina o a la higromicina a las células de trigo. Las células de trigo regenerables proceden preferentemente del escutelo de embriones inmaduros, de embriones maduros, de callos derivados de estos, o del tejido meristemático.

La planta transformada puede contener un gen marcador seleccionable, o dicho gen puede eliminarse durante o después de la regeneración, por ejemplo mediante extracción del marcador seleccionable fuera del genoma o mediante segregación del gen marcador seleccionable respecto del transgén inhibidor de *SBEIIa*.

Las plantas en las que el transgén o la mutación han sido integrados en un cromosoma pueden seleccionarse mediante cribado mediante, por ejemplo, la utilización de una sonda de ácidos nucleicos adecuada específica para

el transgén o la observación fenotípica. Puede utilizarse cualquiera de entre varios procedimientos para determinar la presencia de una planta transformada. Por ejemplo, puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias que son únicas de la planta transformada, con detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel u otros procedimientos. Puede extraerse ADN de las plantas utilizando procedimientos convencionales y llevarse a cabo la reacción de PCR utilizando cebadores que distingan las plantas transformadas de las no transformadas. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores que amplifiquen una región de ADN del vector de transformación leyendo en el interior del constructo y el cebador inverso diseñado a partir del gen de interés. Estos cebadores únicamente amplifican un fragmento en el caso de que la planta haya sido transformada con éxito. Un procedimiento alternativo para confirmar un transformante positivo es mediante hibridación southern, que es bien conocida de la técnica. Las plantas que han sido transformadas o son mutantes también pueden identificarse, es decir distinguirse de las plantas no transformadas o de tipo salvaje, a partir de su fenotipo, por ejemplo conferido por la presencia de un gen marcador seleccionable, o la presencia de una proteína particular mediante procedimientos inmunológicos, o a partir de la ausencia de una proteína, por ejemplo la ausencia de la proteína SBElIa en el endospermo según detección mediante ensayo ELISA o análisis de transferencia western. Una indicación utilizada en el cribado de dichas plantas también puede ser la observación de los rasgos fenotípicos del grano, por ejemplo mediante inspección visual o medición del grano arrugado, o el ensayo para un contenido elevado de amilosa, o la comprobación microscópica de la presencia de birrefringencia.

### Mutación

La introducción de variación genética que conduzca a una actividad reducida del enzima SBElIa o de otro enzima biosintético del almidón en el endospermo del trigo también puede conseguirse con las mutaciones apropiadas dentro del gen respectivo o secuencias reguladoras del gen. En el contexto de la presente solicitud, una "mutación inducida" es una variación genética inducida artificialmente que puede ser el resultado de la mutagénesis química, por radiación o basada biológicamente, por ejemplo la inserción de un trasposón o de ADN-T. El grado en el que el gen resulta inhibido determinará en cierto grado las características del almidón fabricado. Las mutaciones pueden ser por truncado o mutaciones nulas y es conocido que estas mutaciones presentan un impacto significativo sobre la naturaleza del almidón; sin embargo, una estructura alterada del almidón también resultará de una mutación parcial que reduzca suficientemente la actividad del enzima de síntesis de la amilopectina proporcionando la característica de interés en el almidón o grano del trigo. Otras reorganizaciones cromosómicas también pueden resultar efectivas y entre ellas pueden incluirse mutaciones por inserción, por delección, por inversión, por duplicación o puntuales. Una "mutación nula" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una mutación que resulta en la pérdida completa o prácticamente completa de la actividad del gen de interés, tal como, por ejemplo, en el caso de que ya no se detecte la actividad del gen.

El gen *SBEIIa* se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 2. Resulta preferido que las mutaciones del gen o de otros genes, particularmente las mutaciones por delección, se localicen en el gen de interés, por ejemplo el gen *SBEIIa*, o quizás extenderse al gen *SBEIIb* ligado, en el caso de un mutante doble. Un gen en el presente contexto incluye la región promotora y las señales de terminación de transcripción/poliadenilación, así como la región transcrita. La región transcrita incluye la región o regiones codificantes de proteína y las regiones 5' y 3' no traducidas del ARNm, así como cualquier región de intrón que pueda encontrarse presente. Las mutaciones del gen pueden encontrarse en cualquier región del gen o en una combinación de regiones, y podrían extenderse desde la alteración de únicamente un nucleótido, por ejemplo una mutación de desplazamiento de marco en la región codificante, a la delección del gen completo. Las plantas que son homocigóticas para la variación genética resultan preferidas.

Las delecciones pueden ser de tamaño restringido, del orden de una o unos cuantos cientos, quizá 500, kilobases. En determinadas formas de realización, la delección se extiende menos de unos cuantos miles de kilobases, o menos de 5 mil kilobases. Aunque la invención puede comprender delecciones más grandes, incluyendo una gran parte del brazo largo del cromosoma 2 del genoma respectivo, éstas no resultan preferidas debido a que el brazo largo del cromosoma 2 presenta algunos otros genes localizados en el mismo que presentan un impacto sobre el vigor de la planta del trigo. De acuerdo con lo anterior, en el caso de que se produzcan delecciones grandes, éstas impactan negativamente sobre el vigor de la planta y por lo tanto sobre su viabilidad comercial y se desea que se encuentre presente por lo menos una mayoría del brazo largo del cromosoma 2. En una forma de realización preferida, la mayoría del brazo largo del cromosoma 2A se encuentra presente.

Puede conseguirse la mutagénesis por medios químicos o de radiación, por ejemplo mediante el tratamiento de las semillas con EMS o azida sódica (Zwar y Chandler, 1995), o con irradiación gamma. El aislamiento de los mutantes puede conseguirse mediante el cribado de plantas o semillas mutagenizadas. Por ejemplo, puede cribarse una población mutagenizada de trigo para un contenido elevado de amilosa en el grano y/o una distribución de longitudes de cadena de la amilopectina más larga de lo normal, o la pérdida de la proteína SBElIa mediante ELISA, o para alteraciones de la morfología del grano (Green *et al.*, 1997). El cribado preferentemente se realiza en un genotipo del trigo que ya carezca de una de las actividades de SBE, por ejemplo en un fondo negativo para *SBEIIb*. A continuación, pueden introducirse dichas mutaciones en fondos genéticos deseables mediante cruce del mutante con una planta del fondo genético deseado y realizando un número adecuado de retrocruzamientos para eliminar el fondo madre originalmente no deseado.

En otra forma de realización, la mutación afecta a la expresión o actividad de tanto el gen *SBEIIa* como el gen *SBEIIb* en el trigo. La identificación de dicha mutación es favorecida por el inesperado resultado de que los dos genes se encuentran estrechamente ligados en el trigo, en contraste con el maíz o el arroz. Las deleciones en un gen pueden extenderse fácilmente al otro gen, proporcionando un alelo nulo (mutación nula) para ambos genes. Este conocimiento también ayuda al cribado de variantes naturales que sean mutantes en ambos genes en por lo menos un genoma de trigo, y permite un cribado más sencillo para producir trigo con mutaciones combinadas en ambos genes en dos o tres genomas. Dicho trigo proporciona una fuente no transgénica rica en amilosa de grano de trigo y productos del mismo.

Las mutaciones en los genes codificantes de *SBEIIa* o de otros enzimas implicados en la síntesis de la amilopectina generalmente provocarán una proporción incrementada de contenido de amilosa. La cantidad de amilosa por grano individual puede incrementarse como consecuencia del desvío del flujo de carbono desde la amilopectina a la amilosa, o puede reducirse en el caso de que se produzca una reducción significativa de la producción de almidón por grano. En cualquier caso, se incrementa el nivel relativo de amilosa como porcentaje del almidón.

Las semillas con gránulos de almidón que presentan una forma distorsionada se han informado en la cebada rica en amilosa (Morell *et al.*, 2003) y en maíz bajo en amilopectina (LAPS) que presenta aproximadamente 90% de amilosa en el almidón (Sidebottom *et al.*, 1998).

La birrefringencia es la capacidad de una sustancia de refractar luz en dos direcciones; esto produce una cruz negra denominada "cruz maltesa" en cada gránulo de almidón al observarlo con un microscopio de luz polarizada. La birrefringencia es un indicador del grado de organización estructural ordenada de los polímeros dentro de los gránulos (Thomas y Atwell, 1999). La pérdida de birrefringencia en los gránulos del almidón se correlaciona generalmente bien con un contenido incrementado de amilosa.

#### *Adecuado para la producción de alimentos*

En otro aspecto, la invención proporciona trigo que resulta útil para la producción de alimentos, presentando el grano almidón que comprende un contenido relativamente alto de amilosa y un contenido reducido de amilopectina. Preferentemente, la planta del trigo a partir de la que se obtiene el grano presenta un nivel reducido de actividad de *SBEIIa* en el endospermo durante el desarrollo. La planta de trigo de la presente invención resulta útil para la producción de alimentos y en particular para la producción comercial de alimentos. Dicha producción de alimentos podría incluir la preparación de harina, masa u otros productos que podrían ser un ingrediente en la producción comercial de alimentos.

El fondo genético deseado del trigo incluye consideraciones de rendimiento agronómico y otras características. Entre dichas características puede incluirse si se desea un tipo invernal o primaveral de trigo, el rendimiento agronómico, la resistencia a enfermedades y la resistencia al estrés abiótico. En Australia, puede resultar deseable cruzar el rasgo alterado del almidón en cultivos del trigo tales como Baxter, Kennedy, Janz, Frame, Rosella, Cadoux, Diamondbird u otras variedades cultivadas comúnmente. Los ejemplos proporcionados son específicos de una región de producción de Australia, y otras variedades resultarán adecuadas para otras regiones de cultivo. Resulta preferido que la variedad de trigo de la invención proporcione un rendimiento no inferior a 80% del correspondiente a la variedad de tipo salvaje en por lo menos algunas regiones de cultivo, más preferentemente no inferior a 90%, y todavía más preferentemente no inferior a 95%. El rendimiento puede medirse fácilmente en ensayos de campo contaminados.

En formas de realización adicionales, el contenido de almidón del grano es de por lo menos aproximadamente 25%, 35%, 45% ó 55% a 65% (p/p). El trigo de tipo salvaje cultivado comercialmente presenta un contenido de almidón habitualmente comprendido en el intervalo de entre 55% y 65%, dependiendo en parte en el cultivar que se cultive. Alternativamente, el grano de la invención presenta un contenido de almidón de por lo menos 90% del de grano procedente de un trigo equivalente aunque no alterado. Los contenidos de almidón más bajos que los del tipo salvaje probablemente son una consecuencia de los niveles reducidos de amilopectina. Incluso con un menor contenido de almidón, el grano todavía podría resultar útil para la producción comercial de alimentos debido al valor relativamente elevado de los productos ricos en amilosa. Entre otras características deseables se incluyen la capacidad de moler el grano, en particular la dureza del mismo. Otro aspecto que podría incrementar el valor de una planta de trigo es el grado de extracción del almidón del grano, resultando más útiles las tasas más altas de extracción. El tamaño del grano también es otra característica que podría impactar sobre la utilidad comercial de una planta; de esta manera, el tamaño del grano puede presentar un impacto sobre la facilidad u otro aspecto con el que puede molerse el grano. Por ejemplo, una morfología alargada del grano puede dificultar la molienda y el procesamiento.

Un grano más lleno puede resultar más deseable en términos de alcanzar rendimientos mayores y de poder conseguir determinados beneficios de la invención, tales como la producción de almidón con niveles elevados de amilosa, o en el almidón alternativo, con una distribución alterada de las longitudes de cadena. De esta manera, el grano preferentemente presenta un fenotipo no-arrugado. Sin embargo, pueden conseguirse mejor otros aspectos

de la invención con un grano menos lleno. De esta manera, la proporción de la capa de aleurona o germen o proteína a almidón puede ser más alta en el grano menos lleno, proporcionando de esta manera una harina de trigo u otro producto con un mayor contenido de los constituyentes beneficiosos de la capa de aleurona o de proteínas. El producto de capa de aleurona rica en constituyentes puede ser, de esta manera, más rico en determinadas vitaminas tales como folato, o puede ser más rico en determinados minerales tales como calcio, lo que combinado con niveles más altos de resistencia del almidón podría proporcionar efectos sinérgicos tales como proporcionar una incorporación incrementada de minerales en el intestino grueso.

El almidón se aísla fácilmente a partir del grano del trigo utilizando procedimientos estándares, por ejemplo el procedimiento de Schulman *et al.*, 1991. A escala industrial puede utilizarse la molienda en húmedo o en seco. El tamaño del gránulo de almidón resulta importante en la industria del procesamiento del almidón, en donde se separan los gránulos A, más grandes, de los gránulos B, más pequeños. El almidón obtenido del grano de la planta del trigo de la invención presenta un contenido relativo alto de amilosa.

#### Características físicas del almidón alterado

La gelatinización es el colapso (ruptura) inducido por calor del orden molecular dentro del gránulo de almidón en exceso de agua, con cambios concomitantes irreversibles de propiedades tales como el hinchado granular, la fusión de cristalita, la pérdida de birrefringencia, el desarrollo de viscosidad y la solubilización del almidón. El almidón rico en amilosa de mutantes ae (extensor de amilosa) del maíz muestran una temperatura de gelatinización más alta que el maíz normal (Fuwa *et al.*, 1999; Krueger *et al.*, 1987). Por otra parte, el almidón procedente de los mutantes sex6 de la cebada que carecen de actividad de almidón sintasa Ila presentaban temperaturas de gelatinización más bajas y la entalpía del pico de gelatinización era más bajo que el de las plantas de control (Morell *et al.*, 2003).

En otro aspecto de la invención, el almidón presenta una temperatura alterada de gelatinización según medición mediante calorimetría de barrido diferencial. Ésta puede encontrarse incrementada o reducida en comparación con el almidón de las plantas de tipo salvaje. La temperatura alterada de gelatinización puede encontrarse adicionalmente al contenido relativamente alto de amilosa. La temperatura de gelatinización del almidón de trigo de tipo salvaje típicamente es de aproximadamente 61°C (Rahman *et al.*, 2000) para la temperatura del primer pico, definido como la temperatura de inicio, medida mediante calorimetría de barrido diferencial.

El almidón también puede caracterizarse a partir de su tasa de hinchado en agua en exceso caliente en comparación con el almidón de tipo salvaje. El volumen de hinchado típicamente se mide mezclando un almidón o harina con un exceso de agua y calentando hasta temperaturas elevadas, típicamente superiores a 90°C. A continuación, se recoge la muestra mediante centrifugación y se expresa el volumen de hinchado como masa de material sedimentado dividido por el peso seco de la muestra. Una característica de hinchado reducido resulta útil en el caso de que se desee incrementar el contenido de almidón de una preparación alimenticia, en particular de una preparación alimenticia hidratada.

La estructura del almidón del trigo de formas seleccionadas de la presente invención también puede diferir en el aspecto de que el grado de cristalinidad es menor en comparación con el almidón normal aislado del trigo. La cristalinidad reducida de un almidón también se cree que se asocia a propiedades organolépticas mejoradas y que contribuye a una sensación en boca más suave. De esta manera, el almidón adicionalmente puede mostrar una cristalinidad reducida, resultando de niveles reducidos de actividad de uno o más enzimas de síntesis de la amilopectina. La cristalinidad típicamente se investiga mediante cristalografía de rayos X.

Una medida de una estructura alterada de la amilopectina es la distribución de longitudes de cadena, o el grado de polimerización, del almidón. La distribución de las longitudes de cadena puede determinarse mediante la utilización de electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) tras la desramificación de la isoamilasa. La amilopectina del almidón de la invención puede presentar una distribución de longitudes de cadena comprendida en el intervalo de entre 5 y 60, que es mayor que la distribución del almidón de plantas de tipo salvaje tras la desramificación. El almidón con longitudes de cadenas mayores también presentará una reducción correspondiente de la frecuencia de ramificación. De esta manera, el almidón también puede presentar una distribución de longitudes de cadena más largas de la amilopectina en la amilopectina todavía presente.

#### Características de los alimentos

El almidón es la fuente principal de carbohidratos en la dieta humana, y el grano de la invención y los productos derivados a partir del mismo pueden utilizarse para preparar alimentos. Los alimentos pueden ser consumidos por el ser humano o por animales, por ejemplo en la producción de ganado o los alimentos para mascotas. El grano derivado de la planta del trigo alterada puede utilizarse fácilmente en procedimientos de procesamiento de alimentos, y por lo tanto la invención incluye grano molido, triturado, tronzado, perlado o laminado, o productos obtenidos a partir del grano tratado o integral de la planta del trigo a la que se ha hecho referencia anteriormente, incluyendo la harina. Estos productos seguidamente pueden utilizarse en diversos productos alimenticios, por ejemplo productos farináceos tales como panes, pasteles, galletas y similares, o aditivos alimenticios tales como espesantes o agentes ligantes, o para preparar bebidas, fideos, pasta o sopas rápidas. El grano o productos

derivados a partir del grano de la invención resultan particularmente deseado en cereales para el desayuno o como productos extruidos. Los almidones ricos en amilosa de la invención también pueden utilizarse para formar geles de alta resistencia que resultan útiles en la industria pastelera, o que permiten tiempos más bajos de moldeo y curado. También pueden utilizarse como recubrimiento, por ejemplo para reducir la absorción de aceite en las patatas fritas o en otros alimentos.

*Fibra dietética*

La fibra dietética, en la presente memoria, es el carbohidrato, y los productos de digestión de los carbohidratos que no son absorbidos en el intestino delgado de las personas sanas entran en el intestino grueso. Entre estos productos se incluyen el almidón resistente, los  $\beta$ -glucanos y otros polímeros de carbohidrato solubles e insolubles. Se pretende que comprende aquella parte de los carbohidratos que es fermentable, por lo menos parcialmente, en el intestino grueso por parte de la microflora residente.

El almidón de la invención preferentemente contiene niveles relativamente altos de fibra dietética, más particularmente amilosa. El contenido de fibra dietética del grano de la presente invención puede resultar o no únicamente del contenido relativo incrementado de amilosa en el endospermo.

También surgen aspectos de la presente invención a partir de la combinación de la capa de aleurona y el germen en combinación con los niveles elevados de fibra dietética. Concretamente, lo anterior puede surgir en el caso de que se encuentren niveles relativos más altos de aleurona o de germen en el grano. En el caso de que el grano del trigo se encuentre ligeramente arrugado, el endospermo se encuentra presente en cantidades reducidas y la capa de aleurona y germen se encuentran presentes en cantidades relativamente elevadas. De esta manera, el trigo presenta un nivel relativamente alto de determinados elementos beneficiosos o vitaminas en combinación con un contenido elevado de almidón resistente, incluyendo dichos elementos cationes divalentes,  $Ca^{++}$  biodisponible y vitaminas tales como folato o antioxidantes tales como tocoferoles o tocotrienoles. Una forma específica de producto molido podría ser en la que la capa de aleurona se encuentra incluida en el producto molido. Puede llevarse a cabo un procedimiento particular de molienda para incrementar la cantidad de capa de aleurona en el producto molido. De esta manera, cualquier producto derivado del grano molido o tratado de otro modo para que incluya la capa de aleurona y el germen presentará beneficios nutricionales adicionales, sin necesidad de añadir estos elementos de fuentes separadas.

*Almidón resistente*

Se define el almidón resistente como la suma del almidón y los productos de digestión del almidón no absorbidos en el intestino delgado de seres humanos sanos pero que entra en el intestino grueso. De esta manera, el almidón resistente excluye los productos digeridos y absorbidos en el intestino delgado. Entre los almidones resistentes se incluyen el almidón físicamente inaccesible (forma RS1), los gránulos resistentes (RS2), los almidones retrogradados (RS3) y los almidones químicamente modificados (RS4). La estructura alterada del almidón y en particular los niveles altos de amilosa del almidón de la invención dan lugar a un incremento del almidón resistente al consumirlo en los alimentos. El almidón puede encontrarse en forma RS1, siendo parcialmente inaccesible a la digestión. La asociación de almidón-lípido medida por la cristalinidad del complejo V también es probable que contribuya al nivel de almidón resistente.

Se entiende que un beneficio de la presente invención es que proporciona productos que son de beneficio nutricional particular y además lleva a cabo lo anterior sin necesidad de modificar el almidón ni otros constituyentes del grano del trigo. Sin embargo, puede desearse realizar modificaciones en el almidón o en otro constituyente del grano, y la invención comprende dicho constituyente modificado. Los procedimientos de modificación son bien conocidos y entre ellos se incluyen la extracción del almidón o de otro constituyente mediante procedimientos convencionales y la modificación de los almidones para incrementar la forma resistente. El almidón puede modificarse mediante tratamiento con calor y/o humedad, físicamente (por ejemplo la molienda con bolas), enzimáticamente (utilizando, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa o la  $\beta$ -amilasa, la pululanasa o similares), la hidrólisis química (húmeda o seca utilizando reactivos líquidos o gaseosos), la oxidación, el enlace cruzado con reactivos difuncionales (por ejemplo trimetafosfato sódico, oxilcouror fosforoso) o la carboximetilación.

*Índice glucémico*

El índice glucémico (GI) se refiere a la tasa de digestión de los alimentos que comprenden almidón y es una comparación entre el efecto de un alimento de ensayo y el efecto del pan blanco o la glucosa sobre las excursiones de concentración de la glucosa en sangre. El índice glucémico es una medida del efecto probable del alimento en cuestión sobre la concentración sérica post-prandial de glucosa y la demanda de insulina para la homeostasis de la glucosa en sangre. Una característica importante proporcionada por los alimentos de la invención es un índice glucémico reducido. Además, los alimentos pueden presentar un nivel bajo de digestión final y en consecuencia ser relativamente hipocalóricos. Un producto de bajo contenido calorífico puede basarse en la inclusión de harina producida a partir de grano de trigo molido. Dichos alimentos pueden presentar el efecto de ser saciantes, mejorar la

salud intestinal, reducir la glucosa sérica postprandial y la concentración de lípidos, así como proporcionar un producto alimenticio de bajo contenido calórico.

#### Aplicaciones no alimenticias

5 La presente invención proporciona almidones modificados o mejorados que presentan niveles elevados de amilosa o niveles reducidos de amilopectina, cuyas propiedades satisfacen cualquiera de entre diversos requisitos industriales. El almidón se utiliza ampliamente en industrias no alimenticias, entre ellas las industrias de películas, papel, textiles, corrugados y adhesivos (Young, 1984), por ejemplo como agente encolante. El almidón de trigo puede utilizarse  
10 como sustrato para la producción de jarabes de glucosa o para la producción de etanol. Las propiedades físicas del almidón no modificado limita su utilidad en algunas aplicaciones y con frecuencia impone un requisito de modificación química que puede ser caro o presentar otras desventajas. La invención proporciona almidón para el que pueden resultar necesarias menos modificaciones posrecolección, en particular debido al contenido reducido de amilopectina, en combinación con otras propiedades físicas. Por ejemplo, puede alterarse la temperatura de  
15 gelatinización, la resistencia a tensiones de cizalla, la resistencia de la película y/o la resistencia al agua de los almidones y de los productos preparados a partir del grano de la presente invención. El almidón también puede utilizarse para preparar un material de empaquetamiento de relleno suelto biodegradable que puede utilizarse como sustituto del poliestireno o de otros materiales de empaquetamiento.

20 Se entenderá que, aunque se proporcionan diversas indicaciones respecto a aspectos de la presente invención, la invención puede residir en combinaciones de dos o más aspectos de la presente invención.

#### Ejemplos

##### 25 Ejemplo 1. Materiales y procedimientos

##### *Determinación y análisis de carbohidratos*

30 Se aisló almidón a partir de grano de trigo utilizando el procedimiento de Schulman *et al.* (1991). Se determinó el contenido de almidón utilizando el kit de análisis del almidón total suministrado por Megazyme (Bray, Co., Wicklow, República de Irlanda). A continuación, se comparó el contenido de almidón con el de las plantas de control. La substracción del peso de almidón del peso total del grano, proporcionando un contenido total no almidón del grano, determina si la reducción de peso total se debe a una reducción del contenido de almidón.

35 Se determinó el contenido de amilosa de muestras de almidón mediante el procedimiento colorimétrico (yodométrico) de Morrison y Laignelet (1983) con ligeras modificaciones, del modo siguiente. Se introdujeron aproximadamente 2 mg de almidón (con precisión de 0,1 mg) en 2 ml un tubo de tapa enroscable con una arandela de goma en la tapa. Para eliminar los lípidos, se mezcló 1 ml de metanol al 85% (v/v) con el almidón y se calentó el tubo en un baño de agua a 65°C durante 1 hora con agitación con vórtex ocasional. Tras centrifugar a 13.000g  
40 durante 5 minutos, se separó cuidadosamente el sobrenadante y se repitieron las etapas de extracción. A continuación, se secó el almidón a 65°C durante 1 hora y se disolvió en solución de urea-dimetilsulfóxido (UDMSO; 9 volúmenes de dimetilsulfóxido por cada volumen de urea 6 M), utilizando 1 ml de UDMSO por cada 2 mg de almidón (pesados tal como anteriormente). Inmediatamente, la mezcla se agitó con vórtex vigorosamente y se incubó en un baño de agua a 95°C durante 1 hora con agitación con vórtex intermitente para la disolución completa del almidón.  
45 Se trató una alícuota de la solución de almidón-UDMSO (50 µl) con 20 µl de reactivo I<sub>2</sub>-KI que contenía 2 mg de yodo y 20 mg de yoduro potásico por ml de agua. La mezcla se enrasó a 1 ml con agua. Se midió la absorbancia de la mezcla a 650 nm mediante la transferencia de 200 µl a la microplaca y leyendo la absorbancia utilizando un lector de microplacas de precisión Emax (Molecular Devices, USA). Se prepararon muestras estándares que contenían 0 a 100% de amilosa y 100% a 0% de amilopectina a partir de amilosa de patata y amilopectina de maíz (o de patata)  
50 (Sigma) y se trataron al igual que las muestras de ensayo. Se determinó el contenido de amilosa (porcentaje de amilosa) a partir de los valores de absorbancia utilizando una ecuación de regresión derivada de las absorbancias de las muestras estándares. También se llevó a cabo el análisis de la proporción amilosa/amilopectina de los almidones no desramificados, según Case *et al.* (1998) o mediante un procedimiento de HPLC para separar almidones desramificados tal como describen Batey y Curtin (1996).

55 La distribución de las longitudes de cadena en el almidón puede analizarse mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) utilizando una unidad de electroforesis capilar según Morell *et al.* (1998), tras la desramificación de las muestras de almidón. Los perfiles de la temperatura de gelatinización de las muestras de almidón pueden medirse en un calorímetro de barrido diferencial Pyris 1 (Perkin Elmer, Norwalk CT, USA). La viscosidad de las soluciones de almidón puede medirse en un analizador Rapid-Visco-Analyser (RVA, Newport Scientific Pty Ltd., Warriewood, Sydney), por ejemplo utilizando las condiciones informadas por Batey *et al.*, 1997. Entre los parámetros que pueden medirse se incluyen la viscosidad pico (la viscosidad máxima de la pasta caliente), la fuerza de agarre, la viscosidad final y la temperatura de gelatinización. El volumen de hinchado de la harina o el almidón puede determinarse según el procedimiento de Konik-Rose *et al.* (2001). La incorporación de agua se mide  
65 pesando la muestra antes y después de mezclar la muestra de harina o almidón en agua a temperaturas definidas y tras la recolección del material gelatinizado.



Los niveles de  $\beta$ -glucanos pueden determinarse utilizando el kit suministrado por Megazyme (Bray, Co., Wicklow, República de Irlanda).

5 *Análisis de la expresión de proteínas en el endospermo.*

Se analizó la expresión específica de proteínas mediante procedimientos de transferencia western. Se diseccionó y extrajo el endospermo separándolo de todos los tejidos maternos y se homogenizaron muestras de aproximadamente 0,2 mg en 600  $\mu$ l de tampón KPi 50 mM ( $K_2HPO_4$  42 mM y  $KH_2PO_4$  8 mM), pH 7,5, que contenía EDTA 5 mM, glicerol al 20%, DTT 5 mM y Pefabloc 1 mM. Las muestras molidas se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 g y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la utilización. Para la estimación del total de proteínas, se construyó una curva estándar utilizando las alícuotas de 0, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ l de estándar BSA 0,25 mg/ml. Las muestras (3  $\mu$ l) se enrasaron a 100  $\mu$ l con agua destilada y se añadió a cada una 1 ml de reactivo Coomassie Plus Protein. Se leyó la absorbancia tras 5 minutos a 595 nm, utilizando la muestra cero de BSA de la curva estándar como el blanco, y se determinaron los niveles de proteínas en las muestras. Las muestras que contenían 20  $\mu$ g de proteínas totales de cada endospermo se corrieron en un gel de poliacrilamida no desnaturante al 8% que contenía Tris-HCl 0,34 M (pH 8,8), acrilamida (8,0%), persulfato amónico (0,06%) y TEMED (0,1%). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa según Morell *et al.* (1997) y se sometieron a reacción inmunológica con anticuerpos específicos para SBEIIa o SBEIIb.

20 **Ejemplo 2. Constructos genéticos para la alteración de la expresión de SBEIIa y SBEIIb del trigo**

Se prepararon constructos de ARN dúplex (ARNdc) para reducir la expresión de los genes SBEIIa o SBEIIb del trigo. En estos constructos, la secuencia deseada de ácidos nucleicos correspondiente a parte de los genes SBEIIa o SBEIIb se observó en las orientaciones tanto de sentido como antisentido respecto al promotor, de manera que el ARN expresado comprendía regiones complementarias que podían aparearse para formar un ARN dúplex o de doble cadena. Una región espaciadora entre las secuencias de sentido y antisentido comprendía una secuencia de intrón que, al transcribirla como parte del ARN en la planta transformada, se despalmaría para formar una estructura dúplex "de horquilla" apretada. Se ha encontrado que la inclusión de un intrón incrementa la eficiencia del silenciamiento génico proporcionado por los constructos de ARN dúplex (Smith *et al.*, 2000). El ácido nucleico deseado se ligó a una secuencia de promotor de glutenina de alto peso molecular (HMWG) (promotor del gen de la subunidad Dx5, nº de acceso X12928, Anderson *et al.*, 1989) y a la secuencia de terminador del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium* (nos3'). Esto proporcionó una expresión específica del endospermo de las secuencias de ARNdc.

El constructo de ARN dúplex de SBEIIa contenía 1.536 pb de secuencia de nucleótidos amplificado mediante PCR del gen SBEIIa del trigo (número de acceso GenBank AF338431, ver la figura 1). Lo anterior incluía: una secuencia de 468 pb que comprendía la totalidad de los exones 1 y 2 y parte del exón 3 (posiciones nucleótidas 1.508 a 1.336, 1.664 a 1.761 y 2.038 a 2.219 en la figura 1), con los sitios de restricción EcoRI y KpnI en ambos lados (fragmento 1), una secuencia de 512 pb que consistía de parte de los exones 3 y 4 y la totalidad del intrón 3 de SBEIIa (posiciones nucleótidas 2.220 a 2.731 en la figura 1) con los sitios KpnI y SacI en ambos lados (fragmento 2) y un fragmento de 528 pb que consistía de los exones completos 1, 2 y 3 de SBEIIa (posiciones nucleótidas 1.508 a 1.336, 1.664 a 1.761 y 2.038 a 2.279 en la figura 1) con los sitios BamHI y SacI en ambos lados (fragmento 3). A continuación, se ligaron los fragmentos 1, 2 y 3 de manera que la secuencia del fragmento 3 se encontraba ligada al fragmento 2 en orientación antisentido respecto al fragmento 1. Se generaron inicialmente los constructos de ARN dúplex en el vector pDVO3000 que contenía la secuencia de promotor HMWG y el terminador nos3'. El constructo génico en el vector pDVO3000 se denominó pDVO3-IIIa y el gen de ARN dúplex se denominó SBEIIa-dc.

La estrategia para el constructo de ARN dúplex de SBEIIb fue similar. El constructo de SBEIIb contenía un fragmento de 1.607 pb amplificado mediante PCR del gen SBEIIb del trigo (la secuencia se indica de manera general en la figura 2). Ésta incluía una secuencia de 471 pb que comprendía la totalidad de los exones 1 y 2 y parte del exón 3 (posiciones nucleótidas 489 a 640, 789 a 934 y 1.598 a 1.769 en la figura 2), con los sitios de restricción EcoRI y KpnI en ambos lados (fragmento 1), una secuencia de 589 pb que consistía de parte de los exones 3 y 4 y la totalidad del intrón 3 de SBEIIb (posiciones nucleótidas 1.770 a 2.364 en la figura 2) con los sitios KpnI y SacI en ambos lados (fragmento 2) y un fragmento de 528 pb que consistía de los exones completos 1, 2 y 3 de SBEIIb (posiciones nucleótidas 489 a 640, 789 a 934 y 1.598 a 1.827 en la figura 2) con los sitios BamHI y SacI en ambos lados (fragmento 3). A continuación, se ligaron los fragmentos 1, 2 y 3 de manera que la secuencia del fragmento 3 se encontrara ligada al fragmento 2 en orientación antisentido respecto al fragmento 1. El constructo del gen de ARN dúplex de SBEIIb en el vector pDVO3000 se denominó pDVO3-IIIb y el gen de ARN dúplex se denominó SBEIIb-dc. Se muestran esquemáticamente los constructos en la figura 3.

