

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 034**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99940330 .6**  
96 Fecha de presentación: **13.08.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1105468**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

54 Título: **UNA NUEVA SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO DIRIGIDA A PLASTOS, UNA NUEVA SUCUENCIA BETA-AMILASA, UN PROMOTOR SENSIBLE A ESTÍMULOS Y USOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:  
**19.08.1998 GB 9817959**  
**19.08.1998 GB 9817963**  
**05.06.1999 GB 9913014**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.02.2012**

73 Titular/es:  
**ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE) LTD.**  
**GLOBE HOUSE 1 WATER STREET**  
**LONDON WC2R 3LA, GB**

72 Inventor/es:  
**KAVANAGH, Thomas Anthony y**  
**LAO, Nga Thi**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 375 034 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

Una nueva secuencia de ácido nucleico dirigida a plastos, una nueva secuencia  $\beta$ -amilasa, un promotor sensible a estímulos y usos de los mismos.

5 Los mecanismos exactos mediante los cuales se sintetiza y se degrada el almidón en las plantas se desconocen, a pesar del aislamiento y caracterización de diversas enzimas que se supone que están implicadas en el proceso.

10 El almidón se acumula en los cloroplastos de las hojas durante el día y se usa para proporcionar a las plantas las necesidades de energía y biosíntesis durante la noche. El modo mediante el cual este almidón, denominado transitorio, se moviliza no se conoce del todo, pero debe implicar la regulación coordinada de las actividades sintéticas y degradativas de las enzimas. En los tejidos foliares se piensa que la ruta de degradación principal está implicada en actividades fosforolíticas e hidrolíticas, especialmente  $\alpha$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.3) (Nielson y Stitt, 1997).

15 El almidón también se acumula en los amiloplastos en los órganos de almacenamiento tales como semillas, frutos y tubérculos. En este caso el almidón se almacena durante largos periodos de tiempo y la movilización del almidón está acompañada por la degeneración de los tejidos de los órganos de almacenamiento y aumenta en actividades amilolíticas y fosforolíticas. Sin embargo, existen pruebas que sugieren que la renovación del almidón también se produce en los amiloplastos de los órganos de almacenamiento (Sweetlove et al, 1996). De nuevo esto requiere la regulación coordinada de las actividades sintéticas y degradativas de las enzimas.

20 Tanto los cloroplastos como los amiloplastos derivan de proplastos y por lo tanto tienen muchas características en común además de ser el sitio de síntesis del almidón en las hojas y en los órganos de almacenamiento respectivamente; los cloroplastos pueden transformarse en amiloplastos y en otros tipos de plastos (Thomson and Whatley, 1980).

25 El almidón es una mezcla de dos polisacáridos: la amilosa que es una cadena lineal de unidades glucosilo unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos; y la amilopectina que está constituida por muchas cadenas lineales de  $\alpha$ -1,4-poliglucanos que se unen entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos.

30 Las enzimas implicadas en la síntesis del almidón son la enzima ADPG fosforilasa (E.C. 2.7.7.21), la almidón sintasa (E.C. 2.4.1.21) y de ramificación (E.C. 2.4.1.18). La ADPG fosforilasa es responsable de proporcionar el sustrato ADPG, sirviendo esta molécula como donante de monómeros de glucosa que están unidos entre sí por la acción concertada de las enzimas almidón sintasas (enlaces  $\alpha$ -1,4) y de ramificación (enlaces  $\alpha$ -1,6).

35 Se piensa que la estructura insoluble, cristalina de los granos de almidón está formada por la estrecha compactación de las moléculas de amilopectina ramificadas, prolongadas helicoidalmente, rellenando las moléculas de amilosa todos los espacios.

40 Se ha descrito una serie de actividades enzimáticas degradativas de almidón que incluyen la enzima  $\alpha$ -amilasa (E.C. 3.2.1.1), la isoamilasa (E.C. 3.2.1.68), la  $\beta$ -amilasa (E.C. 3.2.1.2), la  $\alpha$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.3), la almidón fosforilasa (E.C. 2.4.1.1) y la desproporcionante (E.C. 2.4.1.25). Muchas de estas actividades enzimáticas existen en formas múltiples en plantas y se piensa que algunas están implicadas en la síntesis del almidón. Todas probablemente participando, en cierta medida, en el proceso de movilización del almidón, sin embargo sus funciones exactas y posibles interacciones aun no se han determinado. Las dificultades en cuanto a la atribución de las funciones para las diferentes enzimas se ilustran mejor por referencia a dos de las actividades enzimáticas que se piensa que son las principales colaboradoras de la degradación del almidón en las plantas: la almidón fosforilasa y la amilasa.