Cada uno de los casetes de expresión de ARNdc se recortó a continuación con el enzima de restricción XhoI y se insertó en los vectores binarios de transformación pGB53 y pBIOS340. Se creó pGB53 a partir de pSB11 (Komari *et al.*, 1996) mediante la introducción del gen codificante de resistencia a asulam (*suI*) regulado por el promotor actina del arroz, dejando un sitio XhoI único contiguo al límite derecho del ADN-T para la introducción de un gen de interés. De manera similar, se creó pBIOS340 a partir de pSB1 (Komari *et al.*, 1996) mediante la introducción de un gen *nptII*

codificante de resistencia a canamicina y a geneticina, contaminado por el promotor de actina del arroz, nuevamente dejando un sitio *XhoI* único contiguo al límite derecho. Los constructos de SBEIIa en pGB53 y pBIOS340 se denominaron pCL51 y pCL59, respectivamente; y los constructos de SBEIIb en pGB53 y pBIOS340 se denominaron pCL54 y pCL60, respectivamente.

### 5 Ejemplo 3. Transformación del trigo.

10 Se introdujeron constructos genéticos para la transformación del trigo mediante electroporación en la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 que portaba el plásmido pAL4404 y pSB1 de *vir*, con posterior selección en medio con espectinomicina. Las cepas transformadas de *Agrobacterium* se incubaron en medio YEP solidificado a 27°C durante 2 días. A continuación, se recogieron las bacterias y se resuspendieron en TSIM1 (medio MS con 100 mg/l de mioinositol, 10 g/l de glucosa, 50 mg/l de tampón MES, pH 5,5) que contenía acetosiringona 400 mM hasta una densidad óptica de 2,4 a 650 nm para la inoculación del trigo.

15 Se cultivaron plantas del trigo (diversidad NB1, una variedad de trigo Spring obtenida de Nickerson seeds Ltd., Rothwell, Lincs.) en un invernadero a 22°C/15°C temperatura diurna/nocturna con suplementación de luz para proporcionar un día de 16 horas. Los retoños se recolectaron aproximadamente 14 días después de la anthesis (embriones de aproximadamente 1 mm de largo) incluyendo 50 cm de tallo de los mismos. A continuación, se quitaron todas las hojas de los retoños excepto la hoja bandera, que se limpió para eliminar las esporas fúngicas contaminantes. Seguidamente, se retiraron las glumas de cada espiguilla y las lemas de los primeros dos ramilletes, con el fin de descubrir la semilla inmadura. Generalmente se descubrieron sólo estas dos semillas de cada espiguilla. Se llevó a cabo este procedimiento a lo largo de la longitud completa de la inflorescencia. A continuación, se pulverizaron las espigas con IMS al 70% a modo de breve esterilización superficial.

25 Se inocularon suspensiones de *Agrobacterium* (1 µl) utilizando una jeringa de Hamilton de 10 µl en la semilla inmadura aproximadamente en la posición de la interfaz escutelo: endospermo, de manera que se inoculasen todas las semillas descubiertas. A continuación, se introdujeron los retoños en agua, se cubrieron con una bolsa de plástico traslúcido para evitar la deshidratación de las semillas y se introdujeron en un incubador iluminado durante 3 días a 23°C, 16 horas de día, 45 Em<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> PAR. Tras 3 días de cocultivo, las semillas inmaduras inoculadas se sacaron y se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% (30 segundos), y después con lejía al 20% (Domestos, 20 minutos), seguido de un lavado intenso en agua destilada estéril. Los embriones inmaduros se aislaron asépticamente y se introdujeron en medio W3 (MS suplementado con 20 g/l de sacarosa y 2 mg/l de 2,4-D y se solidificaron con 6 g/l de agarosa de tipo I, Sigma) con la adición de 150 mg/l de timentina (W3T) y con el escutelo en la parte más superior (20 embriones en cada placa). Se sometieron los cultivos a 25°C a la luz (día de 16 horas, 80 Em<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> PAR). Se evaluó el desarrollo del eje embrionario de los embriones aproximadamente 5 días después del aislamiento y se extrajo el eje en caso necesario para mejorar la producción de callo. Se mantuvieron los embriones en W3T durante 4 semanas, con una transferencia a medio fresco 2 semanas después del aislamiento y se evaluaron para su capacidad embrionaria.

40 Tras 4 semanas de crecimiento, los callos derivados de los embriones inoculados eran muy similares a los callos de control obtenidos de embriones no inoculados sembrados en medio W3T. La presencia de bacterianas aparentemente no redujo sustancialmente la capacidad embrionaria de los callos derivados de los embriones inoculados. Los callos embrionarios se transfirieron a medio W3 con 2 mg/l de Asulam (en el que se utilizaron derivados de pGB53) o geneticina a 25 mg/l (derivados de pBIOS340) y 150 mg/l de timentina (W32AT). Los callos se mantuvieron en este medio durante 2 semanas adicionales y después se dividió cada callo en trozos de 2 mm de tamaño y se sembraron nuevamente en W32AT. Los embriones de control derivados de inoculaciones con LBA4404 sin constructos de vector binario no produjeron callos transformados en los medios de selección.

50 Tras 2 semanas adicionales de cultivo, se evaluaron todos los tejidos para el desarrollo de callos embrionarios: cualquier callo que mostrase indicios de desarrollo continuo tras 4 semanas de selección se transfirió a medio de regeneración (RMT - MS con 40 g/l de maltosa y 150 mg/l de timetina, pH 5,8, solidificado con 6 g/l de agarosa, Sigma tipo I). Los brotes se regeneraron dentro de las 4 semanas en este medio y después se transfirieron a MS30 con 150 mg/l de timentina para la elongación y enraizamiento de los brotes. A continuación, se transfirieron las plantas juveniles a tierra mixta y se dejaron en un banco de humidificación durante dos semanas y finalmente se transfirieron a un invernadero.

60 Se trató mediante este procedimiento un total de 3.217 embriones utilizando pCL54 y pCL60 (SBEIIb-dc) y 2.010 embriones utilizando pCL51 ó pCL59 (SBEIIa-dc) y 61 plantas se regeneraron a partir de callos para la transformación de IIb y 31 plantas se regeneraron a partir de callos para la transformación de IIa. La supervivencia en medio de selección sugería que se habían transformado con éxito con el constructo génico. Una gran mayoría de las plantas, aunque no todas, transformadas con el gen marcador seleccionable se esperaba que integrasen el gen inhibidor de *SBEIIa* o *SBEIIb*; estos pudieron distinguirse fácilmente tal como se describe en los ejemplos siguientes.

65 La recuperación de múltiples sucesos de integración estable con buen potencial de regeneración de los experimentos indicaba que el procedimiento de transformación mediante inoculación en semillas utilizado en la presente memoria era tan eficiente como otros procedimientos informados para el trigo. También pueden utilizarse

en el procedimiento cepas alternativas de *Agrobacterium*, tal como la cepa AGL1 o marcadores seleccionables tales como genes codificantes de resistencia a la higromicina.

#### Ejemplo 4. Análisis de transformantes del trigo.

Se determinó la transformación mediante uno o más de los procedimientos siguientes:

análisis de PCR para uno o más de los transgenes. El análisis de PCR se llevó a cabo en ADN genómico extraído de 1 a 2 cm<sup>2</sup> de material foliar fresco utilizando el procedimiento miniprep descrito por Stacey e Isaac (1994). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo, por ejemplo, utilizando los cebadores SBElIa-For: 5'-CCCGCTGCTTTGCTCATTG-3' [SEC ID n° 9] y SBElIa-Rev: 5'-GACTACGGAGCTCCACCTTC-3' [SEC ID n° 10], diseñados para amplificar un fragmento (462 pb) del gen *SBElIa*, o SBElIb-DupFor: 5'-AGATGTGAATGGCTGCTTGCTG-3' [SEC ID n° 11] y SBElIb-DupRev 5'-CAGGTCGACCATATGGGAGAGC-3' [SEC ID n° 12] para *SBElIb* (505 pb). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: "inicio en caliente" (94°C, 3 minutos), seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 segundos), hibridación (55°C, 30 s), extensión (73°C, 2 minutos), seguido de 1 ciclo a 73°C (5 minutos).

Se llevó a cabo un análisis de hibridación southern en ADN de una extracción a escala mayor (9 ml) procedente de tejido molido liofilizado (Stacey e Isaac, 1994). Se ajustaron las muestras de ADN a 0,2 mg/ml y se digirieron con enzimas de restricción tales como *HindIII*, *EcoRI* y *KpnI*. La digestión con enzimas de restricción, la electroforesis en gel y la transferencia al vacío se llevaron a cabo tal como describen Stacy e Isaac (1994). Las sondas marcadas con digoxigenina que incluían la región del intrón 3 de los constructos SBElI-dc se produjeron mediante PCR según el procedimiento de McCreery y Helentjaris (1994). La hibridación de las sondas con el filtro southern y la detección mediante quimioluminiscencia se llevaron a cabo según el procedimiento de McCreery y Helentjaris (1994).

Los resultados de los análisis de PCR se resumen en la Tabla 2. Las plantas positivas para los transgenes tal como se muestra mediante PCR incluían 27 sucesos independientes de transformación para SBElIa-dc y 61 sucesos independientes para SBElIb-dc.

Tabla 2. Transformación de trigo con constructos de ARN dúplex de SBElIa y de SBElIb

Experimento n°	Nº de embriones inoculados	Nº de líneas regeneradas	Líneas positivas en la PCR
<b>Constructo de SBElIa-dc</b>			
44	242	1	1
50	169	3	3
52	158	3	3
58	163	2	2
61	195	1	1
72	185	1	0
83	241	1	1
84	242	1	1
85	153	5	5
109	262	13	10
Total	2010	31	27
<b>Constructo de SBElIb-dc</b>			
48	291	1	1
51	166	1	0
53	194	1	0
55	261	1	1
59	253	1	0
60	175	4	2
62	199	1	0
70	152	1	0
73	238	2	2
75	151	2	2
76	150	1	0
77	150	2	2
81	134	1	1
87	230	5	3
92	233	8	5
110	240	29	16
Total	3217	61	35

**Ejemplo 5. Análisis de granos procedentes de plantas transformadas con constructos de ARN dúplex**

*Morfología de los gránulos de almidón*

5 La morfología de los gránulos de almidón de semillas T1 maduras obtenidas de las plantas del trigo transformadas T0 se observó mediante microscopía óptica. Se analizaron diez granos individuales de cada una de 25 plantas T0 independientemente transformadas con SBEIIa-dc y 12 plantas independientemente transformadas con SBEIIb-dc. Se aplastó suavemente cada endospermo para liberar los gránulos de almidón, que se dispersaron en agua y se visualizaron bajo un microscopio óptico. De las 25 líneas de SBEIIa-dc analizadas, 12 presentaban granos con gránulos distorsionados (por ejemplo ver la figura 4), aunque la observación visual reveló niveles variables de distorsión en diferentes semillas. En contraste, ninguna de las 12 líneas de SBEIIb-dc mostró ninguna distorsión significativa de los gránulos de almidón en el endospermo al observarlas bajo microscopía óptica. Se resumen los resultados en las Tablas 3 y 4.

15 Tabla 3. Morfología de los gránulos de almidón de semillas T1 de líneas de trigo transgénico de SBEIIa-dc

Preparación nº	Línea nº	Morfología de los gránulos*
1	44,1a	+
2	50,1b	-
3	50,2b	+
4	50,3x	-
5	52,1a	+
6	52,2a	+
7	52,3a	+/-
8	58,1a	-
9	58,2a	-
10	61,2a	-
11	83,1b	+
12	84,1a	+/-
13	85,1a	+/-
14	85,2c	-
15	85,3a	-
16	85,4b	+
17	85,5a	-
18	109,1a	-
19	109,2c	+
20	109,3b	+
21	109,4e	-
22	109,7b	-
23	109,8c	-
24	109,10a	+
25	109,11x	+

\*Se observó la morfología de los gránulos de almidón de 10 semillas de cada línea.  
La morfología se indica con '+' en el caso de que la totalidad de las diez semillas presentase una morfología normal de los gránulos; '-' en el caso de la presencia de semillas severamente distorsionadas, y '+/-' en el caso de la presencia de alguna anomalía, es decir, por lo menos algunas semillas con alguna distorsión pero ninguna con distorsión severa.

Tabla 4. Morfología de los gránulos de almidón de semillas T1 de líneas de trigo transgénico de SBEIIb-dc

Preparación nº	Líneas	Morfología de los gránulos
1	48,1a	+
2	55,1a	+
3	60,1a	+
4	60,4a	+
5	73,1f	+
6	75,1c	+
7	75,3x	+
8	77,1c	+

(continuación)		
9	77,2c	+
26	110,16b	+
27	110,17b	+
28	110,18a	+

'+' indica que la totalidad de la diez semillas de cada línea presentaba una morfología normal de los gránulos de almidón

5 La observación de los gránulos de almidón bajo luz polarizada reveló una reducción significativa de la birrefringencia en los gránulos distorsionados (figura 5) para el grano SBElIa-dc. Se observó la pérdida de birrefringencia en 94% de los gránulos en semillas de la línea 50.1b, correlacionándose con su fenotipo distorsionado, mientras que los gránulos normales de otra semilla de la misma línea mostraban birrefringencia completa (Tabla 5). Se cree que la  
10 semilla con gránulos normales es un segregante que no presenta el transgén y que por lo tanto es fenotípicamente normal.

Tabla 5. Birrefringencia de gránulos de almidón de semillas T1 de la línea 50.1b de trigo transgénico de SBElIa-dc

Semillas de la línea 50.1b	Campo de microscopía	Nº de gránulos que no mostraba BF	Nº de gránulos que mostraba BF parcial	Nº de gránulos que mostraba BF completa
Semillas con gránulos distorsionados	1	55	2	1
	2	73	1	0
	3	44	1	0
	4	92	3	2
	5	46	2	7
	6	46	2	3
Total		356 (93,7%)	11 (2,9%)	13 (3,4%)
Semillas con gránulos normales	1	1	3	110
	2	1	1	38
	3	3	4	90
	4	0	3	61
	5	3	3	59
	6	1		0 30
Total		9 (2,2%)	14 (3,4%)	388 (94,4%)

15 Los resultados de microscopía óptica fueron confirmados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los gránulos de almidón. Para ello, se bombardeó el almidón purificado con oro y se escaneó a 15 kV a temperatura ambiente.

20 *Peso del grano.*

Se pesaron granos individuales de plantas transformadas con SBElIa-dc, cultivadas bajo condiciones equivalentes en el invernadero (Tabla 6). Los granos que presentaban gránulos severamente distorsionados de las plantas 50.1b, 58.2a, 61.2a y 109 no presentaban un peso medio significativamente reducido en comparación con los granos de plantas de tipo salvaje cultivadas bajo las mismas condiciones. Por lo tanto, la producción de almidón aparentemente no resultó reducida sustancialmente incluso en las semillas con gránulos de almidón altamente distorsionados. Estos datos también sugieren que el rendimiento de trigo cultivado en el campo con actividad reducida de SBElIa en el endospermo puede considerarse normal.

30 Tabla 6. Peso de los granos de semillas T1 procedentes de líneas de trigo transgénico SBElIa-dc

Línea transgénica	Semilla nº	Peso de la semilla (mg)	Morfología de los gránulos de almidón*	Línea transgénica	Semilla nº	Peso de la semilla (mg)	Morfología de los gránulos de almidón*
50,1b	1	16,9	+	61,2a	1	50,7	+
	2	49,8	+		2	49,0	+/-
	3	46,9	-		3	49,8	-
	4	50,0	-		4	47,0	-
	5	45,4	-		5	48,6	-
	6	42,6	-		6	46,2	-

(continuación)							
	7	39,9	+/-		7	42,2	+
	8	41,0	+		8	50,4	-
	9	39,5	-		9	39,7	-
	10	37,0	+/-		10	46,3	-
58,2a	1	44,0	-	109,7b	1	40,1	-
	2	37,4	+		2	34,6	-
	3	48,8	-		3	43,7	-
	4	43,2	+		4	38,8	-
	5	46,2	-		5	33,8	+/-
	6	42,1	+		6	31,1	+/-
	7	43,5	+/-		7	35,9	+
	8	45,7	-		8	44,3	+/-
	9	38,8	-		9	37,7	-
	10	38,1	+/-		10	41,4	-

'+' gránulos de almidón normales, '-' gránulos muy deformados, +/- deformación suave de los gránulos

*Análisis de proteínas SBElIa y SBElIb en endospermo de trigo transgénico T2*

5 Se analizaron las semillas (T2) de 13 plantas T1 transformadas con SBElIa-dc, que representaban 5 líneas transformadas independientemente, y de 9 plantas transformadas con SBElIb-dc, que representaban 3 líneas transformadas independientemente, para la expresión de las proteínas SBElIa y SBElIb en el endospermo mediante PAGE no desnaturizante y transferencia western. Las plantas SBElIa-dc eran todas de líneas que presentaban una morfología anormal de los gránulos de almidón, mientras que las líneas SBElIb-dc todas presentaban una morfología normal de los gránulos, tal como se ha indicado anteriormente. El anticuerpo utilizado para la detección de SBElIa fue 3KLH, de conejos, que había sido cultivado contra el péptido sintético que presentaba la secuencia de aminoácidos AASPGKVLVPDESDDLGC [SEC ID nº 13], correspondiente a la secuencia del extremo N-terminal del SBElIa maduro, y se diluyó 1:5.000 para la utilización. El anticuerpo utilizado para la detección de SBElIb era R6, cultivado contra el péptido sintético que presenta la secuencia de aminoácidos AGGPSGEVMIGC [SEC ID nº 14], correspondiente a la secuencia deducida del extremo N-terminal del SBElIb maduro y diluido 1:6.000 antes de la utilización. El anticuerpo secundario utilizado fue el conjugado GAR-peroxidasa de rábano picante (dilución 1:3.000). Se revelaron las bandas inmunorreactivas utilizando un sistema de detección Amersham ECL.

20 Se analizaron los endospermos de cada uno de siete granos en desarrollo (15 días después de la antesis) de cada una de 22 plantas T2, ya que se esperaba que algunas de las plantas serían heterocigóticas para el transgén. Doce de las 13 plantas SBElIa-dc produjeron progenie T2 que mostraba niveles reducidos de proteína SBElIa en el endospermo. La totalidad de las siete semillas de una línea (50.3x9) aparentemente no presentaba SBElIa en absoluto, mientras que la totalidad de las siete semillas de otras cuatro plantas mostró una expresión evidentemente reducida de SBElIa (Tabla 7). Estas podrían representar líneas que eran homocigóticas para el transgén. Siete líneas eran segregantes por la ausencia de SBElIa o los niveles reducidos de SBElIa, o en algunos casos ninguna reducción aparente de la proteína, y estas líneas probablemente representan heterocigotos para el transgén. La decimotercera línea (50.3x6) era homocigótica para la expresión de tipo salvaje (Tabla 7).

30 Tabla 7. Análisis de transferencia western de proteínas del endospermo de líneas T2 de trigo transgénico de SBElIa-dc

Línea transgénica	Gen diana	Morfología de los gránulos T1	Segregación de la banda de proteína SBElI en los granos T2
50,3x,6	SBElIa	+	Uniforme para la expresión de tipo salvaje (+)
58,1a,3	"	-	Segregante para +/- y -
58,1a,7	"	-	Segregante para +, +/- y -
58,1a,9	"	-	Segregante para +, +/- y -
50,1b,3	"	-	Uniforme para +/-
50,1b,4	"	-	Segregante para +/- y -
50,1b,5	"	-	Uniforme para +/-
50,1b,9	"	-	Segregante para + y +/-
50,3x,9	"	-	Uniforme para -
61,2a,8	"	-	Uniforme para +/-

(continuación)			
61,2a,9	"	-	Segregante para +/- y -
61,2a,10	"	-	Uniforme para +/-
85,2c,2	"	-	Segregante para +/- y -
110,16b,14	SBEIIb	+	Uniforme para la expresión de tipo salvaje (+)
110,16b,2	"	+	Uniforme para -
110,16b,17	"	+	Uniforme para +
110,16b,5	"	+	Uniforme para -
110,16b,19	"	+	Uniforme para -
110,17b,3	"	+	Segregante para +/- y -
110,17b,6	"	+	Segregante para + y +/-
110,18a,9	"	+	Segregante para +/- y -
110,18a,17	"	+	Segregante para +, +/- y -

5 De las nueve líneas transgénicas de SBEIIb-dc sometidas a ensayo, tres (110.16b.2, 110.16b.5 y 110.16b.19) mostraron uniformemente la falta de expresión de *SBEIIb* en cada una de las siete semillas progenie, mientras que dos eran uniformes para la expresión de tipo salvaje y las cuatro restantes eran segregantes para la falta de expresión, la expresión reducida o de tipo salvaje (Tabla 7). Se cultivaron embriones de las semillas (rescate de embriones) para producir plantas T2 y semillas T3 que se cribaron mediante PCR y el análisis de la expresión de proteínas con el fin de confirmar el estado genético de las semillas T2 con respecto al transgén.

10 Estos datos indican que los constructos de ARN dúplex resultan efectivos para reducir la expresión de los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* en el endospermo del trigo. Los datos también indican que la reducción de la expresión de *SBEIIb* por sí sola no alteró sustancialmente la morfología de los gránulos de almidón.

15 La expresión del gen *SBEIIb* en semillas transgénicas que contenían el transgén SBEIIa-dc y que carecían de proteína SBEIIa y la expresión del gen *SBEIIa* en semillas que contenían SBEIIb-dc también se analizaron mediante el procedimiento de la transferencia western. Inesperadamente, las semillas transgénicas que comprendían SBEIIa-dc presentaban niveles muy reducidos de SBEIIb. Sin embargo, no se observó el efecto invertido en semillas transgénicas para SBEIIb-dc. La expresión de SBEIIa no se vio alterada en semillas en las que SBEIIb fue completamente silenciada por SBEIIb-dc. Posiblemente la expresión de SBEIIb resultó suprimida por el constructo de SBEIIa-dc debido a la homología de secuencias entre los genes en la región utilizada para el constructo dúplex, y también resulta posible que la actividad de SBEIIb se viese reducida por el transgén SBEIIa-dc por algún otro mecanismo.

25 Los niveles de expresión de los genes SBEIIa y SBEIIb también pueden determinarse específicamente al nivel de ARNm mediante técnicas estándares tales como la hibridación northern o los procedimientos de RT-PCR, por ejemplo mediante la utilización de sondas procedentes de regiones no conservadas o parejas de cebadores que se hibridan con sitios únicos en uno de los genes pero no en el otro, por ejemplo en las regiones 3' no traducidas. Dichas regiones o sitios pueden identificarse fácilmente mediante la comparación de las dos secuencias génicas.

### 30 **Ejemplo 6. Análisis del almidón de trigo transformado.**

*Niveles de amilosa y de amilopectina en grano de trigo transgénico.*

35 Se determinó el contenido de amilosa de almidones de seis muestras de semillas T1 agrupadas, tal como se describe en el Ejemplo 1. Las muestras de semillas agrupadas se obtuvieron de líneas de trigo transgénico del modo siguiente:

40 grupo 1 - semillas que presentaban gránulos de almidón distorsionados procedentes de la línea transgénica 85.2c de SBEIIa-dc,

grupo 2 - semillas que presentaban gránulos normales procedentes de la línea transgénica 85.1a de SBEIIa-dc,

grupo 3 - semillas que presentaban gránulos normales procedentes de la línea transgénica 110.18a de SBEIIb-dc,

45 grupo 4 - semillas que presentaban gránulos distorsionados de las líneas transgénicas 58.1a, 58.2a y 61.2a de SBEIIa-dc, agrupados,

grupo 5 - semillas que presentaban gránulos normales de la línea transgénica 83.1b de SBEIIa-dc,

50 grupo 6 - semillas que presentaban gránulos normales de la línea transgénica 75.3x de SBEIIb-dc.

Se realizó cada análisis utilizando cuatro réplicas de las muestras de almidón. La ecuación de regresión utilizada para convertir la absorbancia en contenido de amilosa para dichos análisis fue:  $Y=57,548x-8,793$ , en la que Y es el contenido de amilosa (%) y x es la absorbancia.

Se proporcionan los resultados en la Tabla 8. La presencia de gránulos de almidón distorsionados se asociaba claramente a un contenido incrementado de amilosa. El almidón procedente de granos con gránulos distorsionados de las líneas transgénicas de SBElIa-dc (grupos 1 y 4) presentaba un contenido de amilosa superior a 50%, mientras que los demás grupos de almidón, derivados de granos con gránulos de almidón normales, presentaban un contenido de amilosa de entre 21% y 26%. Lo anterior incluye almidón de la línea Ilb 110.18a que presentaba una expresión reducida de SBElIb (Tabla 8), lo que sugiere que la inactivación de SBElIb por sí solo en el trigo no incrementa sustancialmente los niveles de amilosas en el almidón de los granos.

Tabla 8. Contenido de amilosa estimado mediante el procedimiento yodométrico de las líneas de trigo transgénico

Muestra de almidón	Línea transgénica	Contenido de amilosa (%)			
		Réplica 1	Réplica 1	Réplica 1	Promedio
Grupo 1	85.2c	65,7	54,2	53,2	57,7
Grupo 2	85.1a	23,7	22,5	26,7	24,3
Grupo 3	110.18a	22,3	21,0	21,5	21,6
Grupo 4	58.1, 58.2a, 61.2a	53,9	52,8	58,5	55,1
Grupo 5	83.1b	26,5	25,3	24,8	25,6
Grupo 6	75.3x	24,3	20,6	19,5	21,5

Se realizó un segundo conjunto de análisis mediante el procedimiento yodométrico utilizando una muestra del grupo 4 y almidón de trigo que era defectivo en *SSII* (Yamamori *et al.*, 2000) y de la cebada línea M292, que es mutante en *SSIIa*. El contenido de amilosa determinado para el almidón de semillas de trigo del grupo 4 (líneas transgénicas de SBElIa-dc) era considerablemente más alto que el del almidón de mutantes de *SSII* del trigo y de la cebada.

Lo anterior implica que el contenido de amilopectina en el almidón de estos granos se encuentra considerablemente reducido, entre aproximadamente 75% en el tipo salvaje y menos de 50% o incluso menos de 20%.

Se generaron líneas que contenían transgenes tanto SBElIa-dc como SBElIb-dc mediante el cruce de las plantas transgénicas anteriormente indicadas. El contenido de amilosa en el almidón del grano de dicha progenie se encontraba elevado por encima del almidón de plantas que contenían únicamente SBElIa-dc, por ejemplo 75% a 80%, mostrando que la inhibición de SBElIb además de SBElIa incrementa adicionalmente los niveles de amilosa.

### 30 Ejemplo 7. Comparación de SBElIa de los genomas A, B y D.

#### *Construcción de bibliotecas de ADNc y genómicas del trigo.*

Se prepararon bibliotecas de ADNc y genómicas a partir del endospermo del trigo mediante procedimientos estándares en vectores fagos (Sambrook *et al.*, 1989). Se prepararon dos bibliotecas de ADNc, una de ARN del cultivar Rosella (Rahman *et al.*, 1999) y la otra del cultivar Wyuna (Rahman *et al.*, 2001). La biblioteca de Rosella se preparó en el vector ZAPII y se utilizaron los cebadores *EcoRI* y *NotI*, mientras que la biblioteca de Wyuna se preparó en el vector ZipLox (Life Technology) siguiendo los protocolos suministrados con los reactivos. Los títulos de las bibliotecas eran de  $2 \times 10^6$  pfu, sometidos a ensayo en la cepa Y1090(ZL) de *E. coli*. Se preparó una biblioteca genómica a partir de ADN de *A. tauschii* variedad 10097. Se digirió el ADN con *Sau3A* y se ligó al vector lambdaGEM12 parcialmente relleno (Promega). Los fragmentos clonados pudieron liberarse con la digestión con *SacI* o *XhoI*. Las bibliotecas genómicas del ADN de *T. aestivum* fueron las descritas por Tuner *et al.*, 1999.

#### *Aislamiento de secuencias de ADNc de SBElIa*

Mediante la utilización de una sonda de secuencia génica de SBEl del trigo a baja astringencia (Rahman *et al.*, 2001), se aislaron ADNc a partir de la biblioteca preparada a partir del cultivar Rosella. El clon más largo obtenido, denominado sbe9, se secuenció y se observó que codificaba una secuencia de tipo SBElIa (GenBank AF338432.1). A continuación, se aislaron tres clones de la biblioteca de ADNc del endospermo preparada a partir del cultivar Wyuna (Rahman *et al.*, 2001) utilizando una sonda correspondiente a las posiciones 536 a 890 de sbe9. Las condiciones para el cribado de la biblioteca fueron la hibridación con formamida al 25%, 5xSSC, SDS al 0,1%, 10x solución de Denhard, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón a 42°C durante 16 horas, seguido del lavado con 2xSSC, SDS al 0,1% a 65°C durante 3x1 hora (astringencia intermedia). Se obtuvieron tres secuencias diferentes mediante secuenciación de los clones y estos se representan posteriormente como sr995 y sr997 (figura 6).



La investigación de dichas secuencias de ADNc indicó que las diferentes secuencias se expresaban en el endospermo del trigo y que éstas probablemente correspondían a transcritos de *SBEIIa* procedentes de diferentes genomas de trigo. Una comparación mediante PILEUP de las secuencias con otras secuencias de ADNc de *SBEIIa* de trigo conocidas demostró que las secuencias sr995 y sr996 se encontraban agrupadas con la secuencia de ARNm derivada de la secuencia de genoma D wSBE-D1 (sr854) (figura 7), sugiriendo que sr995 y sr996 representan transcritos de *SBEIIa* del genoma D. Sr997 se encontraba próximo a la secuencia Y11282 (Nair *et al.*, 1997), indicando que probablemente proceden del mismo genoma, el genoma A o B. El *sbe9* anteriormente indicado (AF338432.1) probablemente es el mismo genoma que Y11282, aunque representa un suceso de procesamiento alternativo, consistente con el despalmado de un exón próximo al extremo 5'.

#### Diferenciación de los genes *SBEIIa* de los genomas A, B y D del trigo *T. aestivum*

Las diferencias en las secuencias de genes o de transcritos de ARN pueden utilizarse como base para diseñar cebadores específicos de los genomas A, B o D para el cribado mutacional a nivel génico o a nivel del ARN. Por ejemplo, la figura 6 compara las secuencias de nucleótidos de *SBEIIa* de los ADNc, incluyendo el nº de acceso de Genbank Y11282, y las secuencias parciales de ADNc *sbe9* (AF338432.1), sr997 y sr995. Las secuencias genómicas se encuentran disponibles para los genes *SBEIIa* de *T. aestivum*, por ejemplo ver la Tabla 1. Se han atribuido secuencias genómicas a los genomas A, B y D. La comparación muestra polimorfismos, cualquiera de los cuales puede utilizarse para distinguir las secuencias por medios moleculares.

Un cebador directo basado en una región del exón 5 (5'-ATCACTTACCGAGAATGGG-3') [SEC ID nº 15] y un cebador inverso basado en una secuencia en el exón 6 (5'-CTGCATTTGGATTCCAATTG-3') [SEC ID nº 16] han sido utilizados para distinguir entre los productos de los genomas A, B y D. Dichos cebadores pueden utilizarse en reacciones de PCR para cribar para qué variedades o nº de acceso son mutantes en uno o más de los genes *SBEIIa* de los genomas A, B y D (ver posteriormente).

También se han desarrollado marcadores basados en la PCR para distinguir los genes *SBEIIb* de los genomas A, B y D del trigo. Por ejemplo, las reacciones de PCR con la pareja de cebadores ARA19F (5'-CACCCATTGTAATTGGGTACACTG-3') [SEC ID nº 17] y ARA15R (5'-TCCATGCCTCCTTCGTGTTTCATCA-3') [SEC ID nº 18] seguido de la digestión de los productos de amplificación con el enzima de restricción *RsaI* podría distinguir los genes *SBEIIa* de los tres genomas.

Las diferencias en la secuencia de ADNc se reflejan en las secuencias deducidas de la proteína. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de longitud completa deducidas para el genoma D (sr854) y los polipéptidos del genoma A o B (Y11282) se comparan en la figura 8. Resultan evidentes diferencias significativas en las regiones 688 a 698 y 735-6 que podrían utilizarse para producir anticuerpos específicos de genoma contra las proteínas *SBEIIa*, con el fin de cribar para las variedades de trigo que no presentan una o más actividades específicas de un genoma. Otras diferencias se observan en las secuencias peptídicas de tránsito que corresponden a las posiciones aminoácidas 1 a 54 de la figura 8.

#### Ejemplo 8. Identificación de variedades del trigo mutantes en uno o más genes *SBEII*

##### Identificación de mutaciones *SBEIIb* nulas en los genomas B y D

Se cribó un total de 1.500 números de acceso de trigo, incluyendo 300 variedades de trigo australiano, 900 números de acceso de trigo procedentes del Australian Winter Cereal Collection (AWCC, Tamworth, NSW Australia) y 300 razas terrestres de trigo, mediante amplificación de PCR de un marcador de *SBEIIb* correspondiente a una región polimórfica del intrón 3, utilizando los cebadores ARA19F (ver anteriormente) y ARA23R (5'-CTGCGCATAAATCCAACTTCTCG-3') [SEC ID nº 19]. La amplificación por PCR utilizó las condiciones indicadas anteriormente. Los productos de amplificación se digirieron con el enzima de restricción *RsaI* y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. Tres líneas (Aus12745, Aus17340 y Aus10103) no presentaban el marcador del genoma D y dos líneas (Aus12509 y Aus12565) no presentaban el marcador del genoma B (figura 9). Estas líneas representan mutantes nulos inferidos en los genes *SBEIIb* para los genomas B o D.

Se llevó a cabo un análisis de hibridación de transferencia southern en ADN procedente de líneas mutantes nulas para confirmar los resultados de la PCR. El ADN digerido con *HindIII*, preparado a partir de plantas mediante procedimientos estándares, se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nilón Hybond N<sup>+</sup> (Amersham). Se generaron sondas marcadas radioactivamente a partir de la región del intrón 3 del gen *SBEIIb* (posiciones 2.019 a 2.39.1, ver la figura 2) utilizando el sistema de marcaje de ADN Megaprime (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) y se utilizaron para la hibridación bajo condiciones astringentes. No se encontraron Aus17340 ni Aus10103 en la banda ~4,8 kB del genoma D, y no se encontraron Aus12509 ni Aus12565 en la banda ~3,4 kB del genoma B (figura 10). Por lo tanto, se confirmó que estas líneas son mutantes nulos para los genes *SBEIIb* del genoma D o B, respectivamente.

##### Generación de dobles mutantes nulos B+D

Se llevaron a cabo los cruces siguientes:

Aus17340a x Aus12509

5 Aus17340b x Aus12509

Aus17340a x Aus12565

10 Aus17340b x Aus12565

Aus12745 x Aus12509

Aus12745 x Aus12565

15 Aus17340a y Aus17340b son dos biotipos diferentes del mismo cultivar Aus17340; se confirmó que ambos eran nulos para el marcador del gen *SBEIIb* del genoma D. Se autofecundaron las plantas F1 y se cribó la progenie F2 mediante el procedimiento de PCR para plantas que eran mutantes de los genes *SBEIIb* tanto de genoma B como D (dobles mutantes nulos). La segregación de las mutaciones de *SBEIIb* se observó mediante amplificación por PCR utilizando la pareja de cebadores Ar2b19cF (5'-CTATGCCAATTGAACAACAATGC-3') [SEC ID nº 20] y AR2b23cR (5'-CGTGTTCATCAATGTCTGAACG-3') [SEC ID nº 21] (que amplifica la misma región que ARA19F/ARA23R), seguido de la digestión con el enzima de restricción *RsaI*. Se muestra en la figura 11 un patrón de segregación típico. El análisis de chi cuadrado reveló que el patrón de segregación de los cruces Aus17340a y Aus12509 y de Aus17340a y Aus12565 se ajustaba a la proporción esperada de 9:3:3:1 (Tabla 9). La segregación se encontraba altamente distorsionada en los demás cruces.

25 Tabla 9. Análisis de chi cuadrado de la población F2 de cruces entre mutantes nulos de *SBEIIb* en los subgenomas B y D

Cruce/Fenotipos	17340a x 12509	17340b x 12509	1734a x 12565	17340 x 12565	12745 x 12509	12745 x 12565
Normal	85	63	56	72	95	21
B nulo	38	39	25	35	11	2
D nulo	23	29	11	11	57	16
BD nulo	6	10	4	6	3	0
Total	152	141	96,	124	166	39
$\chi^2_{(9:3:3:1)}$	5,52	9,73	6,19	12,91	39,79	16,66

30 Valor tabulado de  $\chi^2_{(9:3:3:1)}$  (0,05), df 3=7,81

35 Se detectaron plantas albinas en todos los cruces, con independencia de las líneas madres, indicando que un gen mutante relacionado con la clorofila también se segregaba en las poblaciones. De las 24 plantas albinas analizadas, 23 eran dobles mutantes nulas B+D y una aparentemente era de tipo salvaje. Se identificaron cinco plantas verdes de apariencia normal con mutaciones dobles mutantes B+D a partir de las 718 líneas sometidas a ensayo. Tres de ellas procedían del cruce Aus17340b x Aus12509 (BD219, BD303, BD341), una del cruce Aus17340a x Aus12509 (BD54) y una de Aus17340b x Aus12565 (BD636). Los resultados revelan que las mutaciones en los genes *SBEIIb* en los genomas B y D se encuentran estrechamente ligados a una mutación en un gen relacionado con la clorofila que proporcionaba el fenotipo albino al reunirse los dos loci mutantes. Sin embargo, se identificaron sucesos de recombinación entre el gen *SBEIIb* y el gen relacionado con la clorofila, dando lugar a líneas normales doble mutantes nulas B+D, aunque a una frecuencia muy baja. Lo anterior indica que los dos genes se encuentran estrechamente ligados, pero que pueden separarse.

45 **Ejemplo 9. *SBEIIa* y *SBEIIb* se encuentran ligados en el trigo.**

*Aislamiento de clones de BAC*

50 Una biblioteca de cósmidos (BAC) de inserciones grandes de cósmido binario construida a partir de *A. tauschii* variedad *meyeri* (Moulet *et al.*, 1999) se sondeó con la región del intrón 3 del gen *SBEIIb* (posiciones 2.019 a 2.391, figura 2) con el fin de aislar BACs que contuviesen el gen *SBEIIb*. Se aislaron cuatro clones positivos y se denominaron BAC-4, BAC-5, BAC-9 y BAC-12. Para confirmar que contenían el gen *SBEIIb*, se extrajo el ADN de estos clones, se digirió con *HindIII* o *EcoRI* y se llevó a cabo una hibridación southern utilizando la misma sonda (figura 12). El clon BAC-5 mostraba una banda de hibridación fuerte de tamaño ~7,5 kB con *EcoRI* y cuatro bandas de tamaños ~6,1, 3,6, 2,3 y 1,7 con *HindIII* (figura 12). Lo anterior demostró la presencia de *SBEIIb* en BAC-5. Para someter a ensayo la presencia de la región 3' del gen en BAC-5, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en este clon utilizando cebadores específicos diseñados para amplificar los exones 17 (AR2b3pr2F, 5'-GGATATGTATGATTTTCATGG-3' [SEC ID nº 22], y AR2b3pr2R, 5'-CCATAAAGTTAAGATAACCC-3') [SEC ID nº 23]

y 20 (AR2b3pr1F, 5'-GACATCAGACCACCAGTACG-3' [SEC ID nº 24] y AR2b3pr1R, 5'-CTTCCCAGGCTTTAAACAGC-3') [SEC ID nº 25], basados en la secuencia de ADNc de *SBEIIb*. Ambos conjuntos de cebadores amplificaron los productos esperados de tamaños, 128 pb para el exón 17 y de 145 pb para el exón 20, indicando que BAC-5 contenía el extremo 3' de *SBEIIb*. Se confirmó adicionalmente lo anterior mediante secuenciación del producto de PCR del exón 20.

También se sometió a ensayo BAC-5 para la presencia del gen *SBEIIa* además de *SBEIIb*. Las reacciones de secuenciación de nucleótidos utilizando el cebador AR2akpn1F 5'-GGTACCGCAGAAAATATACGAGATTGACCC-3' [SEC ID nº 26] rindieron la secuencia correspondiente a la región del intrón 3 del gen *SBEIIa*, siendo igual a la secuencia entre las posiciones 2.265 y 2.478 (figura 1) de wSBEII-D1. Este resultado sugiere que *SBEIIa* también se encontraba presente en BAC-5, e implica que *SBEIIa* y *SBEIIb* probablemente se encontraban estrechamente ligados en el trigo.

#### *Hibridación fluorescente in situ (FISH)*

Se llevó a cabo la hibridación *in situ* con F2 del clon genómico wSBEII-D1 (Rahman *et al.*, 2001) y un clon wSBEII-D2 (Rahman *et al.*, 2001) en aplastamientos cromosómicos de *Aegilops tauschii* y trigo tal como describen Turner *et al.* (1999). Se verificó la identidad del cromosoma hibridado mediante doble marcaje con pSc119.2, una secuencia repetitiva utilizada para la identificación de cromosomas (Mukai *et al.*, 1990). Ambos clones de wSBEII se hibridaban a la región proximal del cromosoma 2 (figura 13), indicando la proximidad de los dos genes *SBEII* en el trigo.

#### *Los mutantes nulos de SBEIIb del trigo también son mutantes para SBEIIa*

Los mutantes nulos de *SBEIIb* identificados tal como se ha indicado anteriormente se cribaron para mutaciones en el gen *SBEIIa* utilizando los cebadores Sr913F (5'-ATCACTTACCGAGAATGGG-3') [SEC ID nº 27] y E6R (5'-CTGCATTTGGATTCCAATTG-3') [SEC ID nº 28]. Se diseñaron estos cebadores para amplificar la región del intrón 5 de wSBEII-D1 y para distinguir los genes *SBEIIa* en los genomas A, B y D.

Se encontró que los mutantes nulos de genoma D de *SBEIIb* Aus12565 y Aus12509 también eran mutantes nulos de genoma B del gen *SBEIIa*. De manera similar, los mutantes nulos de genoma D de *SBEIIb* Aus17340 y Aus10103 también eran mutantes nulos de genoma D de *SBEIIa*. Además, las líneas de doble mutante nulo B+D de *SBEIIb*, BD341 y BD636, también eran dobles mutantes nulos de genoma B+D del gen *SBEIIa*. Los datos demuestran que *SBEIIa* y *SBEIIb* se encuentran estrechamente ligados en el trigo, en contraste con el arroz y el maíz, e indican que las mutaciones para las copias de los genomas B y D de los genes indicados anteriormente presentan mutaciones por delección.

#### *Triples mutantes nulos de SBEIIa del trigo*

Los procedimientos descritos anteriormente pueden utilizarse para aislar mutantes de genoma A de *SBEIIa* y/o de *SBEIIb*. Por ejemplo, se utilizan regiones de BAC-5 estrechamente ligadas a *SBEIIa* y/o a *SBEIIb* como sondas o para el diseño de cebadores de PCR para el cribado de mutaciones de genoma A de los genes. Los mutantes de genoma A se cruzan con las líneas de doble mutante nulo B+D para producir una línea triple mutante nula A+B+D. Alternativamente, se lleva a cabo la mutagénesis de los doble mutantes nulos de genoma B+D mediante irradiación u otros medios y se identifica un triple mutante nulo que carece totalmente de actividad de *SBEIIa* y opcionalmente también de actividad de *SBEIIb*. De esta manera se proporciona una variedad de trigo no transgénica con niveles de amilosa muy elevados.

#### **Ejemplo 10. Mutación del gen *SBEIIa* en el trigo**

Puede conseguirse una mutación del gen *SBEIIa* en el trigo que conduce a una actividad reducida de *SBEIIa* mediante irradiación con rayos gamma o mediante mutagénesis química, por ejemplo con sulfonato de etilmetano (EMS). Para las mutaciones inducidas por rayos gamma, se irradian semillas a una dosis de entre 20 y 50 kR de una fuente de <sup>60</sup>Co (Zikiryayeva y Kasimov, 1972). Se llevó a cabo la mutagénesis de EMS mediante tratamiento de las semillas con EMS (al 0,03%, v/v) según Mullins *et al.* (1999). En un fondo de doble mutante nulo B+D, se identificaron granos mutantes basándose en un contenido incrementado de amilosa o una morfología alterada de los gránulos de almidón, y se confirmaron mediante los procedimientos indicados anteriormente. Los mutantes de *SBEIIa* que conservaban la actividad de *SBEIIb* puede remutagenizarse y la progenie cribarse para la pérdida de actividad de *SBEIIb* además de *SBEIIa*, o el mutante de *SBEIIa* puede cruzarse con un mutante de *SBEIIb* para combinar las mutaciones y producir una variedad no transgénica de trigo que carezca sustancialmente de actividad de *SBEIIb* en el endospermo.

#### **Ejemplo 11. Mutantes SGP-1 del trigo presentan una actividad reducida de *SBEIIa* y de *SBEIIb*.**

Los genes de la almidón sintasa II (SSII) de los genomas A, B y D del trigo (*Triticum aestivum*) codifican polipéptidos de 100 a 105 kDa que también se conocen como proteínas 1 de los gránulos del almidón (SGP-1). La SSII (SGP-1) consiste de tres polipéptidos de masas moleculares aproximadas de 100, 104 y 105 kDa que se encuentran

codificados por un conjunto homólogo de genes en el brazo corto de los cromosomas 7B, 7A y 7D, respectivamente (Denyer *et al.*, 1995; Yamamori y Endo, 1996). Yamamori *et al.* (2000) produjeron un mutante nulo de SGP-1 mediante el cruce de las líneas que no presentaban las formas específicas del genoma A, B y D de la proteína SGP-1 según ensayo mediante electroforesis de proteínas. El examen de las semillas nulas para SGP-1 demostró que la mutación resultaba en alteraciones en la estructura de la amilopectina, un contenido elevado de amilosa y gránulos de almidón deformados (Yamamori *et al.*, 2000). Además, los experimentos electroforéticos con granos maduros revelaron que los niveles de SBEII unidos a gránulo (SGP-2) y de SSI (SGP-3) se reducían considerablemente. No se conoce cuál es la explicación molecular de la mutación o mutaciones que conducen a la línea nula para SGP-1.

Los presentes inventores llevaron a cabo experimentos para caracterizar adicionalmente una línea del trigo que no carecía por completo de SGP-1 en los gránulos de almidón del grano maduro. Para determinar si los genes SSII se encontraban presentes en cada uno de los genomas A, B y D de la línea nula para SGP-1 del trigo, se extrajo el ADN de la línea nula para SGP-1 del trigo y de trigo de tipo salvaje (de control) cv Chinese Spring y se analizó mediante PCR utilizando las combinaciones de cebadores *ssIIa* (5'-CCAAGTACCAGTGGTGAACGC-3') [SEC ID nº 29] y *ssIIb* (5'-CGGTGGGATCCAACGGCCC-3') [SEC ID nº 30] para el genoma B, o *ssIIa* y *ssIIc* (5'-CATGTGAGCTAGCTTTCGCC-3') [SEC ID nº 31] para los genomas A y D. La región amplificada se encontraba entre las posiciones 2.472 y 2.821 pb de *wSSIIA* (GenBank nº de acceso AF155217) o las regiones correspondientes de *wSSIIB* o *wSSIID*. La región amplificada constituía una parte del exón 8 y se seleccionó debido a que permitía discriminar claramente entre los productos de los genomas A, B y D. La amplificación se llevó a cabo utilizando 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos. Los fragmentos de PCR producidos a partir de los genomas A, B y D del trigo nulo para SGP-1 presentaban el mismo tamaño que los fragmentos correspondientes producidos a partir de Chinese Spring. La amplificación por PCR de los segmentos génicos de los genes isoamilasa y SSII, que son los genes biosintéticos del almidón situados más estrechamente próximos entre sí, pudieron amplificarse a partir de los genomas A, B y D del trigo nulo para SGP-1. Por lo tanto, el fenotipo nulo para SGP-1 no estaba causado por la delección de cualquiera de dichos genes en el brazo corto del cromosoma 7.

En el examen mediante microscopía electrónica de barrido, se observó que los gránulos de almidón de semillas nulas para SGP-1 en desarrollo, en el periodo entre los 10 días posteriores a la antesis y la madurez, se encontraban claramente deformados. La distribución de longitudes de cadena del almidón desramificado en el mutante mostraba un incremento de la proporción de cadenas más cortas (hasta DP 8) y una reducción de la proporción de DP 9-22 en el examen mediante electroforesis capilar.

#### *Expresión de almidón sintasas y enzimas ramificadores en el endospermo SGP-1*

Se investigó la expresión de las almidón sintasas y de los enzimas ramificadores en los gránulos del almidón en la línea nula para SGP-1 y se comparó con la del cultivar de tipo salvaje Chinese Spring. Con independencia del estadio de desarrollo de las semillas, se producía una reducción significativa de aproximadamente 90% a 96% de las cantidades de SBEII y SSI en los gránulos en la línea nula para SGP-1, además de la ausencia de SSII (figura 14). La utilización de anticuerpos específicos demostró que la banda de SBEII obtenida de los gránulos estaba compuesta de SBEIIa y SBEIIb en una proporción aproximada de 1:3 en Chinese Spring. En el mutante nulo para SGP-1, la cantidad era tan reducida que no pudieron determinarse las proporciones relativas utilizando los anticuerpos. También se produjo una reducción del nivel de GBSS I desde un estadio temprano de desarrollo del grano. Resulta evidente que en el mutante de SGP-1 el nivel de polipéptidos asociados al gránulo de almidón, incluyendo SBEIIa y SBEIIb, es reducido. No se observó reducción del nivel de polipéptidos asociados a gránulo (SBEII y SSI) en los granos de las líneas de trigo utilizadas para producir la línea nula para SGP-1 (Yamamori *et al.*, 2000), lo que sugiere que el efecto está provocado específicamente por la ausencia de SSII.

Los enzimas ramificadores y las almidón sintasas también se analizaron en la fase soluble del endospermo en desarrollo. Mientras que la cantidad relativa de SBEIIb soluble era similar en la línea Chinese Spring y en la línea nula para SGP-1, se observó una reducción de la cantidad de SBEIIa en la fase soluble del mutante (figura 15). Sin embargo, lo anterior podría haberse debido en parte a la genealogía de la línea nula para SGP-1.

Dichos datos demuestran que la actividad de SBEIIa puede reducirse pleiotrópicamente mediante mutación del gen SSII. Aunque la mutación de SSII por sí sola condujo a niveles relativos de amilosa en el almidón inferior a 50%, sugiere que las mutaciones en genes aparte de *SBEIIa* podría combinarse con mutaciones de *SBEII* para incrementar los niveles de amilosa y para producir almidones alterados.

#### **Ejemplo 12. Inactivación de múltiples isoformas de SBEI**

La purificación de enzimas ramificadores de almidón del trigo mediante cromatografía de intercambio aniónico resolvió tres picos de actividad (figura 16, Morell *et al.*, 1997). Los extractos de endospermo del cultivar Chinese Spring (CS) revelaron la presencia de cuatro polipéptidos SBEI en un PAGE no desnaturizante utilizando un anticuerpo policlonal, anti-WBE-1, cultivado contra un péptido sintético con la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia N-terminal de la proteína del pico 1 (figura 16B). El análisis de las líneas nulisómicas-tetrasómicas de CS reveló que estos polipéptidos se encontraban codificados en el cromosoma 7; las

bandas en la transferencia inmunológica se asignaron a los genomas A (banda A), B (banda B) y D (bandas Di y Dii) y las actividades se denominaron actividades A-mayor, B-mayor y D-mayor, respectivamente. El análisis de transferencia inmunológica de las fracciones purificadas que representaban los picos activos obtenidos mediante cromatografía de intercambio aniónico reveló que el primer pico contenía las actividades de SBEI A-mayor y D-mayor, y que el segundo pico contenía la actividad de SBEI B-mayor (figura 16C).

La localización del gen codificante de la actividad principal de SBEI en el cromosoma 7 es consistente con la localización determinada de tres genes bien caracterizados y relacionados, wSBEI-D2, wSBEI-D3 y wSBEI-D4. La secuencia deducida de la proteína SBEI-mayor muestra que se encuentra codificada por el último de dichos genes, wSBEI-D4 (Rahman *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2003). La presencia de un cuarto gen SBEI se sugiere a partir de los datos de hibridación southern (Suzuki *et al.*, 2003).

*Identificación de mutaciones nulas de SBEI-mayor*

Con el fin de identificar las mutaciones nulas que no presentaban expresión de una o más isoformas de SBEI, se cribaron colecciones de plasma germinal de trigo mediante detección de transferencia inmunológica de SBEI-mayor tras electroforesis en gel no desnaturizante. Se utilizó el anticuerpo anti-wSBEI indicado anteriormente. De los 182 números de acceso de trigo hexaploide australiano, se identificaron 13 líneas que no expresaban SBEI-D mayor, 16 que no presentaban SBEI-B mayor, 10 que no presentaban SBEI-A y dos (Bindawarra y Vectis) que no presentaban ni la isoforma A ni la B. Se consideró que estas líneas presentaban mutaciones nulas de los genes SBEI del genoma respectivo. La frecuencia de mutaciones nulas en el gen SBEI-mayor (~23%) era similar a la del gen GBSS (22%) (Boggini *et al.*, 2001).

*Generación de línea triple nula para SBE I-mayor*

A partir del análisis de transferencia inmunológica, resultó evidente que los cultivares Bindawarra y Vectis no presentaban las actividades de SBEI A-mayor y B-mayor y se identificó que el cultivar Cadoux no presentaba la actividad D-mayor. Se cribó mediante inmunotransferencia una población progenie F2 de 185 líneas obtenida del cruce Vectis x Cadoux. Sin embargo, no se obtuvieron líneas que no presentasen ninguna de las tres actividades, sugiriendo que este tipo de progenie presenta una viabilidad reducida o que existe algún tipo de interacción entre los genomas. Por lo tanto, se cruzó la línea de progenie VC3.1.11 que no presentaba las actividades B-mayor y D-mayor con una línea Chinese Spring con manipulación cromosómica (CS7AL-15) que no presentaba la actividad A-mayor. Se cribaron líneas haploides duplicadas mediante PCR utilizando los cebadores ARBE1CF (5'-GGGCAAACGGAATCTGATCC-3') [SEC ID nº 32] y ARA9R (5'-CCAGATCGTATATCGGAAGGTCG-3') [SEC ID nº 33] y mediante transferencia inmunológica, y se encontró que 2 líneas (A113 y D13) de entre 160 no presentaban actividad de SBEI-mayor en absoluto, según inmunotransferencia en geles no desnaturizantes. La figura 17 muestra un patrón de segregación representativo de líneas haploides duplicadas que incluye A113 (carril 6).

Se examinó el endospermo de la línea A113 para actividad residual de SBE. Una variedad de trigo de tipo salvaje, D28, mostraba dos picos de actividad de SBEI. En contraste, los extractos de A113 proporcionaron el primer pico pero el segundo pico de actividad faltaba por completo. Las secuencias de aminoácidos obtenidas de la fracción purificada que comprendía dicha actividad indicaban la presencia de una proteína de tipo SBEI en A113. Sin embargo, esta fracción no mostró ninguna reacción con anticuerpos anti-WBEI en un gel no desnaturizante. La actividad ramificadora en A113 correspondía a una proteína de ~80 kDa que puede ser un enzima de tipo SBEII, debido a que presentaba reactividad cruzada con los anticuerpos de SBE de la patata y de SBEII del maíz.

Estos datos demuestran que pueden generarse líneas mutantes de SBEI en el trigo. La combinación de mutaciones de SBEI con mutaciones de SBEIIa y opcionalmente de SBEIIb produce plantas del trigo que presentan niveles muy altos de amilosa en el almidón del grano.

**Ejemplo 13. Identificación de líneas mutantes del trigo que comprenden cromosoma 2A con una mutación en un gen SBEII**

En un intento de identificación de una línea de trigo que presentase una mutación en un gen *SBEIIa* o *SBEIIb*, se cribaron 2.400 números de acceso hexaploides de trigo para mutaciones nulas de *SBEIIb* en los genomas A, B o D. Se utilizaron los cebadores AR2b19cF/AR2b23cR en reacciones de PCR en muestras de ADN genómico de plantas del trigo de cada línea, seguido de la digestión de los productos de amplificación con RsaI y la electroforesis en gel. Este marcador amplificó la región del intrón 3 (posiciones nucleótidas 2.085 a 2.336 en el gen *SBEIIb* del trigo, figura 2) y era específico para *SBEIIb*. Este cribado resultó en la identificación de tres mutantes nulos para *SBEII* de genoma D y en dos mutantes nulos para *SBEII* de genoma B, tal como se ha indicado en los Ejemplos, anteriormente. No se detectaron líneas mutantes que no presentasen la banda del genoma A correspondiente a *SBEIIb*. Esto sugiere que las líneas de trigo que comprenden el cromosoma 2A con un gen *SBEIIb* mutante no existen en la naturaleza.

Se utilizó una población de trigo mutante inducida con rayos gamma (fuente: <sup>60</sup>Co) generada por Tony Prior y Rohit Mago (CSIRO) para cribar para mutaciones inducidas en *SBEII* de trigo. Se generó la población de trigo a partir de la

progenie F2 de un cruce Gabo 1BL.1RS x Veery 3. Se cribó un total de 2.694 semillas mutantes de esta población, tal como se ha indicado anteriormente, en reacciones de PCR con los cebadores AR2b19cF y AR2b23cR. Se identificaron dos semillas, denominadas MLT2B8 y MLT2D1, procedentes de una planta, que no presentaban el alelo *SBEIIb* de genoma A (figura 18). No se identificaron semillas en la población que contuviesen mutaciones nulas de *SBEIIb* en los genomas B o D.

Tal como se muestra en los Ejemplos, anteriormente, los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* se encuentran estrechamente ligados en el trigo, en el brazo largo del cromosoma 2. De acuerdo con lo anterior, los presentes inventores sometieron a ensayo el ADN de estas semillas para la presencia o ausencia del gen *SBEIIa* de genoma A utilizando reacciones de PCR con los cebadores Sr913F/E6R. Estos cebadores amplifican la región del intrón 5 de wSBEII-D1 (posiciones nucleótidas 2.959 a 3.189, figura 1 [SEC ID nº 1]). Tras la amplificación, los productos se sometieron a electroforesis en un gel de secuenciación al 5% (ABI Prism, secuenciador de ADN). Los productos marcados fluorescentemente se analizaron utilizando el programa Genescan. Los perfiles del barrido mostraron que los productos de amplificación para las semillas mutantes MLT2B8 y MLT2D1 no presentaban el producto correspondiente al gen *SBEIIa* de genoma A, indicando que ambas semillas presentaban alelos nulos para *SBEIIa* de genoma A además de *SBEIIb*.

Las mutaciones nulas en estas semillas se confirmaron adicionalmente mediante la utilización de un marcador específico del genoma A para *SBEIIa*, ARIIaAF (5'-GCAAAAGCCAGATCATAAATTTAGAGC-3') [SEC ID nº 34] y ARIIaAR (5'-CTTCCAATTCATTGTTAATGGTCACAC-3') [SEC ID nº 35] que amplifican únicamente el producto del gen *SBEIIa* de genoma A (posiciones nucleótidas 3.024 a 3.131 de wSBE II-DA1, figura 1). Aunque esta pareja de cebadores amplificó un producto de 110 pb del material vegetal procedente de la variedad Chinese Spring, este producto se encontraba claramente ausente de las dos semillas putativamente mutantes. Ocurre igualmente en el control negativo dt2AS, que es una línea con cromosoma manipulado de Chinese Spring que carece del brazo largo del cromosoma 2A. Debido a que los genes *SBEIIa* y *SBEIIb* se encuentran situados en el brazo largo del cromosoma 2, esta línea no presenta el alelo del genoma A de ambos genes indicados y por lo tanto podría utilizarse como control negativo (figura 19).

Se cultivaron los embriones procedentes de las semillas mutantes MLT2B8 y MLT2D1, que se identificó que eran mutantes de genoma A de *SBEIIa* y *SBEIIb*, hasta producir plantas. El almidón obtenido de las semillas de estas plantas se analizó para su contenido de amilosa, longitud de cadena y otras propiedades con el fin de determinar si las mutaciones nulas de tanto *SBEIIa* como *SBEIIb* en el genoma A afectaban a las propiedades del almidón.

Tal como se ha indicado anteriormente, se generaron cinco líneas que presentaban una mutación en los genes tanto *SBEIIa* como *SBEIIb* de los genomas B y D. De éstas, se cultivaron las líneas BD 219 y BD 636 en un invernadero y se cruzaron con las líneas mutantes nulas de A denominadas MLT2B8 y MLT2D1. Se generó una población haploide duplicada a partir de las semillas F1 de estos cruces, proporcionando plantas triple mutantes nulas homocigóticas. Estas plantas triple mutantes nulas deberían aparecer en la población haploides duplicadas con una frecuencia de 1 en 8. Las mutaciones nulas de genoma A pueden combinarse con las mutaciones de genoma B o con las mutaciones de genoma D mediante cruces similares. En cruces adicionales, puede introducirse cualquiera de los alelos nulos en cualquier fondo genético adecuado para características agronómicas u otras.

Se llevaron a cabo los cruces siguientes para producir trigo Durum (tal como, por ejemplo, la variedad Wollaroi) que presentase mutaciones en *SBEIIa* y *SBEIIb* de genoma A:

1) Wollaroi x MLT2B8 ó MLT2D1, produciendo trigo Durum nulo para *SBEIIa/SBEIIb* de genoma A en fondo de Wollaroi,

2) trigo Durum nulo de genoma A (Wollaroi) x línea de trigo nulo para *SBEIIa/SBEIIb* de genoma B, produciendo trigo Durum doble nulo *SBEIIa/SBEIIb* de genoma AB (Wollaroi).

Alternativamente,

1) Wollaroi x línea de trigo nulo de genoma B, produciendo trigo Durum nulo de genoma B (Wollaroi)

2) trigo Wollaroi nulo de genoma B x línea de trigo nulo de genoma A, produciendo trigo Durum doble nulo *SBEIIa/SBEIIb* de genoma AB

Estos cruces resultaron en la generación de trigo Durum de alto contenido en amilosa que presentaba usos finales específicos con beneficios de salud similares a los del trigo hexaploide de alto contenido en amilosa.

#### **Ejemplo 14. Confirmación del alto contenido de amilosa en el grano mediante procedimientos de separación en columna de sefrosa 2B**

Se determinó el contenido de amilosa del almidón en el grano de plantas de trigo transgénico que contenían constructos genéticos inhibidores de *SBEIIa/SBEIIb* mediante un procedimiento de separación en columna de

sefarosa. En este procedimiento, se separaron las moléculas de almidón en la columna basándose en su peso molecular. A continuación, las fracciones separadas se sometieron a ensayo utilizando el kit de ensayo de almidón (Sigma) según las instrucciones del proveedor.

5 Se disolvieron aproximadamente 10 mg de almidón en 3,0 ml de NaOH 1 N (desgasificado) mediante incubación a 37°C durante 30 minutos. La solución de almidón se centrifugó durante 15 minutos para peletizar los componentes no disueltos. Se cargó el sobrenadante en una columna de sefarosa CL2B a una velocidad de bombeo de 1 ml/minuto. Se utilizó la columna con NaOH 10 mM como tampón y se recogieron cincuenta fracciones de 2,5 ml. El pH de las fracciones 9 a 50 se ajustó a 4,5 con 35 µl de HCl 1 M. Se transfirió una alícuota (250 µl) de cada muestra a un tubo, seguido de la adición de 250 µl de reactivo de almidón (kit de ensayo de almidón, Sigma). Los controles incluían: un blanco de reactivo de ensayo de almidón que contenía únicamente reactivo de almidón (250 µl) y agua (250 µl), un blanco de reactivo de ensayo de glucosa que contenía únicamente 500 µl de agua, un blanco de muestra que contenía únicamente 250 µl de muestra de almidón y 250 µl de agua y una muestra de ensayo que contenía únicamente 250 µl de reactivo de almidón y 250 µl de muestra de almidón. Las muestras y los controles se incubaron a 60°C durante 60 minutos y después se transfirieron 200 µl de cada una a un tubo nuevo seguido de la adición de 1 ml de reactivo de glucosa (kit de ensayo de almidón, Sigma) y la incubación a 37°C durante 30 minutos. Se utilizó la absorbancia a 340 nm para determinar la cantidad de almidón (mg) en cada fracción según las instrucciones proporcionadas por el kit.

20 El cromatograma de las muestras de almidón reveló dos picos eluidos de la columna de sefarosa. Se calculó el contenido de amilosa (segundo pico) de cada muestra como porcentaje de la cantidad total de almidón en ambos picos.

25 Utilizando dicho procedimiento se calculó que el contenido de amilosa de la línea transgénica SBEIIa-dc nº de acceso 144087, que se demostró que era homocigótica para el transgén, era de 78%, mientras que el de la línea transgénica de SBEIIb-dc nº de acceso 144008 (línea transgénica homocigótica del suceso IIb 110.16b) era de 23% (figura 20). A título comparativo, el procedimiento yodométrico proporcionó un contenido de amilosa para dichas líneas de 88,47% y 27,29%, respectivamente (Tabla 10).

30 Se analizaron las propiedades funcionales, tales como la temperatura de gelatinización, la viscosidad de la pasta y el volumen de hinchado del almidón mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC), analizador Rapid Visco (RVA) y ensayo de poder de hinchamiento del almidón, respectivamente. La estructura de estos almidones se analizó mediante cristalografía de rayos X y análisis del tamaño de partícula.