45 50 La almidón fosforilasa cataliza la liberación reversible de la glucosa-1-fosfato a partir de  $\alpha$ -1,4-glucanos. En los tejidos de las plantas se encuentran dos formas de almidón fosforilasa: la Pho1, o el tipo L, localizada dentro de los plastos y que tiene una alta afinidad hacia las maltodextrinas; la Pho2, o el tipo H, que es citosólica y tiene alta afinidad a poliglucanos grandes, muy ramificados, tales como el glucógeno. Aunque la enzima plastidial Pho1 fuese posiblemente una candidata implicada en la movilización del almidón, la inhibición antisentido de la actividad enzimática en hojas no tendría efecto sobre la acumulación del almidón en hojas de plantas de patata transgénicas (Sonnewald y col., 1995). En otro estudio, la inhibición antisentido de la Pho2 citoplásmica tuvo una influencia sobre el comportamiento germinativo de tubérculos de patatas transgénicas, pero no tuvo efecto sobre la acumulación y degradación del almidón. (Duwenig y col., 1997).

55 60 Existen dos grupos principales de amilasa ambos de los cuales hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos en la amilosa y amilopectina: la  $\alpha$ -amilasa actúa al azar sobre enlaces no terminales, mientras que la  $\beta$ -amilasa actúa para liberar unidades de maltosa a partir del extremo no reductor de la cadena de poliglucano. Se piensa que la localización subcelular de la  $\alpha$ -amilasa en el espacio apoplástico de las células de las plantas refleja el hecho de que la enzima se secreta normalmente. Sin embargo, en diversas plantas, tales como arroz (Chen, y col., 1994) y remolacha

azucarera (Li, y col., 1992) la enzima también se localiza dentro de los cloroplastos y amiloplastos, a pesar del hallazgo de que las secuencias de señal en el extremo amino de una serie de proteínas  $\alpha$ -amilasa son características para la translocación de las proteínas a través de la membrana de RE en lugar de la membrana plastidial (Chen y col., 1994). En un estudio en el que el promotor y la secuencia señal de un gen  $\alpha$ -amilasa del arroz se fusionaron con el gen GUS bacteriano y se introdujeron en el arroz, tabaco y patata usando transformación mediada por *Agrobacterium* (Chan y col., 1994), se demostró que la proteína de fusión GUS expresada se transportaba primero al retículo endoplásmico y después se exportaba al medio de cultivo de cultivos en suspensión constituidos a partir de células transgénicas. En diversos estudios, se ha observado que la  $\alpha$ -amilasa degradará moléculas de almidón nativas.

En cambio, en estudios realizados *in vitro* se ha observado que la  $\beta$ -amilasa no degradará gránulos de almidón nativos sin digestión previa de los gránulos con otras enzimas. Mutantes de arroz (Daussant y col., 1981) y de soja (Hildebrand e Hymowitz, 1981) que carecen de  $\beta$ -amilasa activa o que contienen solo trazas de actividad, respectivamente, aparentemente muestran crecimiento y desarrollo normal. Además, plantas de *Arabidopsis* transgénicas en las que los niveles de  $\beta$ -amilasa se han reducido enormemente, no muestran defectos de crecimiento graves (Mita y col., 1997). Se han obstaculizado intentos para definir la función fisiológica exacta de las  $\beta$ -amilasas en plantas por datos poco concluyentes concernientes a la localización subcelular. Aunque un estudio (Kakefuda y col., 1986) describió la presencia de dos  $\beta$ -amilasas en cloroplastos del guisante, la mayoría de los estudios que implican especies tales como *Vicia faba*, cebada, trigo, soja, batata y guisante han llegado a la conclusión de que la mayor, si no toda, actividad  $\beta$ -amilasa es extracloroplástica (Nakamura y col., 1991). Este punto de vista se basa en el hecho de que todos los genes  $\beta$ -amilasa clonados hasta ahora codifican proteínas que carecen de secuencias peptídicas transitorias cloroplásticas amino-terminales.