35 Tabla 10. Contenido de amilosa de líneas de trigo transgénico estimado mediante el procedimiento yodométrico

Línea	Enzima diana	Nº de suceso	Contenido de amilosa (%)
NB1	No transformado	-	31,8
1144008	SBE IIb	IIb 110,16b	27,3
144087	SBE IIa	IIa 85,3a	88,5
144025	SBE IIa	IIa 50,1b	75,8
LSD	-	-	7,7

**Ejemplo 15. Análisis de distribución de longitudes de cadena.**

40 Se determinó la distribución de las longitudes de cadena de muestras de almidón mediante electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) tras la desramificación de isoamilasa del almidón. En la Tabla 11 se presentan los porcentajes de longitud de cadena de DP 6-11, DP 12-30 y DP 31-60 en el almidón de semillas transgénicas en comparación con controles no transgénicos. En la figura 21 se muestran gráficos de diferencia molar en los que se restaron las distribuciones normalizadas de longitudes de cadena de almidón procedente de líneas transgénicas de alto contenido en amilosa, de la distribución normalizada de almidón procedente de controles no transformados isogénicos.

45 Tabla 11. Distribución de longitudes de cadena de almidones desramificados con isoamilasa procedentes de líneas transgénicas de trigo

Línea	Gene diana	Nº de suceso	DP4-12	DP13-24	DP24-36	>36
NB1	Control no transformado	-	57,39	37,38	3,83	1,40
144087	SBEIIa	IIa 85,3a	47,40	42,27	6,16	4,17
144025	SBEIIa	IIa 50,1b	49,99	44,40	5,60	-
144008	SBEIIb	IIb 110,16b	57,98	37,65	4,37	-

50 Se observó una proporción significativamente menor de longitudes de cadena de DP 4-12 en almidón procedente de semillas transgénicas para SBEIIa-dc en comparación con el almidón procedente de semillas no transformadas o de semillas transgénicas para SBEIIb-dc. La proporción de longitudes de cadena >13 era más alta en las semillas

transgénicas para SBEIIa-dc que en las otras. Estos resultados sugieren la posibilidad de que SBEIIa se encuentre selectivamente implicado en la síntesis de cadenas más cortas, de DP 4-12, en el almidón del trigo. Sin embargo, en el almidón del mutante de *SSIIa*, se observó un incremento de la proporción de longitudes de cadena más cortas en la amilosa.

5

**Ejemplo 16. Propiedades del almidón de trigo transgénico.**

Se analizaron las propiedades físicas de líneas transgénicas para SBEIIa-dc y SBEIIb-dc, incluyendo la temperatura de gelatinización, utilizando un calorímetro de barrido diferencial Diamond de Perkin Elmer. Se mezclaron aproximadamente 20 mg de cada almidón con agua en una proporción 1:2, es decir, con un contenido de humedad de 66,7% y se sellaron en una cápsula de DSC. Se aplicó una tasa de calentamiento de 10°C por minuto para calentar las muestras de ensayo y de referencia de 0°C a 150°C. Los datos se analizaron utilizando el programa disponible en el instrumento.

Se observaron dos picos endotérmicos en la curva de DSC del termograma para cada almidón. El primer pico representa la descomposición de la estructura cristalina durante la gelatinización del almidón. El segundo pico representa la endoterma de disociación de amilosa-lípido. La temperatura del pico de gelatinización del almidón procedente de líneas transgénicas para SBEIIa-dc mostró un incremento de aproximadamente 7 a 10°C en comparación con la temperatura de pico para un almidón de control no transformado, y un incremento de aproximadamente 3 a 7°C en comparación con el almidón procedente de una línea transgénica para SBEIIb-dc.

20

Tabla 12. Propiedades térmicas del almidón de trigo transgénico medidas mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Líneas	Enzima diana	Pico 1 (Gelatinización)					Pico 2 (disociación amilosa-lípido)			
		Inicio	Pico	Final	Área	□ H	Inicio	Pico	Final	□ H
008	SBE IIb	58,8	63,7	70,8	234,8	4,5	93,2	103,5	110,3	0,7
012	SBE IIb	59,0	64,1	70,8	262,6	4,3	94,5	103,1	109,7	0,6
121	SBE IIa	53,7	67,5	86,9	156,4	2,6	92,4	102,9	108,9	0,7
087	SBE IIa	53,1	71,9	85,9	142,6	2,4	95,7	102,7	108,9	0,7
114	SBE IIa	53,0	68,1	88,0	125,2	2,1	92,8	102,5	109,6	0,8
109c	Control *	55,9	60,7	68,8	234,3	3,9	97,2	104,6	109,9	0,4

25

Se apreció un marcado incremento de la temperatura de final de gelatinización (primer pico), de aproximadamente 16 a 19°C, en estas líneas en comparación con tanto el control no transformado como las líneas transgénicas para SBEIIb-dc. La temperatura de inicio de gelatinización se presentó aparentemente antes en las líneas transgénicas para SBEIIa-dc que en las líneas transgénicas para SBEIIb-dc. Ng *et al.* (1997) informaron de una temperatura de inicio de la gelatinización del almidón de maíz extensor de amilosa (*ae*) similar al del almidón de maíz normal, aunque se producía un incremento significativo de la temperatura del pico de gelatinización en el almidón *ae* en comparación con el almidón normal. La entalpía de gelatinización del almidón procedente de líneas transgénicas para SBEIIa-dc era significativamente inferior a la de tanto el control como las líneas de SBEIIb-dc. Lo anterior aparentemente refleja el área significativamente menor del pico de gelatinización, lo que representa una cantidad reducida de amilopectina en las líneas transgénicas para SBEIIa-dc. No se observó ninguna alteración significativa del pico de disociación amilosa-lípido en ninguna de las líneas transgénicas. Por lo tanto, se ha obtenido almidón con este nuevo conjunto de propiedades.

30

35

**Referencias**

40

Abel et al., (1996). *The Plant Journal* 10, 981-991.

Anderson et al., (1989). *Nucl Acids Res* 17, 461462.

45

Baba et al., (1991). *Biochem Biophys Res Commun* 181: 87-94.

Batey and Curtin. (1996). *Starch* 48, 338-344.

Batey et al., (1997). *Cereal Chemistry* 74, 497-501.

50

Becker et al., (1994). *Plant J.* 5: 299-307.



- Blauth et al., (2001). *Plant Physiology* 125, 1396-1405.
- Bourque. (1995). *Plant Science* 105, 125-149.
- 5 Boyer and Preiss, (1978). *Carbohydrate Research* 61, 321-334.
- Boyer and Preiss, (1981). *Plant Physiology* 67, 1141-1145.
- Boyer et al., (1980). *Starch* 32, 217-222..
- 10 Buleon et al., (1998). *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
- Cao et al., (2000). *Archives. of biochemistry and Biophysics.* 373, 135-146.
- 15 Case et al., (1998). *Journal of Cereal Science* 27, 301-314.
- Cheng et al., (1997). *Plant Physiol* 115: 971-980.
- Craig et al., (1998). *Plant Cell* 10, 413-426.
- 20 Denyer et al., (1995). *Planta* 196: 256-265.
- Denyer et al., (1996). *Plant Physiology* 112, 779-785.
- 25 Feldman. (\*\*\*) pp 3-56 in *The World Wheat Book, A history of wheat breeding.* Eds Bonjean and Angus, Lavoisier Publishing, Paris.
- Ferguson. 1994. pp 55-77 in "Speciality Corns" eds , CRC Press Inc.
- 30 Filpse et al.,(1996). *Planta* 198, 340.
- Fisher et al., (1993). *Plant Physiol* 102:1045-1046.
- Fisher et al., (1996). *Plant Physiol* 110: 611-619.
- 35 Fuwa et al., (1999). *Starch/Starke.* 51, 147-151.
- Gao et al., (1997). *Plant Physiol* 114: 69-78.
- 40 Gao et al., (1998). *Plant Cell* 10, 399-412.
- Giroux and Hannah. (1994). *Molecular and General Genetics* 243, 400-408.
- Green et al., (1997). *Plant Physiology* 114, 203-212.
- 45 He et al., (1994). *Plant Cell Reports* 14: 192-196.
- Hedman and Boyer, (1982). *Biochemical Genetics* 20, 483-492.
- 50 Hess et al., (1990). *Plant Science* 72: 233-244.
- James et al., (1995). *Plant Cell* 7, 417-429.
- Jobling et al., (1999). *Plant Journal* 18, 163-171.
- 55 Komari et al., (1996). *Plant Journal* 10:165-174:
- Konik-Rose et al (2001) *Starch* 53, 14-20.
- 60 Krueger et al., (1987). *Cereal Chemistry* 64, 187-190.
- Kubo et al., (1999). *Plant physiology.* 121, 399-409.
- Li et al., (1999a). *Plant physiology.* 120, 1147-1155.
- 65 Li et al., (1999b). *Theoretical and Applied Genetics* 98, 1208-1216.

- Li et al., (2000). *Plant Physiology* 123, 613-624.
- Li et al., (2003). *Funct Integr Genomics* 3:76-85.
- 5 Maniatis et al., (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press New York.
- McCreery and Helentjaris (1994). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 28: Protocols for nucleic acid analysis by non-radioactive probes, 67-71, Humana Press Inc., Totawa, NJ.
- 10 Mizuno et al., (1993). *Journal of Biological Chemistry* 268, 19084-19091.
- Mizuno et al., (1992). *Journal of Biochemistry* 112, 643-651.
- 15 Morell et al., (1997). *Plant Physiology* 113, 201-208.
- Morell et al., (1998). *Electrophoresis* 19, 2603-2611.
- Morell et al., (2003). *Plant J.* 34: 173-185.
- 20 Morrison and Laignelet (1983). *Journal of Cereal Science* 1:9-20.
- Mullins et al., (1999). *European Journal of Plant Pathology* 105: 465-475.
- 25 Myers et al., (2000). *Plant Physiology* 122, 989-997.
- Nakamura (2002). *Plant Cell Physiology* 43, 718-725.
- Nakamura and Yamanouchi (1992). *Plant Physiol* 99: 1265-1266.
- 30 Nair et al., (1997). *Plant Sci* 122: 153-163.
- Nehra et al., (1994). *Plant J.* 5: 285-297.
- 35 Ng et al., (1997) *Cereal Chemistry* 74: 288-292.
- Nishi et al., (2001). *Plant Physiology* 127, 59-472.
- Rahman et al., (1995). *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 793-803.
- 40 Rahman et al., (1997). *Genome* 40: 465-474.
- Rahman et al., (1999). *Theor Appl Genet.* 98: 156-163.
- 45 Rahman et al., (2000). *J Cereal Sci* 31: 91-110.
- Rahman et al., (2001). *Plant Physiol* 125: 1314-1324.
- 50 Repellin et al., (1997). *Plant Gene Reg* 97-094
- Safford et al., (1998). *Carbohydrate Polymers* 35, 155-168.
- Schulman and Kammiovirta, (1991). *Starch* 43, 387-389.
- 55 Schwall et al., (2000). *Nature Biotechnology* 18, 551-554.
- Senior (1998). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15, 79-119.
- Shannon and Garwood, (1984). In *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler et al., eds, Academic Press, Orlando, FL, pp25-86.
- 60 Shure et al., (1983). *Cell* 35, 225-233.
- Sidebottom et al., (1998). *Journal of Cereal Science* 27, 279-287.
- 65 Stacey and Isaac (1994). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 28: Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive

- probes, pp 9-15, Humana Press Inc., Totawa, NJ.
- Sun et al., (1997). *The New Phytologist* 137, 215-215.
- 5 Takeda et al., (1993a). *Carbohydrate Research* 240, 253-262.
- Takeda et al., (1993b). *Carbohydrate Research* 246, 273-281.
- 10 Thomas and Atwell 1999 *Starches* Eagen Press, St Paul, Minnesota, USA pp: 13-24. Thorbjornsen et al., (1996). *Plant Journal* 10, 243-250.
- Vasil et al., (1992). *BiolTechnology* 10: 667-674.
- 15 Vasil et al., (1993). *Bio/Technology* 11: 1553-1558.
- Wang et al., (1998). *Journal of Experimental Botany* 49, 481-502.
- Weeks et al., (1993). *Plant Physiol* 102: 1077-1084.
- 20 Wegener et al., 1994. *Mol. Gen Genet.* 245, 465-470.
- Weir et al., (2001). *Aust J Plant Physiol* 28: 807-818.
- 25 Yamamori and Endo, (1996). *Theoretical and Applied Genetics* 93, 275-281.
- Yamamori et al., (2000). *Theor.Appl Genet.* 101, 21-29
- Young. (1984). in Whistler et al. (eds), Academic Press, Orlando, FL, chap 8. Zhao and Sharp, (1998). *Plant Breeding* 117: 488-490.
- 30 Zikiryeva and Kasimov, (1972). *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal* 6, 18-20.
- Zwar and Chandler, (1995). *Planta* 197, 39-48.
- 35 **Listado de secuencias**
- <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation Biogemma S.A.S  
GF Group Services Pty Ltd
- 40 <120> Trigo con alteraciones de la actividad de enzima ramificador y del almidón, y productos que contienen  
almidón derivados a partir del mismo
- <160> 35
- <210> 1
- 45 <211> 11476
- <212> ADN
- <213> *Aegilops tauschii*
- <223> wSBEII-D1 gen
- 50 <400> 1

ES 2 369 774 T3

agaaacacct	ccattttaga	ttttttttt	gttcttttcg	gacggtgggt	cgtggagaga	60
ttagogtcta	gttttcttaa	aagaacaggc	catttaggcc	ctgctttaca	aaaggctcaa	120
ccagtcctaaa	acgtctgcta	ggatcaccag	ctgcaaagtt	aagcgcgaga	ccaccaaaaac	180
aggcgcattc	gaactggaca	gacgctcacg	caggagccca	gcaccacagg	cttgagcctg	240
acagcggacg	tgagtgcgtg	acacatgggg	tcatctatgg	gcgtcggagc	aaggaagaga	300
gacgcacatg	aacaccatga	tgatgctatc	aggcctgatg	gagggagcaa	ccatgcacct	360
tttcccctct	ggaaattcat	agctcacact	tttttttaat	ggaagcaaga	gttggcaaac	420
acatgcattt	tcaaacaagg	aaaattaatt	ctcaaaccac	catgacatgc	aattctcaaa	480
ccatgcaccg	acgagtcctat	gcgaggtgga	aacgaagaac	tgaaaatcaa	catcccagtt	540
gtcagtgctga	gaagaggatg	acactgaaag	tatgctgatt	acgatttcat	ttacatacat	600
gtacaaatac	ataatgtacc	ctacaatttg	ttttttggag	cagagtgggtg	tggtcttttt	660
tttttacacg	aaaatgccat	agctggcccg	catgctgca	gatcggatga	tcggtcggag	720
acagcggaca	ctcagacact	caccaactgc	ttttgtctgg	gacacaataa	atgtttttgt	780
aaacaaaata	aatacttata	aacgagggta	ctagagggcg	ctaaccggcat	ggccaggtaa	840
acgcgctccc	agccgttggg	ttgcgatctc	gtcctcccgc	acgcagcgtc	gcctccaccg	900
tcctgcctgc	gctgccacct	ctgctgtgcg	cgcgcacgaa	gggaggaaga	acgaacgcgc	960
cacacacact	cacacacggc	acactccccg	tgggtcccct	ttccggcttg	gcgtctatct	1020
cctctcccc	gcccattccc	atgcaactga	ccgtacccgc	cagcttccac	cccgcgcga	1080
cacgttgctc	ccccttctca	tcgcttctca	attaatatct	ccatcactcg	ggttccgcgc	1140
tgcatttcgg	ccggcggggt	gagtggatgc	tgggcgactg	gctgactcaa	tcactacgcg	1200
gggatggcga	cgttcgcggg	gtccggcgcg	actctcgggt	tggcgcgggc	cggcgtcggg	1260
gtggcgcggg	gcgtctcggg	gcggaggggc	ggggcggact	tgccgtcctg	gctcctcagc	1320
aagaaggact	cctctcgtac	gcctcgtctc	ctcgaatctc	ccccgtctgg	ctttggetce	1380
cctctctctc	cctctcgcgg	cgcatggcct	gttcgatgct	gttccccaat	tgatctccat	1440
gagtggagaga	gatagctgga	ttagggcgtc	gcgcttctg	aacctgtatt	ttttcccccg	1500
gcgggaaatg	agtttagtgc	acccagcccc	tgggtgtacc	acggctttga	tcattctctg	1560
tttcattctg	atatatattt	tctcattctt	tttcttctg	ttcttgetgt	aactgcaagt	1620
tgtggcgttt	tttcaactat	gtagtcaccc	ttgcattttg	caggcgcctg	cctgagccgc	1680
gcggcctctc	caggggaagg	cctggtgcct	gacggcgaga	gngacgactt	ggcaagtccg	1740
gcgcaacctg	aagaattaca	ggtacacaca	ctcgtcccgg	taaatcttca	tacaatcgtt	1800
attcacttac	caaatgccgg	atgaaaccaa	ccacggatgc	gtcaggtttc	gagcttcttc	1860
tatcagcatt	gtgcagtact	gcactgcctt	gttcattttg	ttagccttgg	cccctgtctg	1920
gctcttgggc	cactgaaaaa	atcagatgga	tgtgcattct	agcaagaact	tcacaacata	1980
atgcaccggt	tggggtttcg	tcagctgctc	ctacaattgc	tatttttctg	gctgtagata	2040
cctgaagata	tcgaggagca	aacggcggaa	gtgaaacatga	caggggggac	tgcaagaaaa	2100
cttcaatctt	cagaaccgac	tcagggcatt	gtggaacaaa	tcactgatgg	tgtaacaaaa	2160
ggagttaagg	aactagtcgt	gggggagaaa	ccgcgagttg	tccccaaaacc	aggagatggg	2220
cagaaaaatg	acgagattga	cccaacactg	aaagattttc	ggagccatct	tgactaccgg	2280
taatgcctac	ccgctgcctt	cgctcatttt	gaattaaggt	cctttcatca	tgcaaatttg	2340
gggaacatca	aagagacaaa	gactagggac	caccatttca	tacagatccc	ttcgtgggtct	2400
gagaatatgc	tgggaagtaa	atgtataatt	gatggctaca	atttgctcaa	aattgcaata	2460
cgaaataactg	tctccgatca	ttacaattaa	agagtggcaa	actgatgaaa	atgtggtgga	2520
tgggttatag	attttacttt	gctaattcct	ctaccaaat	cctagggggg	aaatctacca	2580
gttgggaaac	ttagtttctt	atctttgtgg	cctttttggt	ttggggaaaa	cacattgcta	2640
aattcgaatg	attttgggta	tacctcggtg	gattcaacag	atacagcgaa	tacaagagaa	2700
ttcgtgctgc	tattgaccaa	catgaagggtg	gattggaagc	attttctcgt	ggttatgaaa	2760
agcttggtatt	taccgcagg	taaatttata	gctttattat	tatgaaacgc	ctccactagt	2820
ctaattgcat	atcttataag	aaaatttata	attcctgttt	tcccctctct	tttttccagt	2880
gctgaaggta	tcgtctaatt	gcatactta	taagaaaatt	tatattctctg	ttttccccta	2940
ttttccagtg	ctgaaggat	cacttaccga	gaatgggctc	cctggagcgc	atgttatggt	3000

ctttaagtt	cettaacgag	acaccttcca	atattattggt	aatggctact	attcaccaac	3060
tagcttactg	gacttacaaa	ttagcttact	gaactactgac	cagttactat	aaatttatga	3120
tctggctttt	gcaccctggt	acagctctgca	gcattagtag	gtgacttcaa	caattggaat	3180
ccaaatgcag	atactatgac	cagagtatgt	ctacagcttg	gcaattttcc	acctttgctt	3240
cataactact	gatacatcta	tttgtattta	tttagctggt	tgacacattcc	ttaaagttga	3300
gcctcaacta	catcatatca	aaatgggtata	atttgtcagt	gtcttaagct	tcagcccaaa	3360
gattctactg	aatttagtcc	atctttttga	gattgaaaat	gagtatatta	aggatgaatg	3420
aatacgtgca	acactcccat	ctgcattatg	tgtgcttttc	catctacaat	gagcatattt	3480
ccatgctatc	agtgaagggt	tgtctctatt	gatgcagata	tttgatatgg	tcttttcagg	3540
atgattatgg	tgtttggggag	attttctctcc	ctaacaacgc	tgatggatcc	tcagctatcc	3600
ctcatggctc	acgtgtaaag	gtaagctggc	caattattta	gtcggaggatg	tagcattttc	3660
gaactctgcc	tactaagggt	cccttttctct	ctctgttttt	tagatacggga	tggatactcc	3720
atccgggtgtg	aaggattcaa	tttctgcttg	gatcaagttc	tctgtgcagg	ctccagggtga	3780
aatacctttc	atggcatat	attatgatcc	acctgaagag	gtaagtatcg	atctacatta	3840
cattatataa	tgaaatttcc	agtgttacag	ttttttaata	cccacttctt	actgacatgt	3900
gagtcgaagac	aatacttttg	aatttgggaag	tgacatatgc	athtaattcac	cttctaaggg	3960
ctaaggggca	accaaccttg	gtgatgtgtg	tatgcttgtg	tgtgacataa	gatcttatag	4020
ctcttttatg	tgttctctgt	tggttaggat	attccatttt	ggccttttgt	gaccatttac	4080
taaggatatt	tacatgcaaa	tgcaggagaa	gtatgtcttc	caacatctca	actaaacgac	4140
cagagtcaact	aaggatttat	gaatcacaca	ttggaatgag	cagccccgta	tgtcaataag	4200
ttatttcacc	tgtttctgggt	ctgatgggtt	atctatgga	ttttctagtt	ctgttatgta	4260
ctgttaacat	attacatggt	gcattcactt	gacaacctcg	attttatttt	ctaattgtctt	4320
catattggca	agtgcaaaac	tttcttctct	ctttgtctgc	ttgttctttt	gtcttctgta	4380
agatttccat	tgcatttgga	ggcagtgggc	atgtgaaagt	catatctatt	ttttttttgt	4440
cagagcatag	ttatatgaat	tccattgttg	ttgcaatagc	tcggataaat	gtaacctatg	4500
tactagctta	agatttccca	cttaggatgt	aagaaatatt	gcattggagc	gtctccagca	4560
agccatttcc	taccttatta	atgagagaga	gacaaggggg	gggggggggg	gggggttccc	4620
ttcattatcc	tgcgagcgat	tcaaaaactt	ccattgttct	gaggtgtacg	tactgcaggg	4680
atctcccatt	atgaagagga	tatagttaat	tctttgtaac	ctacttggaa	acttgagtct	4740
tgaggcatcg	ctaataata	ctatcatcac	aatacttaga	ggatgcatct	gaanatttta	4800
gtgtgatctt	gcacaggaac	cgaagataaa	ttcatatgct	aattttaggg	atgaggtgtt	4860
gccaagaatt	aaaaggcttg	gatacaatgc	agtgcagata	atggcaatcc	aggagcattc	4920
atactatgca	agctttgggt	atccacacaa	tccatttttt	tctgtataca	cntcttcacc	4980
catttgaggc	tattacatcc	taatgcttca	tgacataaaa	atatttggat	ataatccttt	5040
acttagatata	tagtacaact	acacttagta	ttctgannaa	naagatcatt	ttattgttgt	5100
tggcttgttc	caggtaccat	gttactaatt	tttttgcacc	aagtagccgt	tttggaaactc	5160
cagaggactt	aaaatccttg	atcgatagag	cacatgagct	tggtttgcct	gttcttatgg	5220
atattgttca	taggtaatta	gtccaattta	attttagctg	ttttactgtt	tatctgggat	5280
tctaagggga	aattcaggca	attatgatca	atgtcaaaa	gctaagagtg	gcgaaagtga	5340
aatgtcaaaa	tctagagtgg	cataaggaaa	attggcaaaa	actagagtgg	caaaaaataa	5400
attttcccat	cctaaatggc	agggccctat	cgccgaatat	ttttccattc	tatataattg	5460
tgctacgtga	cttctttttt	ctcagatgta	ttaaaccagt	tggacatgaa	atgtattttg	5520
tacatgtagt	aaactgacag	ttccatagaa	tatcgttttg	taatggcaac	acaatttgat	5580
gccatagtag	tggattgaga	agttcagatg	ctatcaatag	aattaatcaa	ctggccatgt	5640
actcgtggca	ctacatatag	tttgcaagtt	ggaaaactga	cagcaatacc	tcactgataa	5700
gtggccaggc	cccacttgcc	agcttcatac	tagatgttac	ttccctgttg	aattcatttg	5760
aacatattac	ttaaagttct	tcatttgtcc	taagtcaaac	ttctttaagt	ttgaccaagt	5820
ctattggaaa	atataatcaac	atctacaaca	ccaaattact	ttgatcagat	taacaatttt	5880
tattttatta	tattagcaca	tctttgatgt	tgtagataatc	agcacatttt	tctatagact	5940
tggtaaaata	tagagaagtt	tgacttagga	caaatctaga	acttcaatca	atttggatca	6000
gagggaaacat	caataaatat	agatagatgt	caacacttca	acaaaaaat	cagaccttgt	6060
caccatataat	gcacagacc	atctgtttgc	tttagccact	tgctttcata	tttatgtgtt	6120
tgtacctaat	ctacttttcc	ttctacttgg	tttggttgat	tctatttcag	ttgcattgct	6180
tcatcaatga	ttttgtgtac	cctgcagtca	ttcgtcaaat	aatacccttg	acgggttgaa	6240
tggtttogat	ggcactgata	cacattactt	ccacgggtgt	ccacgcggcc	atcattggat	6300
gtgggattct	cgtctattca	actatgggag	ttgggaagta	tgtagctctg	acttctgtca	6360
ccatattttg	ctaactgttc	ctgttaactc	gttcttacac	atgttgatat	tctattctta	6420
tgcaggatatt	gagattctta	ctgtcaaacg	cgagatgttg	gcttgaagaa	tataagtttg	6480
atggatttccg	atttgatggg	gtgacctcca	tgatgtatac	tcaccatgga	ttacaagtaa	6540
gtcatcaagt	ggtttcagta	acttttttag	ggcactgaaa	caattgctat	gcatcataac	6600
atgtatcatg	atcaggactt	gtgctacgga	gtcttagata	gttccctagt	atgcttgtac	6660
aattttacct	gatgagatca	tgggaagattg	gaagtgatta	ttattttatt	tctttctaag	6720
tttgttctct	gttctagatg	acatttactg	ggaactatgg	cgaatatttt	ggatttgcta	6780
ctgatgttga	tgcggtagtt	tacttgatgc	tggtaacga	tctaattcat	ggactttatc	6840

ctgatgctgt	atccattgggt	gaagatgtaa	gtgcttacag	tatttatgat	ttttaactag	6900
ttaagtagtt	ttatlttggg	gatcagtctg	ttacactttt	tgttaggggt	aaaatctctc	6960
ttttcataac	aatgctaatt	tataccttgt	atgataatgc	atcacttang	taatttgaaa	7020
agtgcaaggg	cattcaagct	tacgagcata	ttttttgatg	gctgtaattt	atttgatagt	7080
atgcttgttt	gggtttttca	ataagtggga	gtgtgtgact	aatgttgtat	tatttattta	7140
attgctggaag	aaatgggcaa	ccttgtcaat	tgcttcagaa	ggctaacttt	gattccataa	7200
acgctttgga	aatgagaggg	tattcccaag	gacatgaatt	atacttcagt	gtgttctgta	7260
catgtatttg	taatagtggg	ttaacttaaa	ttcctgcaat	gctatggaat	ctcactgtat	7320
gttgnagtgt	tacacatcca	caaacaagta	atcctgagct	ttcaactcat	gagaaaatan	7380
gangtccgct	tctgcccagca	ttaactgttc	acagttctaa	tttgtgtaac	tgtgaaattg	7440
ttcagggtcag	tggaatgctt	acattttgca	tccctgttcc	agatgggggt	gttggttttg	7500
actaccgcct	gcatatggct	gtagcagata	aatggattga	actcctcaag	taagtgcagg	7560
aatattgggtg	attacatgctg	cacaatgatc	tagattacat	tttctaatag	gtaaaaagga	7620
aaatagtgtat	gtgaatatct	agacatttgc	ctgttatcag	cttgaatacg	agaagtcaaa	7680
tacatgattt	aaatagcaaa	tctcggaaat	gtaatggcta	gtgtctttat	cttggggcag	7740
gtacattgctg	ctgttagcagg	caagtcaaca	cagttagcaa	tattttcaga	aacaatatta	7800
tttatatccg	tatatganga	aagttagtat	ataaactgtg	gtcattaatt	gtgttcacct	7860
tttgtcctgt	ttaaggatgg	gcagtaggta	ataaatttag	ccagataaaa	taaatcggtta	7920
ttaggtttac	aaaaggaata	tacagggcca	tgtagcatat	ctagttgtaa	ttaatgaaaa	7980
ggctgacaaa	aggctcggta	aaaaaaactt	tatgatgatc	cagatagata	tcaggaacg	8040
cgactaaagc	tcaataactt	attgtacta	cacagctgcc	aatctgtcat	gatctgtgtt	8100
tgtcttgtgtg	ctatttagat	ttaaatacta	actcgataca	ttggcaataa	taaaacttaac	8160
tattcaacca	atlttgggtga	taccaganat	ttctgccctc	ttgttagtaa	tgatgtgctc	8220
cctgctgctg	ttctctgccc	ttacaaaagc	tgttttcagt	tttttgcac	attatttttg	8280
tgtgtgagta	gttttaagcat	gttttttgaa	gctgtgagct	gttggctact	aatacattct	8340
tggaagtgtc	caaatatgct	gcagtgtaat	ttagcatttc	tttaacacag	gcaaagtgc	8400
gaatccttga	aaatggggca	tattgtgcac	accctaacaa	atagaagggtg	gcttgagaag	8460
tgtgtaactt	atgcaagaag	tcatgatcaa	gcactagtgt	gtgacaagac	tattgcattc	8520
tggttgatgg	ataaggtact	agctgttact	tttggacaaa	agaattactc	cctcccgttc	8580
ctaaatataa	gtcctttgtag	agattccact	atggaccaca	tagtatatag	atgcatttta	8640
gagtgtagat	tcactcattt	tgcttcgtat	gtagtccata	gtgaaatctc	tacagagact	8700
tatatttagg	aacggagggga	gtacataaatt	gatttgtctc	atcagattgc	tagtgttttc	8760
ttgtgataaa	gattggctgc	ctcaccctac	accagctatt	tcccactgtg	tacttgagca	8820
gaatttgcctg	aaaacgtacc	atgtggctac	gtggcggctt	gtgaactttg	acagttatgt	8880
tgcaatttttc	tgctcttatt	tatttgattg	cttatgttac	cgttcatttg	ctcattcctt	8940
tccgagacca	gccaaaagtca	cgtgttagct	gtgtgatctg	ttatctgaat	cttgagcaaa	9000
ttttattaat	aggctaaaaat	ccaacgaatt	atlttgcttga	atlttaaatat	acagacgtat	9060
agtcacctgg	ctctttctta	gatgatattc	atagtgctg	aaggctgaaa	tagttttggg	9120
gtttcttggga	tgccgcctaa	aggagtgtat	tttattggat	agattcctgg	ccgagtcttc	9180
gttacaacat	aacattttgg	agatgtgctt	agtaacagct	ctgggaagtt	tggtcacaag	9240
tctgcatcta	cacgtcctt	gaggttttat	tcttggccca	tctttgtaac	tagtggcacc	9300
tgttaaggaaa	cacattcaaa	aggaaaagggt	cacatcattc	taatcaggac	caccatacta	9360
agagcaagat	tctgttccaa	ttttatgagt	ttttgggact	ccaaagggaa	caaaagtgtc	9420
tcataattgtg	cttataacta	cagttgtttt	tataccagtg	tagttttatt	ccaggacagt	9480
tgatacttgg	tactgtgctg	taaattattt	atccgacata	gaacagcatg	aacatatcaa	9540
gctctctttg	tgaggatata	gtatgatttc	atggctctgg	ataggcttca	actcttcgca	9600
ttgatcgtgg	catagcatta	cataaaatga	tcaggcttgt	caccatgggt	ttagttgggtg	9660
aaggctatct	taacttcatg	ggaaatgagt	ttgggcatcc	tggtcagtct	ttacaacatt	9720
attgcattct	gcatgattgt	gatttactgt	aatttgaacc	atgcttttct	ttcacattgt	9780
atgtattatg	taatctgttg	cttccaagga	ggaagttaac	ttctatttac	ttggcagaat	9840
ggatagattt	tccaagaggc	ccacaaactc	ttccaaccgg	caaagttctc	ccctggaaat	9900
acaatagttt	atgataaatg	ccgcctgtaga	tttgatcttg	taagtttttag	ctgtgctatt	9960
acattccctc	actagatctt	tattggccat	tattttcttg	atgaaatcat	aatgtttggt	10020
aggaaaagatc	aacattgctt	ttgtagtttt	gtagacgtta	acataagtat	gtgttgagag	10080
ttgttgatca	ttaaaaatat	catgattttt	tgcaagggaga	tgcaagtttt	cttagatatac	10140
gtggtatgca	agagtctgat	caggcaatgc	agcatcttga	ggaaaaatat	ggggtatgtc	10200
actggtttgt	ctttgttgca	taacaagtca	cagtttaacg	tcagtctctt	caagtggtaa	10260
aaaaagtgtg	gaattaattc	ctgtaatgag	atgaaaactg	tgcaaaaggcg	gagctggaaat	10320
tgcttttcac	caaaactatt	ttcttaagtg	cttgtgtatt	gatacatata	ccagcactga	10380
caatgtaact	gcagtttatg	acatctgagc	accagtatgt	ttcacggaaa	catgaggaag	10440
ataaggtgat	catcctcnaa	aagaggagat	ttggtatttg	ttttcaactt	ccactggagc	10500
aatagctttt	ttgactaccg	tgttgggtgt	tccaagcctg	ggaagtacaa	ggtatgcttg	10560
ccttttcatt	gtccaccctt	caccagtagg	gtagtgggg	gcttctacaa	cttttaattc	10620
cacatggata	gagtttggtg	gtcgtgcagc	tatcaatata	aagaataggg	taatttgtaa	10680

ES 2 369 774 T3

```

agaaaagaat ttgctcgagc tgtttagacc ataggaaggt tgttcttaac agccccgaag 10740
cacataccat tcattcatat tatctactta agtgtttggt tcaatcttta tgctcagttg 10800
gactcgggtc aatactagaa ctatthttccg aatctaccct aaccatccta gcagttttag 10860
agcagcccca tttggacaat tggctggggt tttgttagtt gtgacagttt ctgctattht 10920
ttaatcaggt ggctttggac tctgacgatg cactctttgg tggattcagc aggcttgatc 10980
atgatgtcga ctacttcaca accgtaagtc tgggctcaag cgtcacttga ctctcttga 11040
ctcaactgct tacaaaatctg aatcaacttc ccaattgctg atgcccttgc aggaacatcc 11100
gcatgacaac aggcgcgct ctttctcggg gtacactccg agcagaactg cggctcgtgta 11160
tgcccttaca gaggtaagaac cagcagcggc ttgttacaag gcaagagag aactccagag 11220
agctcgtgga tcgtgagcga agcagcgggc aacggcgcga ggctgctcca agcgcctatg 11280
ctgggagggg atcgtgcctc ttcccagat gccaggagga gcagatggat aggtagcttg 11340
ttggtgagcg ctcgaaagaa aatggacggg cctgggtggt tgttgtgctg cactgaaccc 11400
tcctcctatc ttgcacatcc cgggttgttt ttgtacatat aactaataat tgccccgtcg 11460
ctcaactgta aatccc 11476

```

- <210> 2
- <211> 6520
- 5 <212> ADN
- <213> Tritium aestivum
- <223> gen parcial wSBElIb

<400> 2

```

aagctttgta gccttgcaag ggtcccccaa caaactgcct cactcgattg tcaaaaaagt 60
aaaaatgatt gtagaaaaaa aaactgactc actcgtcact accctaccgt cctacatgac 120
acctggcgcg aagacgacgc cgtcctcctg ccgcgcgcgt ccgcgatac accaccgcaa 180
aaacccaaac ctcttcgccc gtgctgcccc cgctaccatc catgcagccg tccgcccggc 240
cgccgcttgc ccgcaccacc cgtcggcggc caccacgcgc ccactctcgc gtgaaggctc 300
cgtccgcttc ctcttagtcc cactctctct ccgtgctagc agtataatag atccgcccctc 360
cgccccctcc caatcttaga acaccccctc ctttgcctcc tcatttctgct cgcgtggggt 420
taagcaggag acgagggcgg gtcagttggg cagttagggt ggatccgatc cggctgcggc 480
ggcggcgacg ggtggctgc gccggcattc gcagtttccg cggcggggct ggccccggcc 540
tcggctcctc gatccggcgg ggcagagcgg agggggcgcg ggggtggagct gcagtcgcca 600
tcgctgctct tcggcgcgaa caagggcacc cgttcacccc gtaattatth gcgccacct 660
tctcaactca attctctcgt gtattctgtc gtgctcgcct ttcgcgcgac acgctgccc 720
attcgttatc gggctgcggg gttcagcag cttacgctcg ttccctcctg gtgtgtgat 780
gtctgtaggt gccgtcggcg tcggagggtc tggatggcgc gtggatcatg gcgogggggg 840
gccgtccggg gagggtgatga tccttgacgg cggtagtggc ggaacaccgc ctthccatcga 900
cggthccggt cagttcagat ctgatgatct gaaggtagtt thttttttgc atcgatctga 960
aggtaactga catatactac tgtattaccc tgagtaaaata tgcaccacct atthttatgg 1020
ttcgtttgaa atacctgttt acttgctacg gttttcactc tcattgagac gtcggacgaa 1080
attcactgaa thcctataat ttggtagaca ccgaaatata tactactcct tccgtcccat 1140
aatataagag cgtthttggc accttatatt atagggcgga gggagtagct tttaggtcaa 1200
aataattggt gctthttcaa tgtatacaag aattcaaaata thttttttaa aaaaaaatca 1260
actaatgggt tgagtttcaa gtgaagcgtt ttggctcctt ggctgagatg taaaccgaaa 1320
tcactgaaat tcatagtagc cgaacttata atagaactga aactcaaaat ctgctatccg 1380
gcgaaattct aaagatttgc ttatthcaca cgtagggtgc agtacaccct cthttctaatt 1440
tattggggaa ggggtattat tatcttgta gtacctgcct gcatgacaat tgaaatctaa 1500
gacaaaacac catagagcag gcctacacac ggtagggttg thtacaacta tgtgtgccac 1560
agttcgtctg aactthttgt ccttcacatc gtgttaggtt ccattcatg atgatgaaac 1620
aagcttacag gatggagggt aagatagtat ttggtcttca gagacaaatc aggttagtga 1680
agaaattgat gctgaagaca cgagcagaat ggacaaagaa tcactctacga gggagaaatt 1740
acgcattctg ccaccaccgg gaaatggaca gcaaatatac gagattgacc caaccgtccg 1800
agactttaag taccatcttg agtatcggta tgcttcgctt ctattgtgtg cactthtaaa 1860
acaatttaca gtctttgata agatgtgaaat ggctgcttgc tgtgacacga aactcttgaa 1920
gttcgtagtc actcttgtgt gttcatggtt ctgaggtaac atggtaaccg aacaaaaata 1980
ggaaagtggc aagcactgca atgtgagcta ctgataacca ccatgttaa ttgggtacac 2040
tgatthaat atatgtcttc atgggctcta thttttttca atatctatg caattgaaac 2100
acaatgcttt gtggacgggt gttctthttac cctctcttcc tatcaataga tgatgtcat 2160
actcatgct atcctacaaa aaattgaaaca acaatgccac thtccccgt gttgcttht 2220
taaggatgaa acacatatgt ccagatcaaaa ctatactagc agtctaactg tgccttaatg 2280
gatcaaaaac agatatagcc tatacaggag aatacgttca gacattgatg aacacgaagg 2340
aggcatggat gtatthttcc cgggttacga gaagtttggaa thtatgcgca ggtgaaattt 2400
cttgactaaa taactatgta tctactthtt cttgtactc tatcaacatt cctcttccca 2460
tgcagcgtg aaggtatcac ttaccgagaa tgggctcctg gagcagatgt acgttctct 2520
aaccatctga tcgtttacct gactatacta attctatctt tcaactaatt gtgaataatt 2580
actgctcatc agctatccta aggttgggga thttgcacct cccagatgaa cagcatatta 2640

```

ES 2 369 774 T3

agtgcacaaa	ctagcattat	taagaactaa	ctcctgcttc	caattgcagt	ctgcagcatt	2700
agttggcgac	ttcaacaatt	gggatccaaa	tgcgagccat	atgagcaaa	tatgcatgta	2760
gtttcacaaa	tatatcatal	tttctttgta	gatttttttt	tttagatcgg	cttatctatt	2820
acggttgagct	gtaaatatag	ttggaagtgt	ttaggagat	taaattcact	ggactctatt	2880
ctttcacttg	ctgtttgcac	gagcccatta	ctagatatca	atggtgatga	tgcttttggt	2940
gtatgaggtc	gaagtgaaac	atgcatgtta	cccttttata	taagtaaggt	tgccatgta	3000
ttttttatga	tctaaacatt	atttactgat	ttgttcttg	caagacacta	agcagtttta	3060
cataataatg	gcgttgagc	aggccgactg	cacatctgaa	ctgtagctcc	atgtggttga	3120
tatagattac	aaatgctcat	attcaatgta	actgttttca	gaatgacctt	ggtggttggg	3180
agatttttct	gccaaacaat	gcagatggtt	cgccaccaat	tcctcacggc	tcacgggtga	3240
agggtgtttt	cttctccttg	ccaacgggtg	taggctcagg	aacatgtcct	gtattactca	3300
gaagctcttt	tgaactctta	ggtgagaatg	gatactccat	ctgggataaa	ggattccaat	3360
cctgcttgya	tcaagtactc	cgtgcagact	ccaggagata	taccatacaa	tggaaatata	3420
tatgatcttc	ccgaagaggt	attttacttc	atcttctgtg	cttttagatt	tcagatattt	3480
ttattagaag	aaaattatga	ttttttccct	cacgaacctt	cccaattgct	atttcaagct	3540
gtcctactta	tttgctgctg	gcatcttatt	ttctattct	ctaaccagtt	atgaaattcc	3600
ttacatgcat	atcgaggaga	agtatgtatt	caagcatcct	caacctaaac	gaccaaaatc	3660
attgoggata	tatgaaacac	atggtggcat	gagtagcccg	gtatttcatc	tttaccatgt	3720
attccataaa	tgaagttagc	tatatgcagt	tcaaatttat	ttacaggttg	ttacaatggt	3780
atttttgtgt	tggtgcccct	ctttcgtttt	ataagtaaaa	aacttatcat	aaatttattt	3840
gttatgccgc	ttggttaata	caatctgaaa	aatgtaactg	tggacaactg	agaactagat	3900
aatacaaatc	tgaaaaaaca	tgctggaata	gtgtcatttc	agtcaactag	gatgttttga	3960
atgctcaaga	gaagtactag	tgtgtagcat	caaaagctgg	tgtccatttg	ttcaaagtgt	4020
taattaacac	tatagtgaaa	acaagtaatt	gcacaaagaa	acaagtaatt	gcccaagttc	4080
atagtttttt	tcaactatatt	acatgtttca	tcaacaattt	aattaacctc	attccttaca	4140
aacatttgta	tttaccattg	ttcctacata	tatagttatt	ttatatatca	actttataaa	4200
tcactgactgt	tataattaaa	accgatggta	tatcaacgat	tgagataaatt	tggcatatgt	4260
ggatgaaatt	tgtggcttgt	tatgctcttg	ttttaataac	ataataaata	gattatgctt	4320
ggttgtagct	tttttacatt	aacacatggg	caattacttg	tttctttgtg	caaccaggaa	4380
ccaaagatcg	acacatatgc	aaacttcagg	gatgaggtgc	ttccaagaat	taaaagactt	4440
ggatacaatg	cagtgcacat	aatggcaatc	caagagcact	catactatgg	aagctttggg	4500
tagttctctg	ggtcagattc	tggttctttt	agttatcttt	tgtccataga	acatatttca	4560
actttagcaa	ctatactatt	atattaactt	ttcagctatt	gtcttntctt	ttcttatgty	4620
agagactgct	gntcttggct	acttctctg	ttctcattca	gagtanacat	cttatganta	4680
gacaactcta	tgtngacatt	ccggaagtat	ncactggctg	attcggctca	aaataacata	4740
ctgctcagat	agccacataa	cagtacgatt	acacacataa	tgacctagtt	tgcatagagt	4800
ggcggtagta	tgttctctac	catactagca	taatgacttg	ttatataaga	gtatatcata	4860
ttaaactctt	ttccaatgac	atggaagctg	taacaacttt	caaatcattt	ttgtctttta	4920
agtgtgctt	ttttcctggt	tgacaattaa	tacaatacca	cttttatgty	tttttacttc	4980
tattgcaggt	accatgttac	caatttcttt	gcaccaagta	gctgttttgg	gtccccagaa	5040
gatttaaaat	ctttgatgta	tagagctcac	gagcttggct	tgggtgtcct	catggatgty	5100
gttcacaggt	acttaatgta	atttgaggtt	ggcgtgttaa	gttcacatta	atcttaattc	5160
tttatttcaa	ttcctatggc	ctctctccta	gattggaaca	gtaaaagcat	catccagttt	5220
gtataaattg	ctaaaagaac	atttttacatg	ttaaagtatt	tcaattacta	tgaaacatat	5280
aaattttacat	acttattgat	tttacgacag	aagtaccgat	ctcacaaagt	gaacaattgg	5340
ttgatcacat	atcatttcat	actacaatac	aagaaaatga	atagagaacg	agttaatatt	5400
agccttggtg	aaatcagcaa	cttgtttgga	aataaaagtat	agtgatgcca	gtgcaanaaa	5460
caaggcatca	agttggtttc	agctcccacg	gtcgggtgcta	gctgtcaagg	gtaatttgca	5520
cgtagtcgca	catagatttg	tgtgggagty	gaaagtaacc	acagattgty	cgaggaaacac	5580
gggacacacg	tcttagccac	aggtttgggc	tccccttgat	gctgggtagta	gctttactcc	5640
ttatagaaa	ttatctcaag	atagatttca	atttggggtt	acacttanga	actcancaag	5700
ttaaagatca	actcctgag	ttctatacga	ctgatctttg	accgagat	cttgatcagg	5760
ctaagtanca	aaatccaggc	cttgagatgt	tgaacatgty	cttctatttg	ggctgggtgty	5820
ccttgggcat	aaggtgtngt	ccttctctca	tgtgcttctt	gcagcgtatg	acataaaact	5880
cctctgagtt	ggtanatgca	cggttccctt	tgaggaaatc	aggggtagty	gcactctngg	5940
aaagtgtggtc	accangcat	ggatcctcng	cgcacaccgg	gcaaacaccg	tgaaccact	6000
tctctctgac	actagctaac	ttgacattca	agcaactaa	gaatataact	ttatntctaa	6060
atgaaccgga	caccctctt	gtgctgcac	ctacagagta	caatgccagt	tttggactga	6120
actcttgtgt	tcatgtatgt	gctaatacna	taggttctaa	ccatgattct	aaatagcggc	6180
ttataactcc	actatagtaa	tgtatagcgt	tttanaagat	cccgcactaa	gggaccttag	6240
tccaaataca	tgatcaaaaa	ttttacatag	cgctctatag	ctatttataaa	ctatggctcac	6300
ccgctaagag	gcataactcg	ctatttataaa	ctatggttct	aacttttaat	ctattttatg	6360
tcttgggtcca	aagccccttt	ttgttctata	gctttactct	tgggttgaga	tcacccttaa	6420
cccattggta	atcctgggtg	atttactcca	tccttctctg	ctgtagcttta	cttttgggtt	6480
ttgtttctc	acagtcacgc	gtcaaaataat	accttggagc			6520

5 <210> 3  
 <211> 420  
 <212> ADN



ES 2 369 774 T3

<213> Triticum aestivum  
 <223> gen parcial wSBella del genoma A o B

<400> 3  
 5 y11282

cgccagcttc	cacccccgcc	gcacacgttg	ctcccccttc	tcategettc	tcaattaata	60
tctccatcac	tcgggttccg	cgetgcattt	cggccggcgg	gttgagtgag	atctgggcca	120
ctgaccgact	cactcgctcg	ctgcgcgggg	atggcgactg	tcgoggtgtc	cggcgcgacc	180
ctcgtgtgtg	cgcgccccgc	cgcgccccgc	ggcggactgc	tgccgcgata	cggctcggag	240
cggagggggc	gggtggacct	gccgtcgctg	ctcctcagga	agaaggactc	ctctcgcgcc	320
gtcctgagcc	gcgcggcctc	tccaggggaag	gtcctggtgc	ctgacggtga	gagcgacgac	380
ttggcaagtc	cgggcgaacc	tgaagaatta	cagatacctg			420

<210> 4  
 <211> 419  
 <212> ADN  
 <213> Triticum aestivum  
 <223> gen parcial wSBella del genoma A o B

<400> 4

sr997

gccactgacc	gactcactcg	ctcgtcgccg	ggggatggcg	acgtttgctg	tgccggcgcc	60
gacctcgggt	gtggcgcgcc	ccgcggcgcc	cggcgggcga	ctgctgccgc	gatccggctc	120
ggagcggagg	ggcgggggtg	acctgcctgc	gctgctcttc	aggaagaagg	actcctctcg	180
cgccgtcctg	agccgcggcg	cctctccagc	gaaggctcct	gtgcctgacg	gtgagagcga	240
cgacttgcca	agtcggcgcc	aacctgaaga	attacagat			419

<210> 5  
 <211> 413  
 <212> ARN  
 <213> Triticum aestivum  
 <223> gen parcial wSBella de genoma D

<400> 5

sr995

ggcgggttga	gtgagatctg	ggcgactggc	tgactcaatc	actacgctgg	gatggcgacg	60
ttcgcggtgt	cggcgcgac	tctcgggtgt	gcgcggggcc	gcgtcggagt	ggcgcggggc	120
ggctcggagc	ggagggggcg	ggcggacttg	ccgtcgtgct	tcctcaggaa	gaaggactcc	180
tctcgcgccc	tcttgagccg	cgcggcctct	ccaggggaag	tcttggtgcc	tgacggcgag	240
agcgacgact	tgcaagtccg	gcgcaacctg	aag			413

<210> 6  
 <211> 408  
 <212> ADN  
 <213> Tritium aestivum  
 <223> gen parcial wSBella del genoma A o B

<400> 6

sbe9

acgttgctcc	cccttctcat	cgtttctcaa	ttaatatttc	catcactcgg	ttccgcgctg	60
catttcggcc	ggcgggttga	gtgagatctg	ggcactgac	cgactcactc	gctcgtgctg	120
gggatggcga	cgttcgcggg	gtccggcgcg	accctcgggt	tgccgcggcc	gccggcgggc	180
gcgcaacctg	aagaattaca	gatacctg				408

<210> 7  
 <211> 818  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum  
 <223> proteína wSBella del genoma A o B

<400> 7

sr854

Met	Ala	Thr	Phe	Ala	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	Arg
1				5					10					15
Ala	Gly	Val	Gly	Val	Ala	Arg	Ala	Gly	Ser	Glu	Arg	Arg	Gly	Gly
				20					25					30
Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser	Arg
				35					40					45
Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Pro

ES 2 369 774 T3

	50		55		60
Asp Gly Glu Ser	Asp Asp Leu Ala Ser	Pro Ala Gln Pro Glu Glu			
	65		70		75
Leu Gln Ile Pro	Glu Asp Ile Glu Glu	Gln Thr Ala Glu Val Asn			
	80		85		90
Met Thr Gly Gly	Thr Ala Glu Lys Leu	Gln Ser Ser Glu Pro Thr			
	95		100		105
Gln Gly Ile Val	Glu Thr Ile Thr Asp	Gly Val Thr Lys Gly Val			
	110		115		120
Lys Glu Leu Val	Val Gly Glu Lys Pro	Arg Val Val Pro Lys Pro			
	125		130		135
Gly Asp Gly Gln	Lys Ile Tyr Glu Ile	Asp Pro Thr Leu Lys Asp			
	140		145		150
Phe Arg Ser His	Leu Asp Tyr Arg Tyr	Ser Glu Tyr Lys Arg Ile			
	155		160		160
Arg Ala Ala Ile	Asp Gln His Glu Gly	Gly Leu Glu Ala Phe Ser			
	165		170		175
Arg Gly Tyr Glu	Lys Leu Gly Phe Thr	Arg Ser Ala Glu Gly Ile			
	180		185		190
Thr Tyr Arg Glu	Trp Ala Pro Gly Ala	His Ser Ala Ala Leu Val			
	195		200		205
Gly Asp Phe Asn	Asn Trp Asn Pro Asn	Ala Asp Thr Met Thr Arg			
	210		215		220
Asp Asp Tyr Gly	Val Trp Glu Ile Phe	Leu Pro Asn Asn Ala Asp			
	225		230		230
Gly Ser Ser Ala	Ile Pro His Gly Ser	Arg Val Lys Ile Arg Met			
	235		240		245
Asp Thr Pro Ser	Gly Val Lys Asp Ser	Ile Ser Ala Trp Ile Lys			
	250		255		260
Phe Ser Val Gln	Ala Pro Gly Glu Ile	Pro Phe Asn Gly Ile Tyr			
	265		270		275
Tyr Asp Pro Pro	Glu Glu Lys Tyr Val	Phe Gln His Pro Gln Arg			
	280		285		290
Lys Arg Pro Glu	Ser Leu Arg Ile Tyr	Glu Ser His Ile Gly Met			
	295		300		305
Ser Ser Pro Glu	Pro Lys Ile Asn Ser	Tyr Ala Asn Phe Arg Asp			
	310		315		320
Glu Val Leu Pro	Arg Ile Lys Arg Leu	Gly Tyr Asn Ala Val Gln			
	325		330		335
Ile Met Ala Ile	Gln Glu His Ser Tyr	Tyr Ala Ser Phe Gly Tyr			
	340		345		350
His Val Thr Asn	Phe Phe Ala Pro Ser	Ser Arg Phe Gly Thr Pro			
	355		360		365
Glu Asp Leu Lys	Ser Leu Ile Asp Arg	Ala His Glu Leu Gly Leu			
	370		375		380
Leu Val Leu Met	Asp Ile Val His Ser	His Ser Ser Asn Asn Thr			
	385		390		395
Leu Asp Gly Leu	Asn Gly Phe Asp Gly	Thr Asp Thr His Tyr Phe			
	400		405		410
His Gly Gly Pro	Arg Gly His His Trp	Met Trp Asp Ser Arg Leu			
	415		420		425
Phe Asn Tyr Gly	Ser Trp Glu Val Leu	Arg Phe Leu Leu Ser Asn			
	430		435		440
Ala Arg Trp Trp	Leu Glu Glu Tyr Lys	Phe Asp Gly Phe Arg Phe			
	445		450		455
Asp Gly Val Thr	Ser Met Met Tyr Thr	His His Gly Leu Gln Met			
	460		465		470
Thr Phe Thr Gly	Asn Tyr Gly Glu Tyr	Phe Gly Phe Ala Thr Asp			
	475		480		485
Val Asp Ala Val	Val Tyr Leu Met Leu	Val Asn Asp Leu Ile His			
	490		495		500
Gly Leu Tyr Pro	Asp Ala Val Ser Ile	Gly Glu Asp Val Ser Gly			
	505		510		515
Met Pro Thr Phe	Cys Ile Pro Val Pro	Asp Gly Gly Val Gly Phe			

ES 2 369 774 T3

				520					525				530	
Asp	Tyr	Arg	Leu	His	Met	Ala	Val	Ala	Asp	Lys	Trp	Ile	Glu	Leu
				535					540				545	
Leu	Lys	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	Trp	Lys	Met	Gly	Asp	Ile	Val	His
				550					555				560	
Thr	Leu	Thr	Asn	Arg	Arg	Trp	Leu	Glu	Lys	Cys	Val	Thr	Tyr	Ala
				565					570				575	
Glu	Ser	His	Asp	Gln	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Ile	Ala	Phe
				580					585				590	
Trp	Leu	Met	Asp	Lys	Asp	Met	Tyr	Asp	Phe	Met	Ala	Leu	Asp	Arg
				595					600				605	
Pro	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Leu	His	Lys	Met
				610					615				620	
Ile	Arg	Leu	Val	Thr	Met	Gly	Leu	Gly	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asn
				625					630				635	
Phe	Met	Gly	Asn	Glu	Phe	Gly	His	Pro	Glu	Trp	Ile	Asp	Phe	Pro
				640					645				650	
Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Pro	Thr	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Asn
				655					670				675	
Asn	Asn	Ser	Tyr	Asp	Lys	Cys	Arg	Arg	Arg	Phe	Asp	Leu	Val	Asn
				680					685				690	
Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Tyr	Arg	Gly	Met	Gln	Glu	Phe	Asp	Gln	Ala
				695					700				705	
Met	Gln	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Gly	Phe	Met	Thr	Ser	Glu	His
				710					715				720	
Gln	Tyr	Val	Ser	Arg	Lys	His	Glu	Glu	Asp	Lys	Val	Ile	Ile	Leu
				725					730				735	
Lys	Arg	Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Val	Phe	Asn	Phe	His	Trp	Ser	Asn
				740					745				750	
Ser	Phe	Phe	Asp	Tyr	Arg	Val	Gly	Cys	Ser	Lys	Pro	Gly	Lys	Tyr
				755					760				765	
Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Asp	Asp	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Phe	Ser
				770					775				780	
Arg	Leu	Asp	His	Asp	Val	Asp	Tyr	Phe	Thr	Thr	Glu	His	Pro	His
				785					790				795	
Asp	Asn	Arg	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Val	Tyr	Thr	Pro	Ser	Arg	Thr
				800					805				810	
Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Thr	Glu							
				815										

- <210> 8
- <211> 833
- 5 <212> PRT
- <213> Triticum aestivum
- <223> proteína wSBElIa del genoma D

<400> 8

y11282														
Met	Ala	Thr	Phe	Ala	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	Arg
				5					10					15
Pro	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu
				20					25					30
Arg	Arg	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys
				35					40					45
Asp	Ser	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys
				50					55					60
Val	Leu	Val	Pro	Asp	Gly	Glu	Ser	Asp	Asp	Leu	Ala	Ser	Pro	Ala
				65					70					75
Gln	Pro	Glu	Glu	Leu	Gln	Ile	Pro	Glu	Asp	Ile	Glu	Glu	Gln	Thr
				80					85					90
Ala	Glu	Val	Asn	Met	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser
				95					100					105
Ser	Glu	Pro	Thr	Gln	Gly	Ile	Val	Glu	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Val
				110					115					120
Thr	Lys	Gly	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Glu	Lys	Pro	Arg	Val
				125					130					135

Val	Pro	Lys	Pro	Gly	Asp	Gly	Gln	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile	Asp	Pro
				140					145					150
Thr	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Ser	His	Leu	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Glu
				155					160					165
Tyr	Arg	Arg	Ile	Arg	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	His	Glu	Gly	Gly	Leu
				170					175					180
Glu	Ala	Phe	Ser	Arg	Gly	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Ser
				185					190					195
Ala	Glu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Trp	Ala	Pro	Gly	Ala	His	Ser
				200					205					210
Ala	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Trp	Asn	Pro	Asn	Ala	Asp
				215					220					225
Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Asp	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Ile	Phe	Leu	Pro
				230					235					240
Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Pro	His	Gly	Ser	Arg	Val
				245					250					255
Lys	Ile	Arg	Met	Asp	Thr	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	Ser	Ile	Ser
				260					265					270
Ala	Trp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe
				275					280					285
Asn	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Val	Phe
				290					295					300
Gln	His	Pro	Gln	Pro	Lys	Arg	Pro	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Tyr	Glu
				305					310					315
Ser	His	Ile	Gly	Met	Ser	Ser	Pro	Glu	Pro	Lys	Ile	Asn	Ser	Tyr
				320					325					330
Ala	Asn	Phe	Arg	Asp	Glu	Val	Leu	Pro	Arg	Ile	Lys	Arg	Leu	Gly
				335					340					345
Tyr	Asn	Ala	Val	Gln	Ile	Met	Ala	Ile	Gln	Glu	His	Ser	Tyr	Tyr
				350					355					360
Ala	Ser	Phe	Gly	Tyr	His	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Ala	Pro	Ser	Ser
				365					370					375
Arg	Phe	Gly	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Asp	Arg	Ala
				380					385					390
His	Glu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Val	His	Ser	His
				395					400					405
Ser	Ser	Asn	Asn	Thr	Leu	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	Phe	Asp	Gly	Thr
				410					415					420
Asp	Thr	His	Tyr	Phe	His	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	His	His	Trp	Met
				425					430					435
Trp	Asp	Ser	Arg	Leu	Phe	Asn	Tyr	Gly	Ser	Trp	Glu	Val	Leu	Arg
				440					445					450
Phe	Leu	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	Trp	Trp	Leu	Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe
				455					460					465
Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp	Gly	Val	Thr	Ser	Met	Met	Tyr	Thr	His
				470					475					480
His	Gly	Leu	Gln	Met	Thr	Phe	Thr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Phe
				485					490					495
Gly	Phe	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Ala	Val	Val	Tyr	Leu	Met	Leu	Val
				500					505					510
Asn	Asp	Leu	Ile	His	Gly	Leu	His	Pro	Asp	Ala	Val	Ser	Ile	Gly
				515					520					525
Glu	Asp	Val	Ser	Gly	Met	Pro	Thr	Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Pro	Asp
				530					535					540
Gly	Gly	Val	Gly	Leu	Asp	Tyr	Arg	Leu	His	Met	Ala	Val	Ala	Asp
				545					550					555
Lys	Trp	Ile	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	Trp	Lys	Met
				560					565					570
Gly	Asp	Ile	Val	His	Thr	Leu	Thr	Asn	Arg	Arg	Trp	Leu	Glu	Lys
				575					580					590
Cys	Val	Thr	Tyr	Ala	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Ala	Leu	Val	Gly	Asp
				595					600					605
Lys	Thr	Ile	Ala	Phe	Trp	Leu	Met	Asp	Lys	Asp	Met	Tyr	Asp	Phe
				610					615					620

Met Ala Leu Asp Arg Pro Ser Thr Pro Arg Ile Asp Arg Gly Ile  
 625 630 635  
 Ala Leu His Lys Met Ile Arg Leu Val Thr Met Gly Leu Gly Gly  
 640 645 650  
 Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Met Gly Asn Glu Phe Gly His Pro Glu  
 655 660 665  
 Trp Ile Asp Phe Pro Arg Gly Pro Gln Thr Leu Pro Thr Gly Lys  
 670 680 685  
 Val Leu Pro Gly Asn Asn Asn Ser Tyr Asp Lys Cys Arg Arg Arg  
 690 695 700  
 Phe Asp Leu Gly Asp Ala Asp Phe Leu Arg Tyr His Gly Met Gln  
 705 710 715  
 Glu Phe Asp Gln Ala Met Gln His Leu Glu Glu Lys Tyr Gly Phe  
 720 725 730  
 Met Thr Ser Glu His Gln Tyr Val Ser Arg Lys His Glu Glu Asp  
 735 740 745  
 Lys Val Ile Ile Phe Glu Arg Gly Asp Leu Val Phe Val Phe Asn  
 750 755 760  
 Phe His Trp Ser Asn Ser Phe Phe Asp Tyr Arg Val Gly Cys Ser  
 765 770 775  
 Arg Pro Gly Lys Tyr Lys Val Ala Leu Asp Ser Asp Asp Ala Leu  
 780 785 790  
 Phe Gly Gly Phe Ser Arg Leu Asp His Asp Val Asp Tyr Phe Thr  
 795 800 805  
 Thr Glu His Pro His Asp Asn Arg Pro Arg Ser Phe Ser Val Tyr  
 810 815 820  
 Thr Pro Ser Arg Thr Ala Val Val Tyr Ala Leu Thr Glu  
 825 830

- <210> 9
- <211> 22
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Cedabor
  
- <400> 9
- 10 cccgctgctt tcgctcattt tg 22
  
- <210> 10
- <211> 23
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
- <223> Cebador
  
- <400> 10
- 20 gactaccgga gctcccacc ttc 23
  
- <210> 11
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <223> Cebador
  
- <400> 11
- agatgtgaat ggctgcttgc tg 22
  
- <210> 12
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <223> Cebador
- 35
  
- <400> 12
- caggtcgacc atatgggaga gc 22
  
- <210> 13
- <211> 18
- <212> PRT
- 40

# ES 2 369 774 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<223> péptido sintético	
	<400> 13	
	<b>Ala Ala Ser Pro Gly Lys Val Leu Val Pro Asp Glu Ser Asp Asp</b>	
	5 10 15	
5		
	<b>Leu Gly Cys</b>	
	<210> 14	
	<211> 12	
10	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> péptido sintético	
	<400> 14	
	<b>Ala Gly Gly Pro Ser Gly Glu Val Met Ile Gly Cys</b>	
15	5 10	
	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador	
	<400> 15	
25	atcacttacc gagaatggg	19
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador	
	<400> 16	
	ctgcattgg attccaattg	20
35	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador	
40	<400> 17	
	cacccattgt aattgggtac actg	24
45	<210> 18	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador	
50	<400> 18	
	tccatgcctc cttcgtgttc atca	24
	<210> 19	
	<211> 24	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Cebador	
	<400> 19	
60	ctgcgcataa atccaaact ctcg	24
	<210> 20	

# ES 2 369 774 T3

	<211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
5	<400> 20 ctatgccaat tgaacaaca tgc	23
10	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
15	<400> 21 cgtgttcac aatgtctgaa cg	22
20	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
25	<400> 22 ggatatgtat gatttcattg	20
30	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
35	<400> 23 ccataaagtt aagataacc	20
40	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
45	<400> 24 gacatcagac caccagtacg	20
50	<210> 25 <211> 20 <212> ARN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
55	<400> 25 ctcccaggc ttaaacagc	20
60	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
65	<400> 26 ggtaccgcag aaaatatacg agattgacct	30
70	<210> 27 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

# ES 2 369 774 T3

	<223> Cebador	
5	<400> 27 atcacttacc gagaatggg	19
10	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> P Cebador	
15	<400> 28 ctgcattgg attccaattg	20
20	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
25	<400> 29 ccaagtacca gtgggaacg c	21
30	<210> 30 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
35	<400> 30 cggtgggatc caacggccc	19
40	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
45	<400> 31 catgtgagct agcttcgcc c	21
50	<210> 32 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
55	<400> 32 gggcaaacgg aatctgatcc	20
60	<210> 32 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
65	<400> 32 gggcaaacgg aatctgatcc	20
60	<210> 33 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial <223> Cebador	
65	<400> 33 ccagatcgta tatcggaagg tcg	23



# ES 2 369 774 T3

<210> 34  
<211> 27  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<223> Cebador

<400> 34  
gcaaaagcca gatcataaat ttagagc 27

10 <210> 35  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <223> Cebador

<400> 35  
ctccaattc attgtaatg gtcacac 27

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Grano obtenido a partir de una planta del trigo, que comprende almidón, en el que la proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 50%, comprendiendo dicho grano un nivel reducido de la proteína SBElIa, actividad de enzima SBElIa o ambos en el endospermo en comparación con el grano de tipo salvaje, y que comprende una variación genética que conduce a una reducción del nivel de expresión del gen *SBElIa*, de la actividad del enzima SBElIa en el endospermo, o de ambos, respecto al grano de tipo salvaje, comprendiendo dicha variación genética una mutación en un gen *SBElIa* o un ácido nucleico introducido que codifica un inhibidor de la expresión del gen *SBElIa* en el que dicho inhibidor es una molécula antisentido, cosupresora, ribozima o dúplex de ARN que presenta como diana el gen *SBElIa*.  
10
2. Grano según la reivindicación 1, en el que el nivel de la proteína SBElIa, de actividad del enzima SBElIa o de ambas en el endospermo se encuentra reducido en por lo menos 50% respecto al grano de tipo salvaje.
- 15 3. Grano según la reivindicación 1 ó 2, en el que la variación genética comprende una mutación en un gen SBElIa que conduce a un nivel reducido de la proteína SBElIa, de actividad del enzima SBElIa o de ambos en el endospermo respecto al grano de tipo salvaje.
- 20 4. Grano según la reivindicación 1, 2 ó 3, que comprende una mutación nula en por lo menos un gen SBElIa.
5. Grano según la reivindicación 4, en el que la planta es hexaploide y el grano comprende mutaciones nulas en dos o tres genes SBElIa.
- 25 6. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un nivel reducido de la proteína SBElIb, de actividad enzimática o de ambas respecto al grano de tipo salvaje.
- 30 7. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende una mutación en el que el gen SBElIa se encuentra ausente del brazo largo del cromosoma 2A o en el que el gen *SBElIa* en el brazo largo del cromosoma 2A comprende una mutación que conduce a unas proteína SBElIa, actividad del enzima SBElIa reducidas o a ambas, en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje.
8. Grano según la reivindicación 7, en el que la mutación es una mutación nula del gen SBElIa.
- 35 9. Grano según la reivindicación 7 ó 8, en el que el gen SBElIa en el brazo largo del cromosoma 2A comprende una mutación que conduce a unas proteína SBElIa, actividad del enzima SBElIa reducidas, o a ambas, en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje, y en el que dicha mutación es una delección de parte del gen *SBElIa*.
- 40 10. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además una mutación en el que el gen SBElIb se encuentra ausente del brazo largo del cromosoma 2A o en el que el gen SBElIb en el brazo largo del cromosoma 2A comprende una mutación que conduce a unas proteína SBElIb, actividad del enzima SBElIb reducidas, o a ambas, en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje.
- 45 11. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la delección interrumpe la expresión de tanto el gen SBElIa como el gen SBElIb en el brazo largo del cromosoma 2A.
12. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la planta es una planta de trigo *durum*.
- 50 13. Grano según la reivindicación 12, que comprende además una variación genética que conduce a una actividad de enzima ramificador del almidón reducida codificada por el gen SBElIa en el brazo largo del cromosoma 2B respecto al grano de tipo salvaje, en el que dicha variación genética comprende una ausencia de gen SBElIa del brazo largo del cromosoma 2B o una mutación del gen SBElIa del brazo largo del cromosoma 2B que conduce a una actividad del enzima SBElIa reducida en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje.
- 55 14. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la planta es *Triticum aestivum ssp aestivum*.
- 60 15. Grano según la reivindicación 14, que comprende una variación genética que conduce a una actividad de enzima ramificador del almidón reducida codificada por el gen SBElIa en el(los) brazo(s) largo(s) del cromosoma 2B, del cromosoma 2D o ambos cromosomas, respecto al grano de tipo salvaje, en el que dicha variación genética comprende una ausencia de gen SBElIa de por lo menos uno de dichos cromosomas o una mutación del gen SBElIa de por lo menos uno de dichos cromosomas que conduce a una actividad reducida del enzima SBElIa en el endospermo de dicho grano respecto al grano de tipo salvaje.
- 65 16. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en el que el nivel de actividad del enzima SBElIa es reducido en por lo menos 40% respecto al grano de tipo salvaje.

17. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la amilopectina del grano presenta una proporción reducida de la fracción de longitud de cadena de 4 a 12 dp respecto a la amilopectina del grano de tipo salvaje, medida tras la desramificación con isoamilasa de la amilopectina.
- 5 18. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 que es no arrugado.
19. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que presenta un peso medio de por lo menos 36 mg.
- 10 20. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que por lo menos 50% de los gránulos de almidón del grano presentan una apariencia no birrefringente al observarlas bajo luz polarizada.
21. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el contenido de almidón del grano en el caso de que esté desnudo es de por lo menos 25% (p/p) o que presenta un contenido de almidón que es por lo menos 90% del contenido de almidón del grano de tipo salvaje.
- 15 22. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que es un grano integral o molido, pulverizado, perlado, laminado, triturado o precocido.
- 20 23. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende además un nivel reducido de la proteína SBEI, de actividad del enzima SBEI o de ambos.
24. Grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende además un nivel alterado de un enzima en comparación con el grano de tipo salvaje, en el que dicho enzima se selecciona de entre el grupo constituido por ADP glucosa pirofosforilasa, GBSS, SSI, SSII, SSIII, un enzima desramificador de tipo isoamilasa, un enzima desramificador de tipo pululanasa y cualquier combinación de los mismos.
- 25 25. Planta del trigo que puede producir el grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.
- 30 26. Planta del trigo según la reivindicación 25 que es *Triticum Aestivum* ssp. *aestivum* o *Triticum turgidum* L. ssp. *durum*.
27. Gránulos de almidón extraídos del grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en los que la proporción de amilosa en el almidón de los gránulos es de por lo menos 50%.
- 35 28. Almidón extraído del grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que la proporción de amilosa en dicho almidón de los gránulos es de por lo menos 50%.
29. Producto que comprende el grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, o harina, harina integral, sémola o almidón producido(a) a partir del grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, o cualquier combinación de los mismos.
- 40 30. Producto según la reivindicación 29, en el que la harina, harina integral, sémola o almidón se combina con harina, harina integral, sémola o almidón procedente de otra fuente.
- 45 31. Producto según la reivindicación 29 que es un producto no alimenticio.
32. Composición que comprende el almidón según la reivindicación 28 y otro ingrediente alimenticio o agua.
- 50 33. Procedimiento para producir una planta del trigo que puede producir grano que comprende las etapas siguientes:
- 55 i) introducir una variación genética en una planta o semilla madre de trigo, conduciendo dicha variación genética a una reducción del nivel de expresión del gen *SBEIIa*, de la actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o a ambos, con respecto al grano de tipo salvaje, que comprende la introducción de un ácido nucleico que codifica un inhibidor de la expresión del gen *SBEIIa* en una célula regenerable de trigo y regenerar una planta de trigo transgénico a partir de la célula transformada, en el que dicho inhibidor es una molécula antisentido, cosupresora, ribozima o dúplex de ARN que presenta como diana el gen *SBEIIa*, e
- 60 ii) identificar una planta o semilla progenie de la planta o semilla madre de trigo, que presenta un nivel reducido de expresión del gen *SBEIIa*, de actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o ambas, con respecto al grano de tipo salvaje,
- en el que el grano comprende almidón y en el que la proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 50%.
- 65 34. Procedimiento de producción de almidón, que comprende: (i) obtener grano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, e (ii) extraer el almidón de dicho grano.

35. Procedimiento de producción de una planta del trigo que puede producir grano, que comprende las etapas siguientes:

5 i) introducir una variación genética en una planta o semilla madre de trigo, conduciendo dicha variación genética a una reducción del nivel de la expresión del gen *SBEIIa*, de la actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o a ambas, con respecto al grano de tipo salvaje, que comprende:

- 10
- inducir artificialmente una mutación en la semilla o planta madre de trigo con un agente químico o radiación,
  - identificar una planta o semilla del trigo que presenta una mutación en un gen *SBEIIa* o un gen *SBEIIb*, que comprende las etapas que consisten en cribar una población de plantas o semillas del trigo con un marcador molecular que se encuentra ligado al gen *SBEIIb*, o al gen *SBEIIa*, respectivamente, del trigo; e identificar la planta o semilla basándose en la presencia o ausencia del marcador molecular ligado, e
- 15

ii) identificar una planta o semilla progenie de la planta o semilla madre del trigo, que presenta un nivel reducido de expresión del gen *SBEIIa*, de actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o ambas, respecto al grano de tipo salvaje;

20 en el que el grano comprende almidón y en el que la proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 50%.

36. Procedimiento de producción de una planta del trigo que puede producir grano que comprende las etapas siguientes:

25 i) introducir una variación genética en una planta o semilla madre del trigo, conduciendo dicha variación genética a una reducción del nivel de expresión del gen *SBEIIa*, de la actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o a ambas, con respecto al grano de tipo salvaje, que comprende:

- 30
- inducir artificialmente una mutación en una semilla o planta madre del trigo con un agente químico o radiación,
  - identificar una planta o semilla del trigo que presenta una mutación en un gen *SBEIIa*, o un gen *SBEIIb*, que comprende las etapas que consisten en cribar una población de plantas o semillas del trigo con un anticuerpo que es específico para la proteína *SBEIIb* o la proteína *SBEIIa*, respectivamente, del trigo, e identificar la planta o semilla basándose en la presencia o ausencia de unión del anticuerpo, e
- 35

ii) identificar una planta o semilla progenie de la planta o semilla madre del trigo, que presenta un nivel reducido de expresión del gen *SBEIIa*, de actividad del enzima SBEIIa en el endospermo, o ambas, con respecto al grano de tipo salvaje,

40 en el que el grano comprende almidón y en el que la proporción de amilosa en el almidón del grano es de por lo menos 50%.

agaaacacct ccattttaga tttttttttt gttcttttcg gacggtgggt  
 cgtggagaga ttagcgteta gttttcttaa aagaacaggc catttaggcc  
 ctgctttaca aaaggctcaa ccagtccaaa acgtctgcta ggatcaccag  
 ctgcaaggtt aagcgcgaga ccaccaaaac aggcgcattc gaactggaca  
 gacgctcacg caggagccca gcaccacagg cttgagcctg acagcggacg  
 tgagtgcgtg acacatgggg tcatctatgg gcgtcggagc aaggaagaga  
 gacgcacatg aacaccatga tgatgctatc aggcctgatg gaggggagcaa  
 ccatgcacct tttccctctt ggaaattcat agtccacact ttttttaat  
 ggaagcaaga gttggcaaac acatgcattt tcaaacaggg aaaattaatt  
 ctcaaacacac catgacatgc aattctcaaa ccatgcaccg acgagtccat  
 gcgaggtgga aacgaagaac tgaaaatcaa catcccagtt gtogagtoga  
 gaagaggatg acactgaaag tatgcgtatt acgatttcat ttacatacat  
 gtacaataac ataattgtacc ctacaatttg ttttttgag cagagtgggtg  
 tggctttttt tttttacacg aaaatgccat agctggcccg catgcgtgca  
 gatcggatga tcggtcggag acgacggaca atcagacact caccaactgc  
 tttgtctcgg gacacaataa atgtttttgt aaacaaaata aatacttata  
 aacgagggta ctagaggccg ctaacggcat ggccaggtaa acgcgctccc  
 agccgttggg ttgcatctc gtcctcccgc acgcagcgtc gcctccaccg  
 tccgtccgctc gctgccacct ctgctgtgcg cgcgcacgaa gggaggaaga  
 acgaacgccc cacacacact cacacacggc aactccccg tgggtcccct  
 ttcgggcttg gcgctctatc cctctcccc gccatcccc atgcactgca  
 ccgtaccccgc cagctccac ccccgcgca cacgttgctc cccctctca  
 tcgcttctca attaatatct ccatcactcg ggttccgctc tgcatctcgg  
 ccggcggtt gagtgagatc tgggcgactg gctgactcaa tcaactacgcy  
 gggatggcga cgttcgcggt gtcggcgcg actctcgggtg tggcgcgggc  
 cggcgtcggg gtggcgcggg ccggctcggg ggcggggggc gggcgggact  
 tgccgtcgtc gctcctcagg aagaaggact cctctogtac gcctcgtct  
 ctcaaatctc ccccgctcgg ctttgctec cctctctct cctctcgcg  
 cgcattggctt gttcgtatct gttcccctat tgatctccat gagtggagaga  
 gatagctgga ttagggcgtc ggccttctg aacctgtatt tttcccccg  
 cggggaaatg cgttagtgct acccaggccc tgggtgtacc acggttttga  
 tcattctctg tttcattctg atatatatt tctcattctt tttctctctg  
 ttcttgctgt aactgcaagt tgtggcggtt tttcactatt gtagtcatcc  
 ttgcattttg caggcgccgt cctgagccgc gcggcctctc cagggaaggt  
 cctggtgctt gacggcgaga gngacgactt ggcaagtccg gcgcaacctg  
 aagaattaca ggtacacaca ctgctgcccg taaatcttca tacaatcgtt  
 atcacttac caaatgccgg atgaaaccaa ccacggatgc gtcagggttc  
 gagcttcttc tatcagcatt gtgcagtaet gcactgcctt gttcattttg  
 ttagccttgg ccccgtgctg gctcttgggc cactgaaaaa atcagatgga  
 tgtgcatctc agcaagaact tcacaacata atgcaccgtt tggggtttcg  
 tcagtctgct ctacaattgc tatttttctg gctgtagata cctgaagata  
 tcgaggagca aacggcggaa gtgaacatga cagggggggac tgcaagaaa  
 ctcaatctt cagaaccgac tcagggcatt gtggaacaa tcaactgatg  
 tgtaaccaa ggagttaagg aactagtcgt gggggagaaa ccccgagttg  
 tcccaaaacc aggagatggg cagaaaatat acgagattga cccaactg  
 aaagattttc ggagccatct tgactaccgg taatgcctac ccgctgctt  
 cgctcatttt gaattaagggt cctttcatca tgcaaatttg ggaacatca  
 aagagacaaa gactagggac caccatttca tacagatccc ttcgtggctt  
 gagaatatgc tgggaagtaa atgtataatt gatggctaca atttgctcaa  
 aattgcaata cgaataactg tctccgatca ttacaatcaa agagtggcaa  
 actgatgaaa atgtgggtgga tgggttatag attttacttt gctaattcct  
 ctaccaaatt cctagggggg aaatctacca gttgggaaac ttagtttctt  
 atctttgtgg cctttttggt ttggggaaaa cacatgcta aattcgaatg  
 attttgggta tacctcggtg gatteaacag atacagcgaa tacaagagaa  
 ttogtgctgc tattgaccaa catgaagggt gattggaagc attttctcgt  
 ggttatgaaa agcttgatt taccccgagg taaatttaaa gctttattat  
 tatgaaacgc ctccactagt ctaattgcat atcttataag aaaatttata  
 attcctgctt tcccctctct tttttccagt gctgaaggta tcgtetaatt  
 gcatatctta taagaaaatt tatattcctg ttttccccta ttttccagtg

FIGURA 1

ctgaaggat cacttaccga gaatgggctc cctggagcgc atgttatggt  
 cttttaagtt ccttaacgag acacctcca atttattggt aatggctcact  
 atccaccaac tagcttactg gacttacaaa ttagcttact gaatactgac  
 cagttactat aaatttatga tctggctttt gcaccctggt acagtctgca  
 gcattagtag gtgacttcaa caattggaat ccaaatgcag atactatgac  
 cagagtatgt ctacagcttg gcaattttcc accttggctt cataactact  
 gatacatcta tttgtattta tttagctggt tgcacattcc ttaaagtga  
 gcctcaacta catcatatca aaatgggata atttgtcagt gtcttaagct  
 tcagcccaaa gattctactg aatttagtcc atctttttga gattgaaaat  
 gagtatatta aggatgaatg aatcagtgca acactcccat ctgcattatg  
 tgtgcttttc catctacaat gagcatattt ccatgctatc agtgaagggt  
 tgctcctatt gatgcagata tttgatatgg tcttttcagg atgattatgg  
 tgtttgggag attttccctcc ctaacaacgc tgatggatcc tcagctattc  
 ctcatggctc acgtgtaaag gtaagctggc caattattta gtcgaggatg  
 tagcattttc gaactctgce tactaagggt cccttttccct ctctgttttt  
 tagatacggg tggatactcc atccgggtg aaggattcaa tttctgcttg  
 gatcaagttc tctgtgcagg ctccagggtga aatacctttc aatggcatat  
 attatgatcc acctgaagag gtaagtatcg atctacatta cattattaaa  
 tgaatattcc agtgttacag ttttttaata cccacttctt actgacatgt  
 gagtcaagac aatacttttg aatttggaa gacatattgc attaatcac  
 cttctaaggg ctaaggggca accaaccttg gtgatgtgtg tatgcttggg  
 tgtgacataa gatcttatag ctcttttatg tgttctctgt tggtaggat  
 attccatttt ggctttttgt gaccatttac taaggatatt tacatgcaaa  
 tgcaggagaa gtatgtcttc caacatctca actaaacgac cagagtcact  
 aaggatttat gaatcacaca ttggaatgag cagcccggta tgtcaataag  
 ttatttcacc tgtttctggt ctgatgggtt atctatgga ttttctagtt  
 ctggtatgta ctgtaacat attacatggt gcattcactt gacaacctcg  
 attttatttt ctaatgtctt catatggca agtgcaaaac tttgcttcc  
 ctttgtctgc ttgttctttt gtcttctgta agatttccat tgcatttggg  
 ggcagtgggc atgtgaaagt catatctatt ttttttttgt cagagcatag  
 ttatatgaat tccattggtg ttgcaatagc tccgtataat gtaaccatgt  
 tactagctta agatttccca cttaggatgt aagaaatatt gcattggagc  
 gtctccagca agccatttcc taccttatta atgagagaga gacaaggggg  
 gggggggggg gggggttccc ttcattattc tgcgagcgat tcaaaaactt  
 ccattgttct gaggtgtacg tactgcaggg atctccatt atgaagagga  
 tatagttaat tctttgtaac ctacttggaa acttgagtct tgaggcatcg  
 ctaatatata ctatcatcac aatacttaga ggatgcatct gaanattta  
 gtgtgatctt gcacaggaac cgaagataaa ttcatatgct aattttaggg  
 atgaggtggt gccagaatc aaaaggcttg gatacaatgc agtgcagata  
 atggcaatcc aggagcattc ataactatga agctttgggt atccacaaa  
 tccatttttt tctgtataca cntcttcacc catttggagc tattacatcc  
 taatgcttca tgcacataaa atatttggat ataactcttt attagatata  
 tagtacaact acacttagta ttctgamaa naagatcatt ttattgttgt  
 tggcttgttc caggaccat gttactaatt tttttgacc aagtagccgt  
 tttggaactc cagaggactt aaaatccttg atcgatagag cacatgagct  
 tggtttgctt gttcttatgg atattgttca taggtaatta gtccaattta  
 attttagctg ttttactggt tatctgggat tctaaagggg aattcaggca  
 attatgatac attgcaaaa gctaagagtg gcaaaagtga aatgtcaaaa  
 tctagagtgg cataaggaaa attgcaaaa actagagtgg caaaaataaa  
 attttcccat cctaaatggc agggccctat cgcgaatat ttttccatc  
 tatataattg tgcacagtgga ctctttttt ctcagatgta ttaaaccagt  
 tggacatgaa atgtatttgg tacatgtagt aaactgacag ttccatagaa  
 tatcgttttg taatggcaac acaatttgat gccatagatg tggattgaga  
 agttcagatg ctatcaatag aattaatcaa ctggccatgt actcgtggca  
 ctacatatag tttgcaagtt ggaaaactga cagcaatacc tcaactgataa  
 gtggccaggc cccacttgcc agcttctacac tagatgttac ttcctgtttg  
 aattcatttg aacatattac ttaaagttct tcatttgcct taagtcaaac  
 ttctttaagt ttgaccaagt ctattggaaa atatatcaac atctacaaca  
 ccaattact ttgatcagat taacaatttt tattttatta tattagcaca

FIGURA 1

tctttgatgt tgtagatatac agcacatttt tctatagact tgggtcaata  
tagagaagtt tgacttagga caaatctaga acttcaatca atttggatca  
gagggaaacat caaataatat agatagatgt caacacttca acaaaaaaat  
cagaccttgt caccatataat gcatcagacc atctgtttgc tttagccact  
tgctttcata tttatgtgtt tgtacctaata ctacttttcc ttctacttgg  
tttgggtgat tctatttcag ttgcattgct tcatcaatga ttttgtgtac  
cctgcagtcata ttcgtcaaat aatacccttg acggtttgaa tggtttcgat  
ggcactgata cacattactt ccacgggtgg ccacggggcc atcattggat  
gtgggattct cgtctattca actatgggag ttgggaagta tgtagctctg  
acttctgtca ccataatttg ctaactgttc ctgtaatct gttcttacac  
atggtgatata tctattctta tgcaggattt gagattctta ctgtcaaacg  
cgagatgggt gcttgaagaa tataagtttg atggatttcc atttgatggg  
gtgacctcca tgatgtatac tcaccatgga ttacaagtaa gtcatcaagt  
ggtttcagta acttttttag ggcactgaaa caattgctat gcatcataac  
atgtatcatg atcaggactt gtgctacgga gtcttagata gttccctagt  
atgcttgtac aattttacct gatgagatca tgggaagatg gaagtgatta  
ttatttattt tctttctaag tttgtttctt gttctagatg acatttactg  
ggaactatgg cgaatatttt ggatttgcta ctgatgttga tgcggtagtt  
tacttgatgc tgggtcaacga tctaatctat ggactttatc ctgatgctgt  
atccattgggt gaagatgtaa gtgcttacag tatttatgat ttttaactag  
ttaagtagtt ttattttggg gatcagctctg ttacactttt tgttaggggt  
aaaatctctc tttcataaac aatgctaatt tataccttgt atgataatgc  
atcacttang taatttgaag agtgcaaggg cattcaagct tacgagcata  
ttttttgatg gctgtaattt atttgatagt atgcttgttt gggtttttca  
ataagtggga gtgtgtgact aatgttgtat tatttattta attgcggaag  
aaatgggcaa ccttgtcaat tgcttcagaa ggctaacttt gattccataa  
acgctttgga aatgagaggc tattcccaag gacatgaatt atacttcagt  
gtgttctgta catgtatttg taatagtggt ttaacttaaa ttctgcact  
gctatggaat ctactgtat gttgtnagt tacaacatca caaacaagta  
atcctgagct ttcaactcat gagaaaatan gangtccgct tctgccagca  
ttaactgttc acagttctaa tttgtgtaac tgtgaaatg ttcaggtcag  
tggaatgcct acattttgca tccctgttcc agatgggtgg tttggttttg  
actaccgcct gcatatggct gtgacagata aatggattga actcctcaag  
taagtcagc aatattgggt attacatgcg cacaatgac tagattacat  
tttctaagt gtaaaaagga aaatatgtat gtgaatatct agacatttgc  
ctgttatcag ctggaatagc agaagtcaaa tacatgattt aaatagcaaa  
tctcggaaat gtaattggct gtgtctttat gctgggcagt gtacattgcg  
ctgtagcagg ccagtcacaa cagtttagca tattttcaga aacaatatta  
tttatatccg tataatganga aagttagat ataaactgtg gtcattaatt  
gtgttcacct tttgtcctgt ttaaggatgg gcagtaggta ataaatttag  
ccagataaaa taaatcgta ttaggtttac aaaaggaata tacagggtca  
tgtagcatat ctagtgtgaa ttaatgaaaa ggctgacaaa aggctcggta  
aaaaaaactt tatgatgac cagatagata tgcaggaacg cgactaaagc  
tcaaatactt attgctacta cacagctgcc aatctgtcat gatctgtgtt  
ctgctttgtg ctatttagat ttaaacta actcgatata ttggcaataa  
taaacttaac tattcaacca atttgggtga taccaganat ttctgcctc  
ttgttagtaa tgatgtgctc cctgctgctg ttctctgctg ttacaagaagc  
tgttttcagt tttttgcac attatttttg tgtgtgagta gtttaagcat  
gttttttgaa gctgtgagct gttggtactt aatacattct tggaggtgct  
caaatatgct gcagtgtaat tttagcatttc tttaacacag gcaaaagtgc  
gaatcttga aaatgggca tattgtgca accctaaca atagaaggtg  
gcttgagaag tgtgtaactt atgcagaaaag tcatgatcaa gcactagttg  
gtgacaagac tattgcattc tggttgatgg ataaggact agctgttact  
tttgacaaa agaattactc cctcccgctc ctaaatataa gtctttgtag  
agattccact atggaccaca tagtatatag atgcatttta gagttagat  
tcaactcatt tgcttcgtat gtatccata gtgaaatctc tacagagact  
tatatttagg aacggagga gtacataatt gatttctc atcagattgc  
tagtgttttc ttgtgataaa gattggctgc ctaccatc accagctatt  
tcccaactgt tacttgagca gaatttctg aaaacgtacc atgtgtact

FIGURA 1

gtggcggcct gtgaactttg acagttatgt tgcaatttcc tgttcttatt  
 tatttgattg cttatgttac cgttcatttg ctcatcctt tccgagacca  
 gccaaagtca cgtgttagct gtgtgatctg ttatctgaat cttgagcaaa  
 ttttattaat aggctaaaat ccaacgaatt atttgcttga atttaaatat  
 acagacgfat agtcacctgg ctctttctta gatgattacc atagtgcctg  
 aaggctgaaa tagttttggg gtttcttggg tgccgcctaa aggagtgatt  
 tttattggat agattcctgg ccgagctctc gttacaacat aacattttgg  
 agatattgctt agtaacagct ctgggaagtt tggtcacaag tctgcatcta  
 cacgctcctt gaggttttat tatggcgcca tctttgtaac tagtggcacc  
 tghtaaggaaa cacattcaaa aggaaacggt cacatcattc taatcaggac  
 caccatacta agagcaagat tctgttccaa ttttatgagt ttttgggact  
 ccaaagggaa caaaagtgtc tcatattgtg cttataacta cagttgtttt  
 tataaccagt tagttttatt ccaggacagt tgatacttgg tactgtgctg  
 taaattatth atccgacata gaacagcatg aacatatcaa gctctctttg  
 tgcaggatata gtatgatttc atggctctgg ataggcttca actcttcgca  
 ttgatcgtgg catagcatta cataaaatga tcaggcttgt caccatgggt  
 ttagggtggg aaggctatct taacttcatg ggaaatgagt ttgggcatcc  
 tggctcagctt ttacaacatt attgcattct gcatgattgt gatttactgt  
 aatttgaacc atgcttttct ttcacattgt atgtattatg taatctggtg  
 cttccaagga ggaagttaac ttctatttac ttggcagaat ggatagattt  
 tccaagaggc ccaaaaactc ttccaaccgg caaagtctc ccttggaaat  
 aacaatagtt atgataaatg ccgccgtaga ttgatcttg taagttttag  
 ctgtgctatt acattcctc actagatctt tattggccat ttatttcttg  
 atgaaatcat aatgtttgtt aggaaagatc aacattgctt ttgtagttht  
 gttagacgtta acataagtat gtgttgagag ttgttgatca ttaaaaatat  
 catgattttt tgcagggaga tgcagatttt cttagatata gtggatgca  
 agagtctgat caggcaatgc agcatcttga ggaaaaatat ggggtatgtc  
 actggtttgt ctttgttcca taacaagtca cagtttaccg tcagtctctt  
 caagtggtaa aaaaagtgta gaattaattc ctgtaatgag atgaaaactg  
 tgcaaaggcg gagctggaat tgcttttcc caaaactatt ttcttaagtg  
 cttgtgtatt gatacatata ccagcactga caatgtaact gcagtttatg  
 acatctgagc accagtatgt ttcacggaaa catgaggaa ataaagtgat  
 catcctcnaa aagaggagat ttggatattg ttttcaact ccaactggagc  
 aatagctttt ttgactaccg tgttgggtgt tccaagctg ggaagtaca  
 ggtatgcttg ccttttcaat gtccaccctt caccagtagg gttagtggg  
 gcttctacaa cttttaattc cacatggata gagtttgtg gtcgtgcagc  
 tatcaatata aagaataggg taatttgtaa agaaaagaat ttgctcgagc  
 tgtttagacc ataggaagg tgttctaac agccccgaag cacataccat  
 tcattcataat tatctactta agtgtttgtt tcaatcttca tgctcagttg  
 gactcggctc aatactagaa ctattttccg aatctaccct aaccatccta  
 gcagttttag agcagcccca tttggacaat tggctgggtt tttgttagtt  
 gtgacagttt ctgctatttc ttaatcaggt ggcttggac tctgacgatg  
 cactctttgg tggattcagc aggcctgatc atgatgtcga ctacttcaca  
 accgtaagtc tgggctcaag cgtcacttga ctctgttga ctcaactgct  
 tacaatctg aatcaacttc ccaattgtct atgcccctgc aggaacatcc  
 gcatgacaac aggcgcgct ctttctcggg gtacactcc agcagaactg  
 cggctgtgta tgccttaca gagtaagaac cagcagcggc ttgttacaag  
 gcaaagagag aactccagag agctcgtgga tctgtgagca agcgacggg  
 aacggcgca ggctgctcca agcccatga ctgggagggg atcgtgcctc  
 tccccagat gccaggagga gcagatggat aggtagcttg ttggtgagcg  
 ctcgaaagaa aatggacggg cctgggtgtt tgttgtgctg cactgaacct  
 tctcctatc ttgcacattc ccggttgtt ttgtacatat aactaataat  
 tgcccgtagc ctcaacgtga aaatcc

11451

FIGURA 1



```

aagctttgta gccttgcaag ggctcccaaa caaactgcct cactcgattg tcaaaaaagt
aaaaatgatt gtagaaaaaa aaactgactc actcgtcact acctaccgt cctacatgac
acctggccgc aagacgacgc cgtcctcctg ccgcgcgcgt ccgcgatcac accaccgcaa
aaaccaaaac ctcttcgccg gtgctccca cgtaccatc catgcagccg tccgccgcgc
cgccggttgc ccgcaccacc cgctggcggc caccacgcgc cactctcgc tccgaaggctc
cgctccgctc ctccctagttc cactctctct ccgtgctagc agtatatagc atccgccctc
cgccccctcc caatccttaga acaccctccc ctttgccctc tcatttcgct cgcggtgggtt
taagcaggag acgagggcggg gtcagtggg cagttaggtt ggatccgatc cggctgcggc
ggcggcgacg ggatggctgc gccggcattc gcagtttccg cggcggggct ggccccgcgc
tcggctcctc gatccggcgg ggcagagcgg aggggggcgc ggggtggagct gcagtcgcca
tcgctgctct tcggccgcaa caagggcacc cgttcacccc gtaattatctt gcgccacctt
tctcactcac attctctcgt gtattctgct gtgctcggcc tcgcccgcgc acgcggtgcgc
attccgctgc ggtctgcggt gttcagcgat cttacgtcgg ttccctcctg gtgtgggtgat
gtctgtaggt gccgtcggcg tcggagggtc tggatggcgc gtggtcatgc gcgcgggggg
gccgtccggg gaggtgatga tccctgacgg cggtagtgcc ggaacaccgc cttccatcga
cgggtcccgt cagttcgatt ctgatgatct gaaggtagtt tttttttg ctcgatctga
aggctcttga catatactac tgtattacc tgagtaaaata ctgccacct gtgtgtgat
ttcgctttaa atacctgttt acttgctacg gttttcactt tcattgagac gtcggacgaa
attcactgaa ttctataat ttggtagaca ccgaaatata tactactcct tccgtcccat
aatataagag cgtttttggc acctatatt atagggcgga gggagtacct ttttagtcaa
aatattgtgg tagtttcaa tgtatacaag aattcaata ttttttttaa aaaaaataca
actaatgggt tgagttcaa gtgaagcgtt ttggtccttt ggctgagatg taaaccgaaa
tcactgaaat tcatagtagc cgaacttta atagaactga aactcaaaat ctgctatccg
gcgaaattct aaagatttgc ttatttcaca cgtaggttgc agtacaccct ctttctaatt
tattggggaa ggggtattat tatcttgtaa gtacctgcct gcatgacaat tgaatctaa
gacaaaacac catatgcgag ccctacacac ggtaggttgg tttacaacta tggtgcccac
agttcgtctg aactttttgt ccttcacatc gtgttaggtt ccattcattg atgatgaaac
aagcctacag gatggaggty aagatagtat ttggtcctca gagacaaatc aggttagtga
agaaattgat gctgaagaca cgagcagaat ggacaaagaa tcactctacga gggagaaatt
acgcatctcg ccaccaccgg gaaatggaca gcaaatatac gagattgacc caaccgcgc
agactttaag taccatcttg agtatcggta tgcttcgctt ctattgtgtg cactttaaaa
acaatttaca gtctttgata agatgtgaat ggctgcttgc tgtgacacga aactcctgaa
ggtcgtagtc actcttggtg gttcatgggt ctgaggtaac atggtaaccg aacaaaaata
gtgaaagtggc aagcactgca atgtgagcta ctgataacca cccatgtgaa ttgggtacac
tgattaatat atatgtcttc atgggctcta ttttttttca atatctatgc caattgaaca
acaatgcttt gtggacgggt gttcttttac cctctctctc tatcaataga tgatatgcat
actcatgcgt atcctacaaa aaattgaaca acaatgccac tttccccgtt gttgctttt
taaggatgaa acacatatgt ccagatcaaa ctatactagc agtctaactg ttccttaatg
gatcaaaaac agatatagcc tatacaggag aatacgttca gacattgatg aacacgaagg
agggatggat gtattttccc gcggttacga gaagtttggg tttatgcgca ggtgaaattt
cttgactaaa taactatgta tctacctttt ctttgtactc tateaacatt cctcttccc
tgcaagcgtg aaggtatcac ttaccgagaa tgggctcctg gagcagatgt acgttctctc
aaccatctga tcgtttacct gactatacta atctatctt tcaactaatt gtgataaatt
actgctcatc agctatccta aggttgggga ttttgcaact cccagatgaa cagcataatta
agtcgcacaa ctagcattat taagaactaa ctccctgctc caattgcagt ctgcagcatt
agttggcgac ttcaacaatt gggatccaaa tgcagaccat atgagcaagg tatgcatgta
gtttcacaaa tatatcatab tttctttgta gatttttttt tttagatcgg cttatctatt
acgttgagct gtaaatatag ttggaaggtt ttaggagtat taaatcact ggactctatt
ctttcacttg cctgttgcac gagccatta ctagatatca atgttgatga tgcttttgtt
gtatgaggtc gaagtgaac atgcatgta cctttttata taagtaagg tgcacatgta
ttttttatga tctaaacatt atttactgat tttgttcttg caagacacta agcagtttta
cataataatg gcgttggagc aggccgactg cacatctgaa ctgtagctcc atgtggttga
tatagattac aaatgctcat attcaatgta actgttttca gaatgacctt ggtgttggg
agatttttct gccaaacat gcagatgggt cgcaccaat tcctcacggc tcacgggtga
aggttgtttt cttctccttg ccaacgggtg taggctcagg aacatgtcct gtattactca
gaagctcttt tgaacatcta ggtgagaatg gatactccat ctgggataaa ggattcaatt
cctgcttggg tcaagtactc cgtgcagact ccaggagata taccatacaa tggaaatbat
tatgatcctc ccgaagaggt atttacttc atcttctgtg cttttagatt tcagatattt
ttattagaag aaaattatga tttttccct caccgaacct ccaattgct atttcaagct
gtcctactta tttgctgctg gcatcttatt tttctattct ctaaccagtt atgaaatcc
ttacatgcat atgcaggaga agtatgtatt caagcatcct caacctaac gaccaaaac
attgcggata tatgaaacac atgttggcat gagtagcccg gtatttcac tttaccatgt
attcataaaa tgaagttagc tatatgcagt tcaaatttat ttacaatggt
atthttgtgt tgggtccctt ctttcgtttt ataagtaaaa aacttatcat aaatattatt

```

FIGURA 2

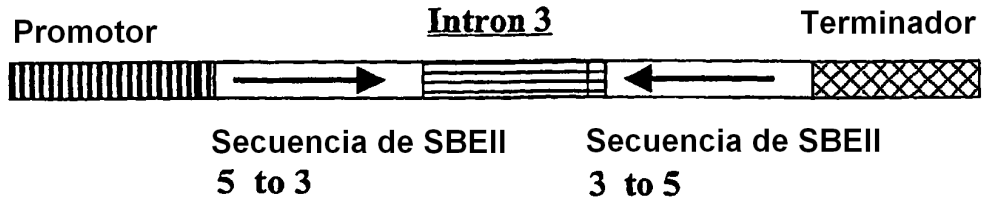
```

gttatgccgc ttggtaata caatctgaaa aatgtaactg tggacaatct agaactagat
aatacaaatc tgaaaaaaca tgctggaata gtgtcatttc agtcaactag gatgttttga
atgctcaaga gaagtactag tgtgtagcat caaaagctgg tgtccatttg ttcaaatggt
taattaacac tatagtgaaa acaagtaatt gcacaaagaa acaagtaatt gcccaagttc
atatgttttt tcactatatt acatgtttca tcaacaatth aattaacctc attccttaca
aacatthtga tttacatthg ttcctacata tatagttatt ttatatatca actttataaa
tcatgactgt tataattaaa accgatggta tatcaacgat tgagataatt tggcatatgt
ggatgaatth tgtggcttgt tatgctcttg ttttaataac ataataaata gattatgctt
gttggtagcc tttttacatt aacacatggg caattacttg tttctttgtg caaccaggaa
ccaaagatcg acacatatgc aaacttcagg gatgaggtgc ttccaagaat taaaagactt
ggatacaatg cagtgc aaaat aatggcaatc caagagcact catactatgg aagctttggg
tagttctctg ggtcgatttc tggttctttt agttatcttt tgtccataga acatatttca
acttttagcaa ctatactatt atattaactt ttcagctatt tctctncttt ttcttatgtg
agagactgct gcntccttgc acttcctgtg ttctcattca gagtanacat cttatgana
gacaactcta tgtngacatt ccggaagtat nactggctg attcgggtcta aaataacata
ctgctcagat agccacataa cagtacgatt acacacataa tgaccatggt tgcataagat
ggcggtagat tgttctcacc catactagca taatgacttg ttatataaga gtatatcata
ttaacttctt ttccaatgac atggaagctg taacaacttt caaatcattt ttgtctttta
agtgtgctt ttttcctggt tgacaattaa tacaatacca cttttatgtg tttttacttc
tattgcaggt accatgttac caatttcttt gcaccaagta gccgttttgg gtccccagaa
gatttaaaat ctttgattga tagagctcac gagcttggct tggttgtcct catggatggt
gttcacaggt acttaatgta atttgaggtt ggcgtgttaa gttcacatta atcttaattc
tttatttcaa ttcctatggc ctctctccta gattggaaca gtaaaagcat catccagttt
gtataaattg ctaaaagaac attttacatg ttaagtattt tcaattacta tgaacatat
aaatttacet acttattgat tttacgacag aagtaccgat ctcaacagat gaacaattgg
ttgatcacat atcatttcat actacaatac aagaaaatga atagagaacg agttaatatt
agccttggta aaatcagcaa cttgtttgga aataaagtat agtgatgcca gtgcaanaa
caaggcatca agttggttc agctcccacg gtccgtgcta gctgtcaagg gtaatttgca
cgtagtcgca catagatttg tgtgggagtg gaaagtaacc acagattgtc cgaggaacac
gggacacacg tcttagccac aggttgggc tcccctgat gccggtagta gctttactcc
ttatatgaaa ttatctcaag atagatttca atttggggtt acacttanga actcancaag
ttaaggatca actcctgag ttctatacga ctgatctttg accgagatat cttgatcagg
ctaagtanca aaatccaggc cttgagatgt tgaacatgct cttcattttg ggctgggtgc
ccttgggcat aaggtgtngt ccttccttca tgtgcttctt gcagcgtatg acataaacnt
cctctgagtt ggatanatgca cggttccctt tgaggaaatc aggggtagtc gcatctnggg
aaagtgggtc acccangcat ggatcctcng cgcacaccgg gcaaacacgg tgaaaccact
tctcctcgac actagctaac ttgacattca agcaaacata gaatataact ttatntctaa
atgaaccgga caccctcctt gtgcctgcac ctacagagta caatgccagt tttggactga
actcttgtgt tcatgtatgt gctaatnaca taggttctaa ccatgattct aaatagcgg
ttataactcc actatagtaa tgctatagcg tttanaagat cccgactaa gggaccttag
tccaaataca tgatcaaaaa tttacatag cgcgctatag ctatttaaaa ctatgggtcac
ccgtaagag gcataactcg ctatttaaaa ctatgggtct aacttttaat ctattttatg
tcttgggtca aagccctttt ttgtctata gctttacttt tgggttgaga tcacccttaa
cccattggta atcctggttg atttactcca tctttcttg cgtagcttta cttttgggtt
tttgtttctc acagtcacgc gtcaataat accttggacg

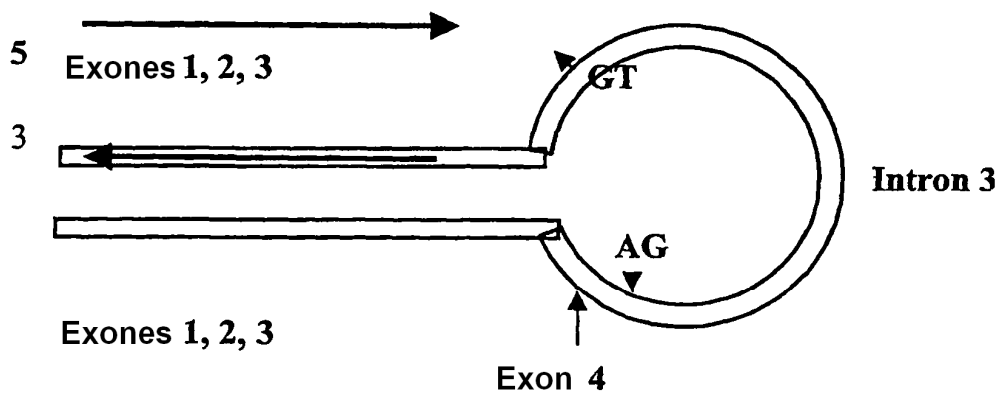
```

FIGURA 2

**A**



**B**



**FIGURA 3**

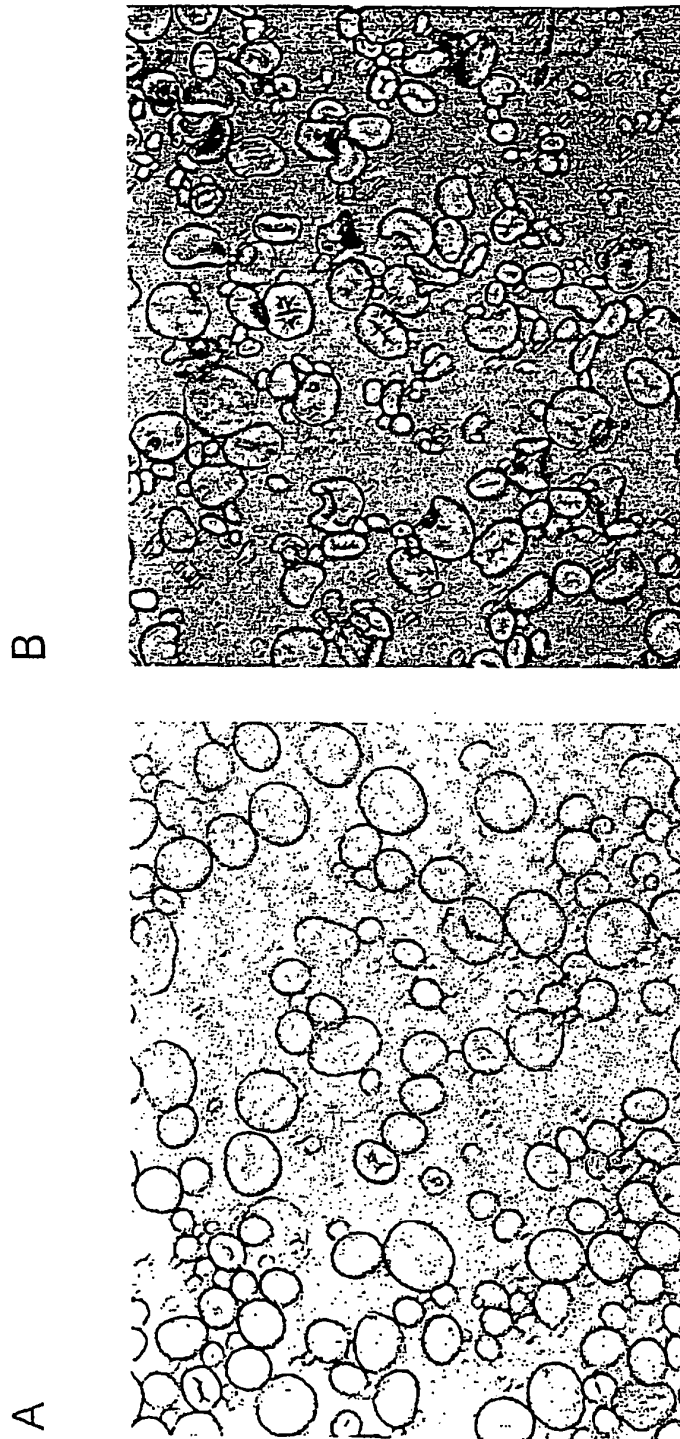


Figura 4

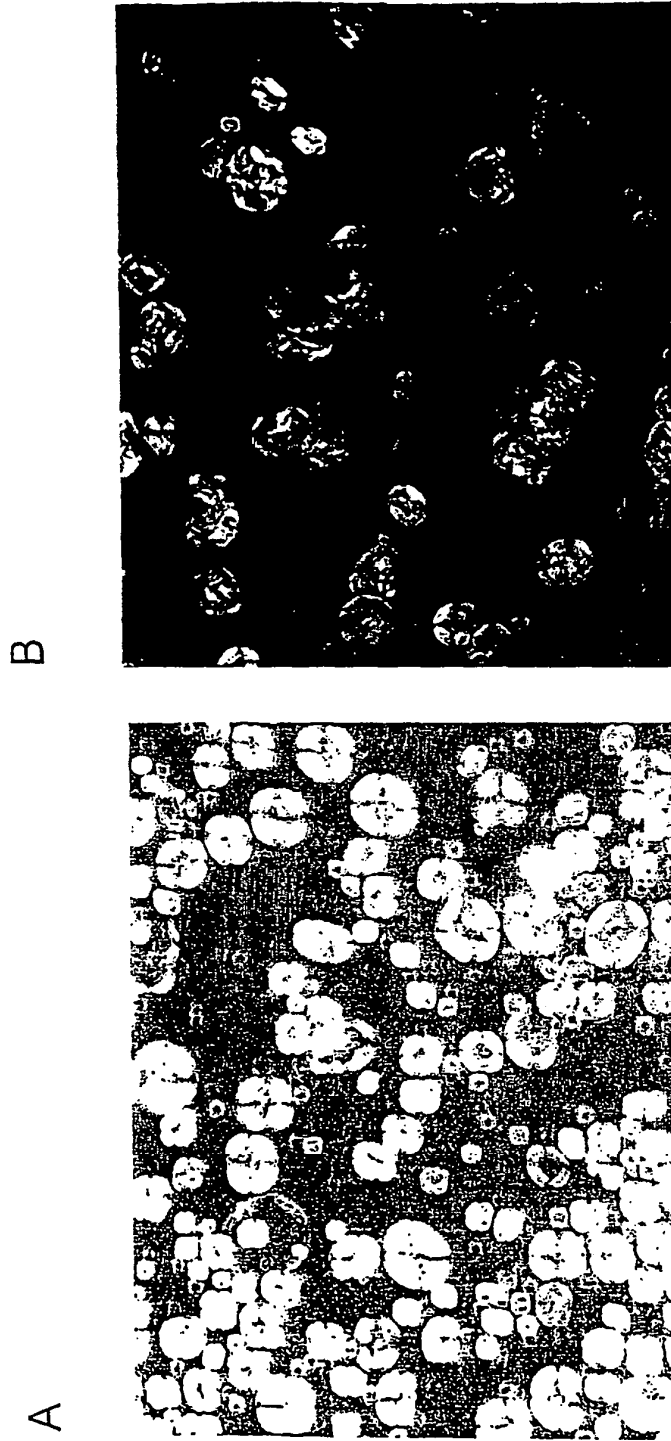


Figura 5

ES 2 369 774 T3

**y11282**  
 cgccagcttc ccccccgcc gcaacggtg ctecccttc tcatcgcttc tcaattaata 60  
 tctccatcac tcgggttccg cgctgcattt cggccggcgg gttgagtgag atctgggcca 120  
 ctgaccgact cactcgctcg ctgcgcgggg atggcgacgt tcgcggtgtc cggcgcgacc 180  
 ctcggtgtgg cgcggcccgc cggcgcggc ggcggactgc tgcccgatc cggctcggag 240  
 cggaggggcg ggggtggacct gccgtcgctg ctctcagga agaaggactc ctctcgcgcc 320  
 gtcttgagcc gcgcgccctc tccaggaag gtcctgggtc ctgacggtga gagcgacgac 380  
 ttggcaagtc cggcgcgaacc tgaagaatta cagatacctg 420

**sr997**  
 gccactgacc gactcaactc ctcgctgcgc ggggatggcg acgtttgcgg tgtccggcgc 60  
 gaccctcggg ttggcgccgc ccgccggcgc cggcggcggg ctgctgccgc gatccggctc 120  
 ggagcggagg ggcggggtgg acctgccctc gctgctctc aggaagaagg actcctctcg 180  
 cgccgtcctg agccgcgcgg cctctccagg gaaggctctg gtgcctgacg gtgagagcga 240  
 cgacttggca agtccggcgc aacctgaaga attacagat 419

**sr995**  
 ggcgggttga gtgagatctg ggcgactggc tgactcaatc actacgcggg gatggcgacg 60  
 ttcgcggtgt ccggcgccgc tctcgggtgt gcgcgggccg gcgtcggagt ggcgcgggcc 120  
 ggctcggagc ggagggggcg ggcggacttg ccgtcgctgc tcctcaggaa gaaggactcc 180  
 tctcgcgcgg tcttgagccg cgcggcctct ccaggggaagg tcctggtgcc tgacggcgag 240  
 agcgacgact tgcaagtccg gcgcaacctg aag 413

**sbe9**  
 acgttgctcc cccttctcat cgcttctcaa ttaatatctc catcaactcg tcccgctg 60  
 catttcggcc ggcgggttga gtgagatctg ggccactgac cgactcaactc gctcgtgctg 120  
 gggatggcga cgttcgcggg gtccggcgcg accctcgggtg tggcgcggcc gccggcggcg 180  
 gcgcaacctg aagaattaca gatacctg 408

Figura 6

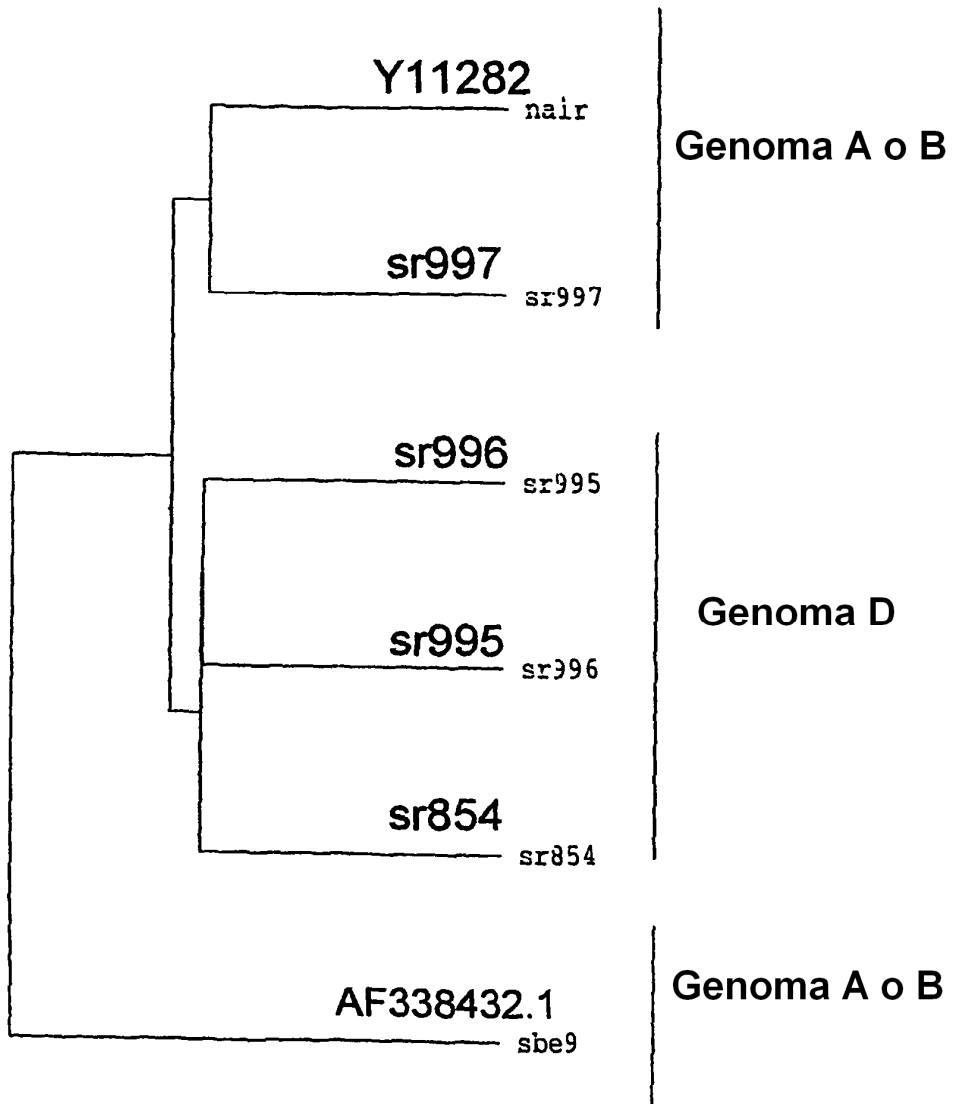


Figura 7

sr854

Met	Ala	Thr	Phe	Ala	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	Arg
1				5					10					15
Ala	Gly	Val	Gly	Val	Ala	Arg	Ala	Gly	Ser	Glu	Arg	Arg	Gly	Gly
				20					25					30
Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser	Arg
				35					40					45
Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Pro
				50					55					60
Asp	Gly	Glu	Ser	Asp	Asp	Leu	Ala	Ser	Pro	Ala	Gln	Pro	Glu	Glu
				65					70					75
Leu	Gln	Ile	Pro	Glu	Asp	Ile	Glu	Glu	Gln	Thr	Ala	Glu	Val	Asn
				80					85					90
Met	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Gln	Ser	Ser	Glu	Pro	Thr
				95					100					105
Gln	Gly	Ile	Val	Glu	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Val	Thr	Lys	Gly	Val
				110					115					120
Lys	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Glu	Lys	Pro	Arg	Val	Val	Pro	Lys	Pro
				125					130					135
Gly	Asp	Gly	Gln	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile	Asp	Pro	Thr	Leu	Lys	Asp
				140					145					150
Phe	Arg	Ser	His	Leu	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Glu	Tyr	Lys	Arg	Ile
				155					160					160
Arg	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	His	Glu	Gly	Gly	Leu	Glu	Ala	Phe	Ser
				165					170					175
Arg	Gly	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Ser	Ala	Glu	Gly	Ile
				180					185					190
Thr	Tyr	Arg	Glu	Trp	Ala	Pro	Gly	Ala	His	Ser	Ala	Ala	Leu	Val
				195					200					205
Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Trp	Asn	Pro	Asn	Ala	Asp	Thr	Met	Thr	Arg
				210					215					220
Asp	Asp	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Ile	Phe	Leu	Pro	Asn	Asn	Ala	Asp
				225					230					230
Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	Pro	His	Gly	Ser	Arg	Val	Lys	Ile	Arg	Met
				235					240					245
Asp	Thr	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	Ser	Ile	Ser	Ala	Trp	Ile	Lys
				250					255					260
Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr
				265					270					275
Tyr	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Lys	Tyr	Val	Phe	Gln	His	Pro	Gln	Arg
				280					285					290
Lys	Arg	Pro	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Tyr	Glu	Ser	His	Ile	Gly	Met
				295					300					305
Ser	Ser	Pro	Glu	Pro	Lys	Ile	Asn	Ser	Tyr	Ala	Asn	Phe	Arg	Asp
				310					315					320
Glu	Val	Leu	Pro	Arg	Ile	Lys	Arg	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ala	Val	Gln
				325					330					335
Ile	Met	Ala	Ile	Gln	Glu	His	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Phe	Gly	Tyr
				340					345					350
His	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	Phe	Gly	Thr	Pro
				355					360					365
Glu	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Asp	Arg	Ala	His	Glu	Leu	Gly	Leu
				370					375					380
Leu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Asn	Thr
				385					390					395
Leu	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	Phe	Asp	Gly	Thr	Asp	Thr	His	Tyr	Phe
				400					405					410
His	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	His	His	Trp	Met	Trp	Asp	Ser	Arg	Leu

FIGURA 8



				415					420					425
Phe	Asn	Tyr	Gly	Ser	Trp	Glu	Val	Leu	Arg	Phe	Leu	Leu	Ser	Asn
				430					435					440
Ala	Arg	Trp	Trp	Leu	Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Gly	Phe	Arg	Phe
				445					450					455
Asp	Gly	Val	Thr	Ser	Met	Met	Tyr	Thr	His	His	Gly	Leu	Gln	Met
				460					465					470
Thr	Phe	Thr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Gly	Phe	Ala	Thr	Asp
				475					480					485
Val	Asp	Ala	Val	Val	Tyr	Leu	Met	Leu	Val	Asn	Asp	Leu	Ile	His
				490					495					500
Gly	Leu	Tyr	Pro	Asp	Ala	Val	Ser	Ile	Gly	Glu	Asp	Val	Ser	Gly
				505					510					515
Met	Pro	Thr	Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Pro	Asp	Gly	Gly	Val	Gly	Phe
				520					525					530
Asp	Tyr	Arg	Leu	His	Met	Ala	Val	Ala	Asp	Lys	Trp	Ile	Glu	Leu
				535					540					545
Leu	Lys	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	Trp	Lys	Met	Gly	Asp	Ile	Val	His
				550					555					560
Thr	Leu	Thr	Asn	Arg	Arg	Trp	Leu	Glu	Lys	Cys	Val	Thr	Tyr	Ala
				565					570					575
Glu	Ser	His	Asp	Gln	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Ile	Ala	Phe
				580					585					590
Trp	Leu	Met	Asp	Lys	Asp	Met	Tyr	Asp	Phe	Met	Ala	Leu	Asp	Arg
				595					600					605
Pro	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Leu	His	Lys	Met
				610					615					620
Ile	Arg	Leu	Val	Thr	Met	Gly	Leu	Gly	Gly	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asn
				625					630					635
Phe	Met	Gly	Asn	Glu	Phe	Gly	His	Pro	Glu	Trp	Ile	Asp	Phe	Pro
				640					645					650
Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Pro	Thr	Gly	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Asn
				655					670					675
Asn	Asn	Ser	Tyr	Asp	Lys	Cys	Arg	Arg	Arg	Phe	Asp	Leu	Val	Asn
				680					685					690
Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Tyr	Arg	Gly	Met	Gln	Glu	Phe	Asp	Gln	Ala
				695					700					705
Met	Gln	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Gly	Phe	Met	Thr	Ser	Glu	His
				710					715					720
Gln	Tyr	Val	Ser	Arg	Lys	His	Glu	Glu	Asp	Lys	Val	Ile	Ile	Leu
				725					730					735
Lys	Arg	Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Val	Phe	Asn	Phe	His	Trp	Ser	Asn
				740					745					750
Ser	Phe	Phe	Asp	Tyr	Arg	Val	Gly	Cys	Ser	Lys	Pro	Gly	Lys	Tyr
				755					760					765
Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Asp	Asp	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Phe	Ser
				770					775					780
Arg	Leu	Asp	His	Asp	Val	Asp	Tyr	Phe	Thr	Thr	Glu	His	Pro	His
				785					790					795
Asp	Asn	Arg	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Val	Tyr	Thr	Pro	Ser	Arg	Thr
				800					805					810
Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Thr	Glu							
				815										

FIGURA 8

y11282

Met	Ala	Thr	Phe	Ala	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Ala	Arg
				5					10					15
Pro	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu
				20					25					30
Arg	Arg	Gly	Gly	Val	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys
				35					40					45
Asp	Ser	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys
				50					55					60
Val	Leu	Val	Pro	Asp	Gly	Glu	Ser	Asp	Asp	Leu	Ala	Ser	Pro	Ala
				65					70					75
Gln	Pro	Glu	Glu	Leu	Gln	Ile	Pro	Glu	Asp	Ile	Glu	Glu	Gln	Thr
				80					85					90
Ala	Glu	Val	Asn	Met	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser
				95					100					105
Ser	Glu	Pro	Thr	Gln	Gly	Ile	Val	Glu	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Val
				110					115					120
Thr	Lys	Gly	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Val	Gly	Glu	Lys	Pro	Arg	Val
				125					130					135
Val	Pro	Lys	Pro	Gly	Asp	Gly	Gln	Lys	Ile	Tyr	Glu	Ile	Asp	Pro
				140					145					150
Thr	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Ser	His	Leu	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Glu
				155					160					165
Tyr	Arg	Arg	Ile	Arg	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	His	Glu	Gly	Gly	Leu
				170					175					180
Glu	Ala	Phe	Ser	Arg	Gly	Tyr	Glu	Lys	Leu	Gly	Phe	Thr	Arg	Ser
				185					190					195
Ala	Glu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Trp	Ala	Pro	Gly	Ala	His	Ser
				200					205					210
Ala	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Trp	Asn	Pro	Asn	Ala	Asp
				215					220					225
Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Asp	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Ile	Phe	Leu	Pro
				230					235					240
Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Pro	His	Gly	Ser	Arg	Val
				245					250					255
Lys	Ile	Arg	Met	Asp	Thr	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	Ser	Ile	Ser
				260					265					270
Ala	Trp	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe
				275					280					285
Asn	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Val	Phe
				290					295					300
Gln	His	Pro	Gln	Pro	Lys	Arg	Pro	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Tyr	Glu
				305					310					315
Ser	His	Ile	Gly	Met	Ser	Ser	Pro	Glu	Pro	Lys	Ile	Asn	Ser	Tyr
				320					325					330
Ala	Asn	Phe	Arg	Asp	Glu	Val	Leu	Pro	Arg	Ile	Lys	Arg	Leu	Gly
				335					340					345
Tyr	Asn	Ala	Val	Gln	Ile	Met	Ala	Ile	Gln	Glu	His	Ser	Tyr	Tyr
				350					355					360
Ala	Ser	Phe	Gly	Tyr	His	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Ala	Pro	Ser	Ser
				365					370					375
Arg	Phe	Gly	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Asp	Arg	Ala
				380					385					390
His	Glu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Val	His	Ser	His
				395					400					405
Ser	Ser	Asn	Asn	Thr	Leu	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	Phe	Asp	Gly	Thr
				410					415					420

FIGURA 8

Asp	Thr	His	Tyr	Phe	His	Gly	Gly	Pro	Arg	Gly	His	His	Trp	Met
				425					430					435
Trp	Asp	Ser	Arg	Leu	Phe	Asn	Tyr	Gly	Ser	Trp	Glu	Val	Leu	Arg
				440					445					450
Phe	Leu	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	Trp	Trp	Leu	Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe
				455					460					465
Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp	Gly	Val	Thr	Ser	Met	Met	Tyr	Thr	His
				470					475					480
His	Gly	Leu	Gln	Met	Thr	Phe	Thr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Phe
				485					490					495
Gly	Phe	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Ala	Val	Val	Tyr	Leu	Met	Leu	Val
				500					505					510
Asn	Asp	Leu	Ile	His	Gly	Leu	His	Pro	Asp	Ala	Val	Ser	Ile	Gly
				515					520					525
Glu	Asp	Val	Ser	Gly	Met	Pro	Thr	Phe	Cys	Ile	Pro	Val	Pro	Asp
				530					535					540
Gly	Gly	Val	Gly	Leu	Asp	Tyr	Arg	Leu	His	Met	Ala	Val	Ala	Asp
				545					550					555
Lys	Trp	Ile	Glu	Leu	Leu	Lys	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	Trp	Lys	Met
				560					565					570
Gly	Asp	Ile	Val	His	Thr	Leu	Thr	Asn	Arg	Arg	Trp	Leu	Glu	Lys
				575					580					590
Cys	Val	Thr	Tyr	Ala	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Ala	Leu	Val	Gly	Asp
				595					600					605
Lys	Thr	Ile	Ala	Phe	Trp	Leu	Met	Asp	Lys	Asp	Met	Tyr	Asp	Phe
				610					615					620
Met	Ala	Leu	Asp	Arg	Pro	Ser	Thr	Pro	Arg	Ile	Asp	Arg	Gly	Ile
				625					630					635
Ala	Leu	His	Lys	Met	Ile	Arg	Leu	Val	Thr	Met	Gly	Leu	Gly	Gly
				640					645					650
Glu	Gly	Tyr	Leu	Asn	Phe	Met	Gly	Asn	Glu	Phe	Gly	His	Pro	Glu
				655					660					665
Trp	Ile	Asp	Phe	Pro	Arg	Gly	Pro	Gln	Thr	Leu	Pro	Thr	Gly	Lys
				670					680					685
Val	Leu	Pro	Gly	Asn	Asn	Asn	Ser	Tyr	Asp	Lys	Cys	Arg	Arg	Arg
				690					695					700
Phe	Asp	Leu	Gly	Asp	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Tyr	His	Gly	Met	Gln
				705					710					715
Glu	Phe	Asp	Gln	Ala	Met	Gln	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Gly	Phe
				720					725					730
Met	Thr	Ser	Glu	His	Gln	Tyr	Val	Ser	Arg	Lys	His	Glu	Glu	Asp
				735					740					745
Lys	Val	Ile	Ile	Phe	Glu	Arg	Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Val	Phe	Asn
				750					755					760
Phe	His	Trp	Ser	Asn	Ser	Phe	Phe	Asp	Tyr	Arg	Val	Gly	Cys	Ser
				765					770					775
Arg	Pro	Gly	Lys	Tyr	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Asp	Asp	Ala	Leu
				780					785					790
Phe	Gly	Gly	Phe	Ser	Arg	Leu	Asp	His	Asp	Val	Asp	Tyr	Phe	Thr
				795					800					805
Thr	Glu	His	Pro	His	Asp	Asn	Arg	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Val	Tyr
				810					815					820
Thr	Pro	Ser	Arg	Thr	Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Thr	Glu		
				825					830					

FIGURA 8

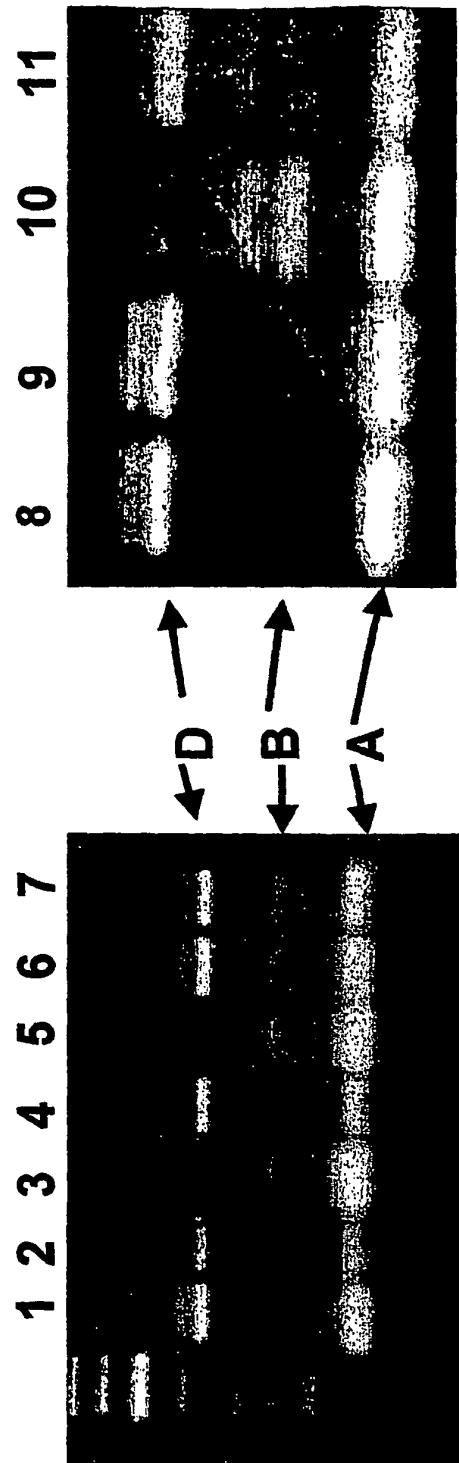


Figura 9

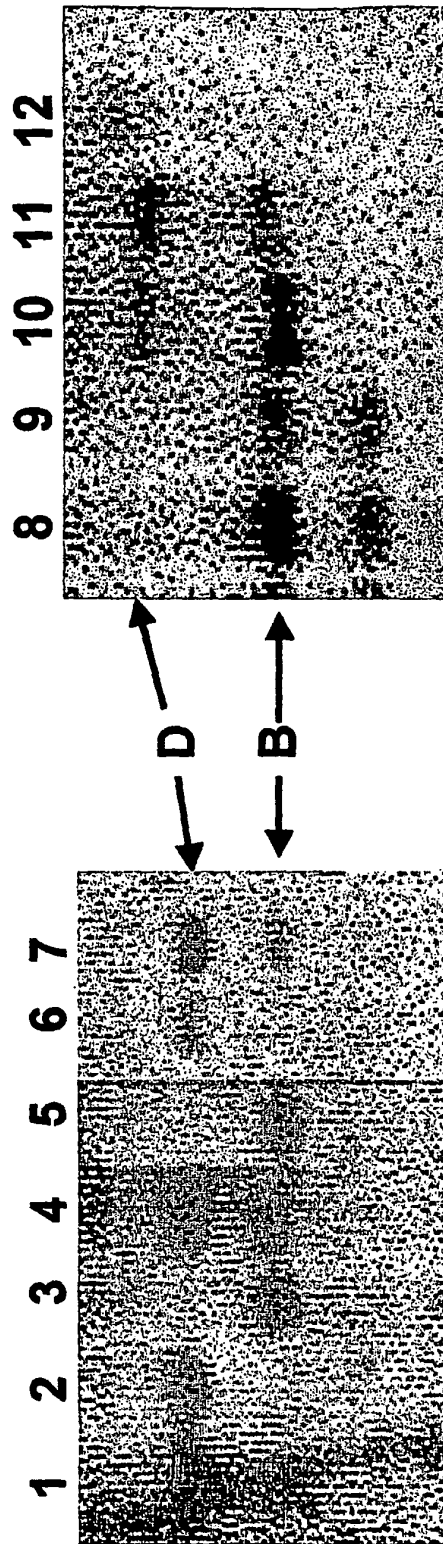


Figure 10

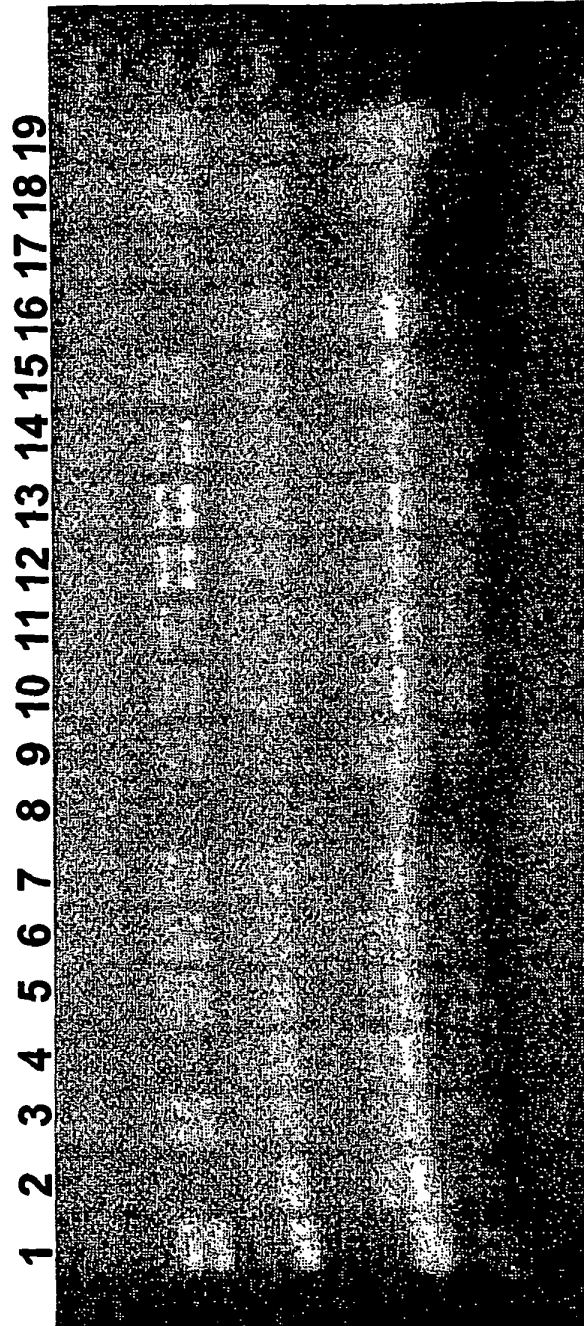


Figura 11

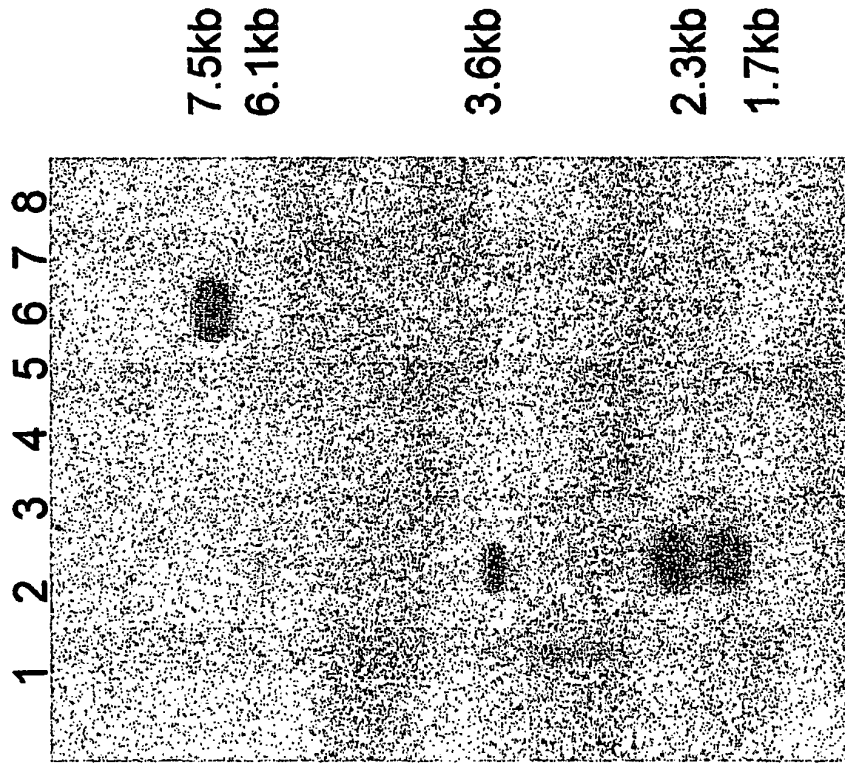
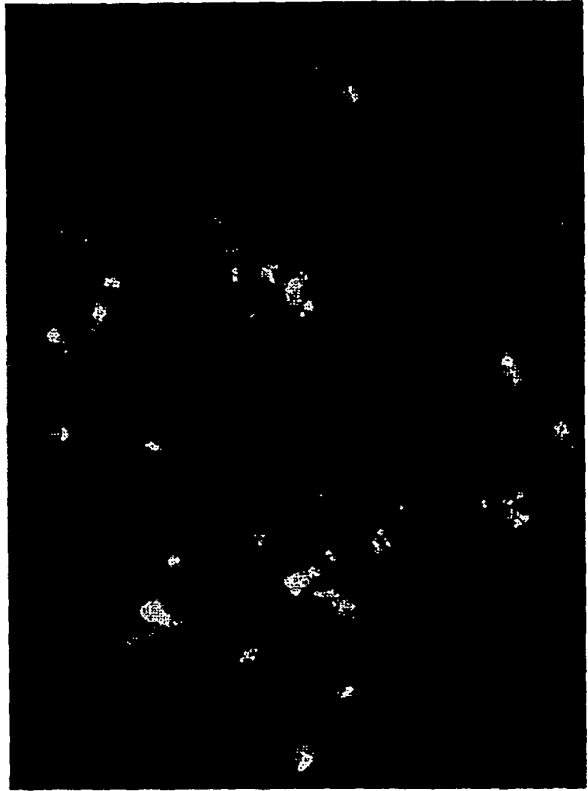


Figura 12



A



B

Figura 13



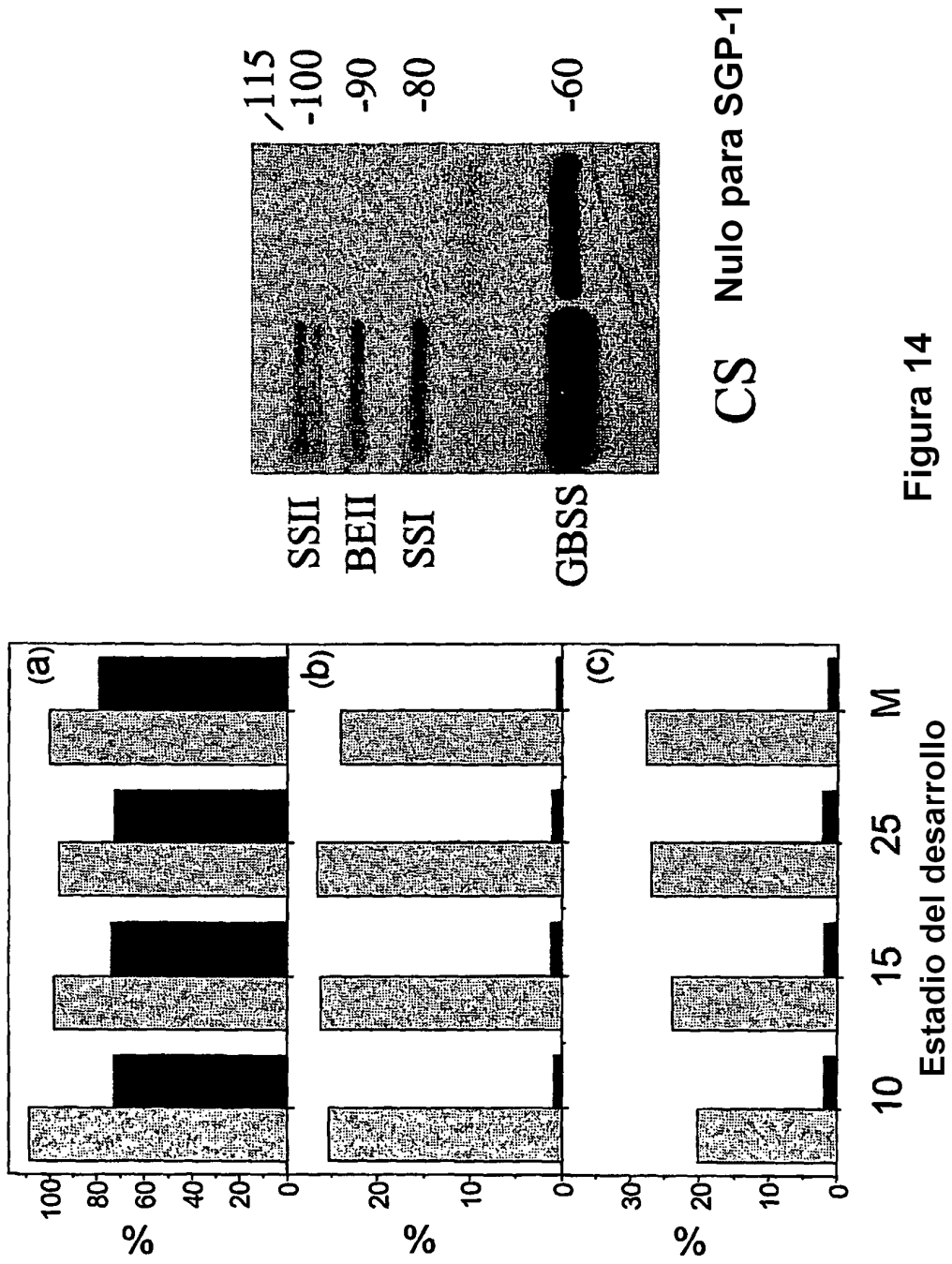


Figura 14

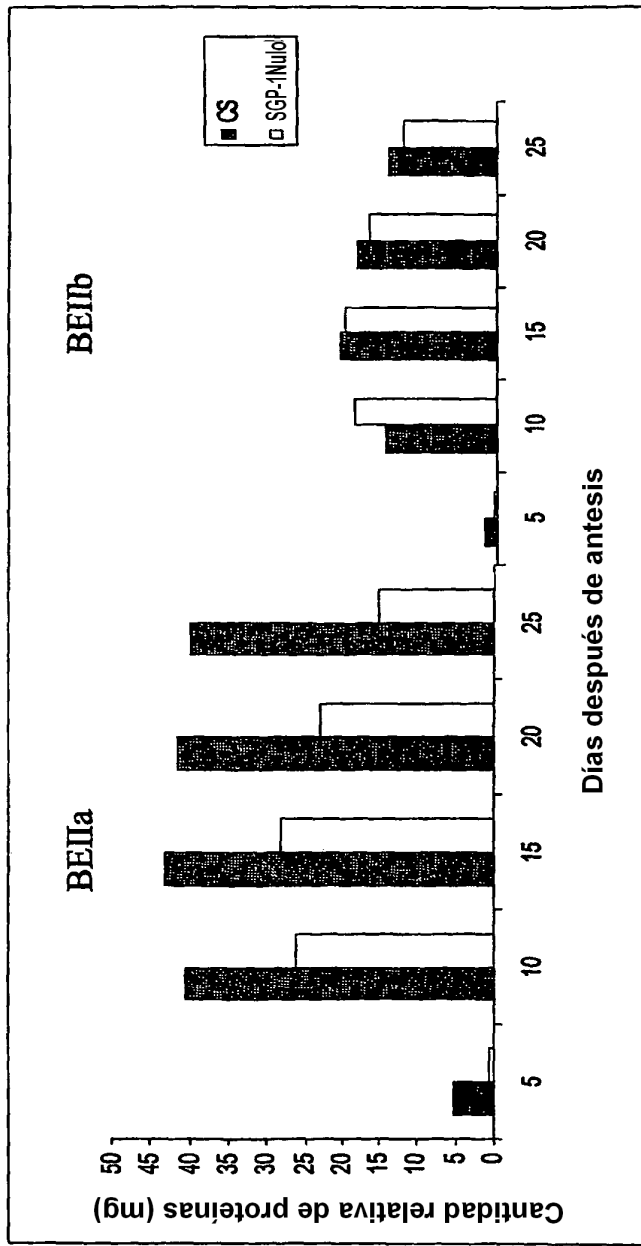
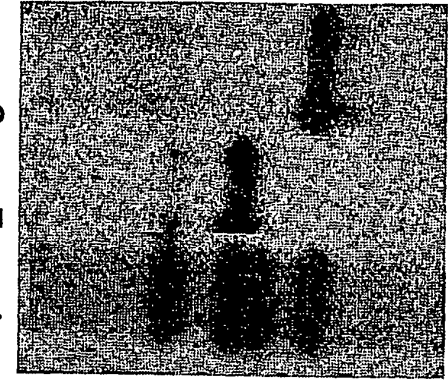
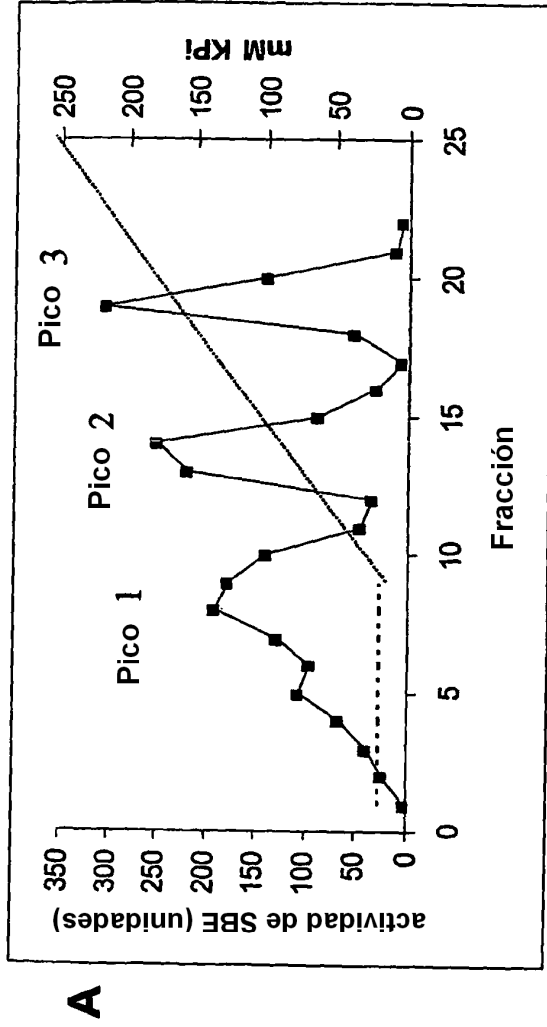


Figura 15



1 2 3

**C**  
A  
Di  
Dii  
B



Figura 16

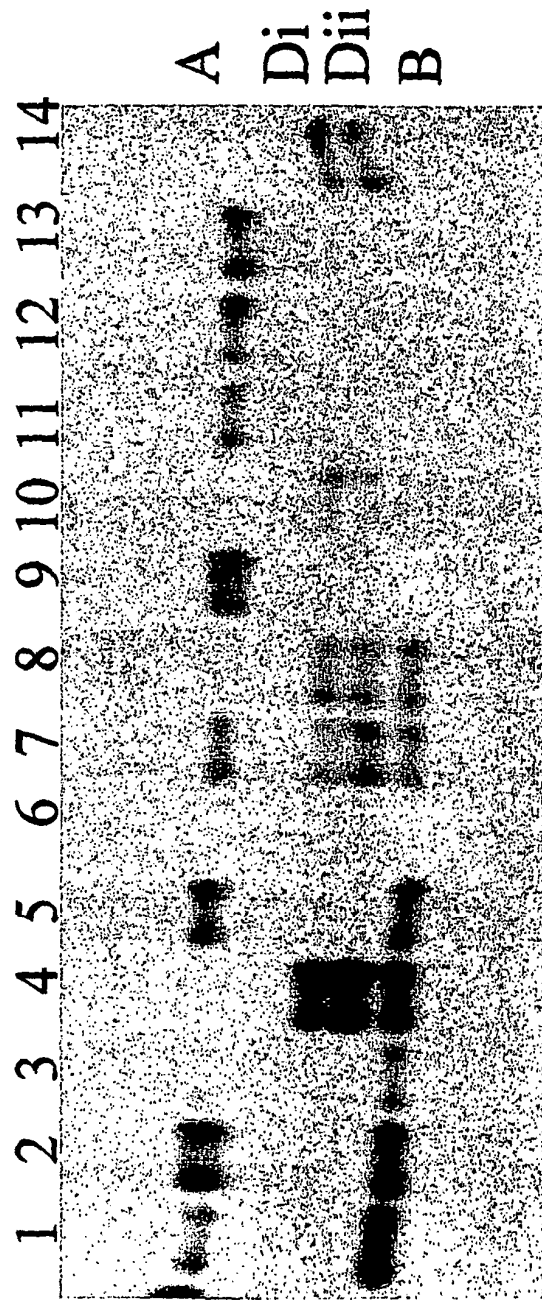


Figura 17

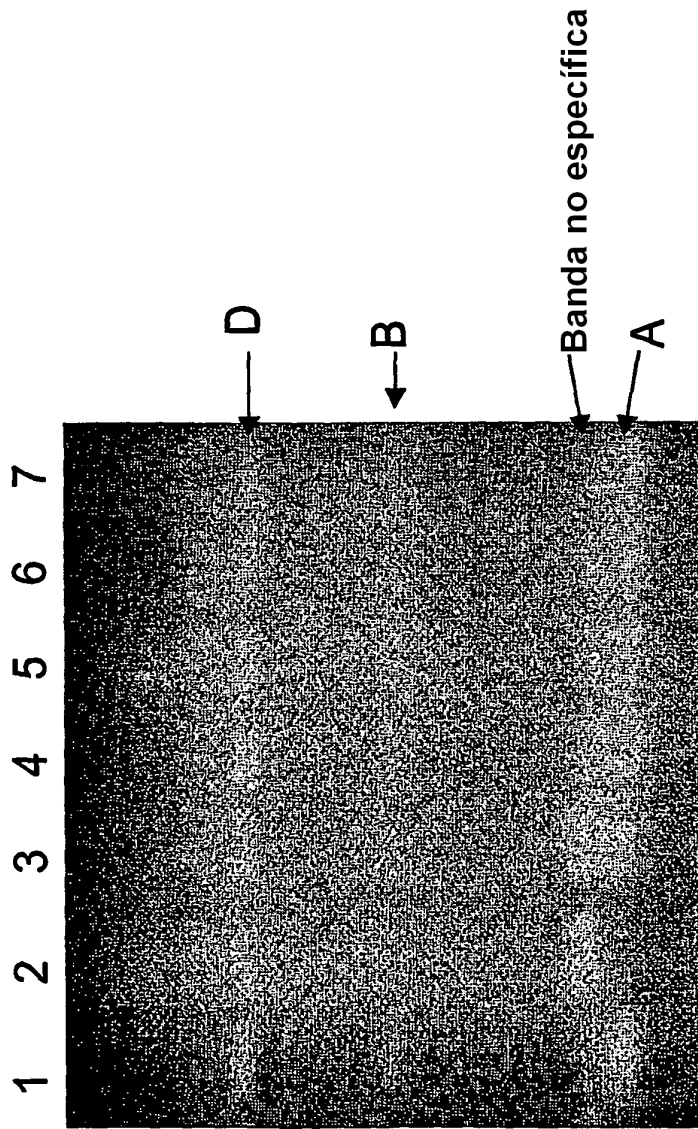
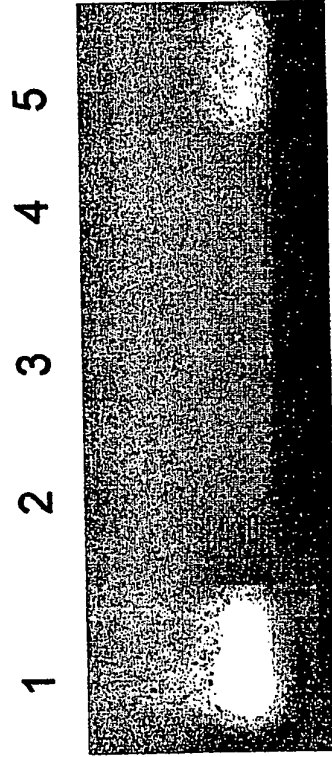


Figura 18



**Figura 19**

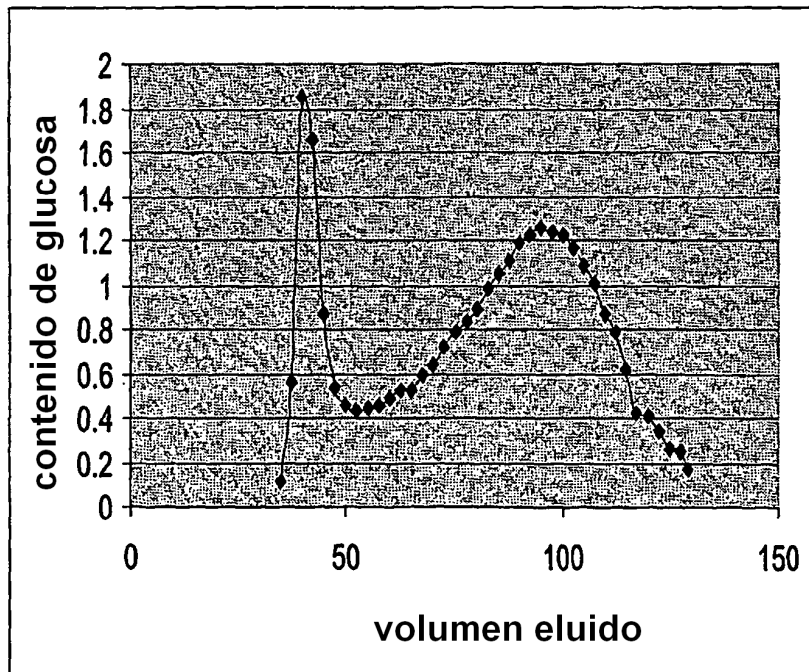
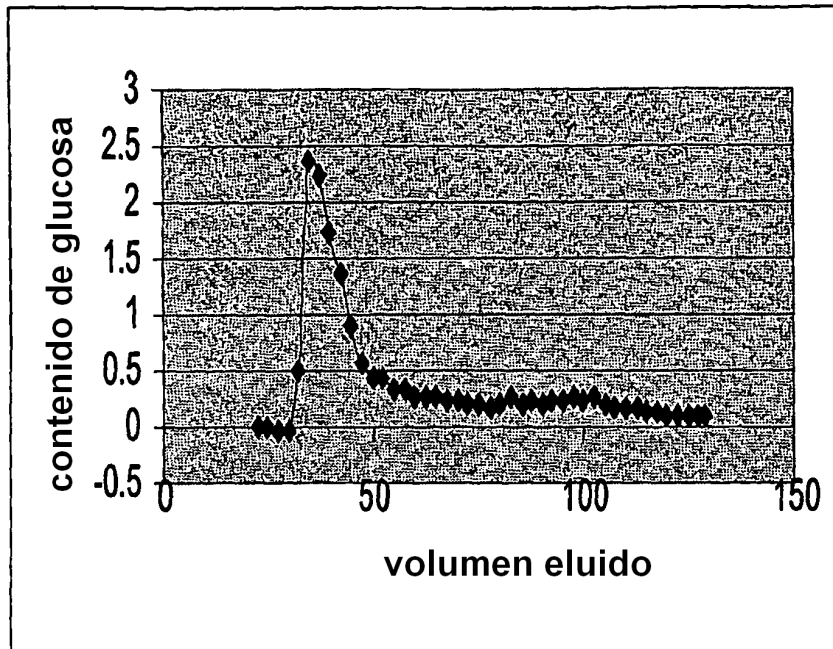
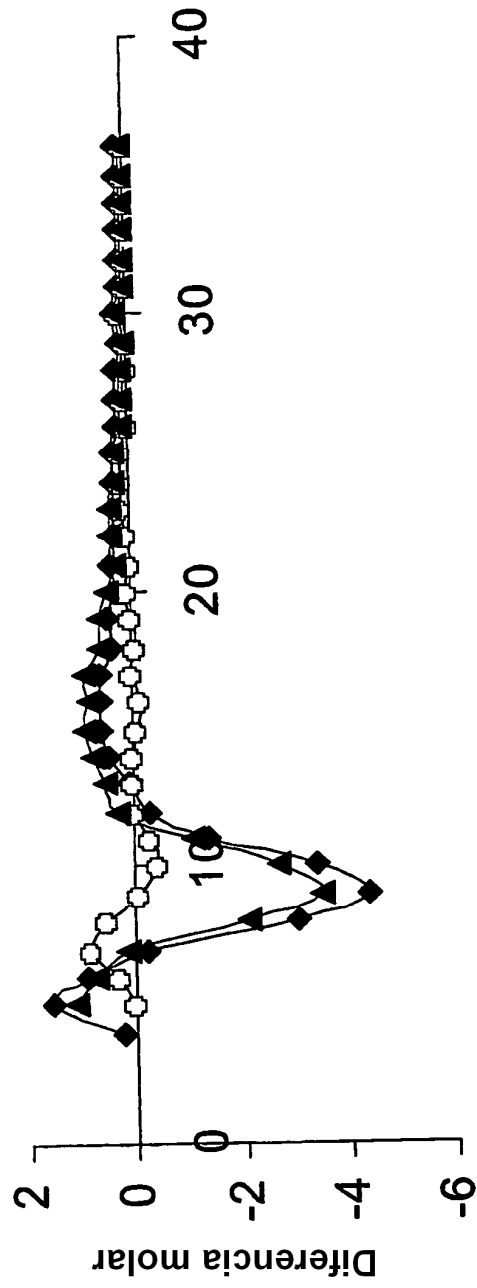


Figura 20



Grado de polimerización

Figura 21