En cereales, se han descrito tres tipos de  $\beta$ -amilasa: una forma específica del endospermo que se acumula durante la maduración de la cariósida; una forma que se sintetiza *de novo* en células de aleurona de arroz y maíz durante la germinación (Wang y col., 1996; 1997); y una  $\beta$ -amilasa que es ubicua en órganos vegetativos. En *Arabidopsis*, la forma ubicua representa aproximadamente el 80% de la actividad degradativa del almidón de hojas de roseta. En común con todos los restantes genes  $\beta$ -amilasa clonados hasta ahora, el gen para la  $\beta$ -amilasa ubicua en *Arabidopsis* no codifica ninguna proteína que tenga una señal diana subcelular, por lo tanto, probablemente la enzima se localiza en el citosol.

Los hallazgos, como resultado de diversos estudios realizados, en cuanto a que las actividades degradativas puede eliminarse sin efectos adversos sobre la viabilidad de la planta, junto con la localización subcelular de las enzimas degradativas del almidón fuera del plasto, son sorprendentes. La ausencia aparente de una actividad  $\beta$ -amilasa localizada en plastos es especialmente sorprendentemente a la luz del hecho de que el producto final principal esperado de la actividad  $\beta$ -amilasa, concretamente maltosa, se ha identificado con un producto de la degradación del almidón en cloroplastos aislados (Peavey y col., 1977). Más recientemente, se ha observado que tanto la glucosa como la maltosa se exportan desde amiloplastos de brotes de coliflor aislados durante el proceso de movilización de almidón (Neuhaus y col., 1995).

La capacidad para manipular la cantidad de almidón en los plastos de hojas u órganos de almacenamiento sería de gran beneficio en diversos procesos industriales que utilizan almidones de plantas. Por ejemplo, un intento para aumentar el contenido de almidón de tubérculos de patata, se ha demostrado previamente que cuando *g1gC16* de la ADPG PPasa de *E. coli* se sobreexpresa en tubérculos de patata transgénica, hay un aumento en cuanto al flujo de carbono en el almidón pero solo hay un pequeño aumento en cuanto a la acumulación neta de almidón (Sweetlove y col., 1997). Análisis de actividades enzimáticas, realizados en las líneas de sobreexpresión, demostraron que, además de la modificación en la ADPG PPasa, específicamente la  $\beta$ -amilasa, también se modificó la actividad de la amilasa. Estos datos sugieren que la acumulación del almidón en tubérculos que sobreexpresan la proteína *g1gC16* se impide por la degradación del almidón recién sintetizado, es decir el almidón se está renovando.

En otro ejemplo, la disponibilidad del almidón durante el proceso de malteado está estrechamente correlacionada con los tipos y cantidades de actividades enzimáticas degradativas en la planta, específicamente en los órganos de almacenamiento. Un aumento en la capacidad degradativa del cultivo haría que el malteado del grano de los cereales o la conversión del almidón de los tubérculos, u otros órganos de almacenamiento, en alcohol fuesen más eficaces y productivos.

El tipo de almidón presente en los órganos de almacenamiento depende de las formas y de las actividades de la enzima ADPG fosforilasa, almidón sintasa, de ramificación y de las enzimas degradativas presentes. Las interacciones entre las diversas enzimas también serán importantes.

Existe un considerable interés en la creación de nuevos almidones en plantas y esto reducirá los costes de procesamiento y modificación del almidón antes del uso en una diversidad de industrias tales como la alimenticia, del papel, farmacéutica, pegamentos, aceite y textiles. Los siguientes ejemplos muestran cómo puede ser importante la actividad hidrolítica del almidón modificando la estructura del almidón *in vivo*.

Se ha demostrado que, en granos de maíz, la mutación *sugary1* produce la ausencia de una enzima desramificante que hidroliza enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos del almidón (James et al., 1995). La mutación da como resultado la concentración disminuida de amilopectina y la acumulación de glucopolisacárido altamente ramificado, el fitoglucógeno.

5 Se ha demostrado que, en el guisante, moléculas cortas de oligosacáridos, que comienzan con maltosa y añaden sucesivas unidades de glucosa hasta maltoheptosa, estimulan específicamente la actividad de la almidón sintasa I unida a gránulo (GBSSI) (Denyer et al., 1996) que generalmente se acepta que es la enzima principal responsable de la síntesis de amilosa (por ejemplo van der Leij et al., 1991; Hylton et al., 1995; Ainsworth et al., 1993). La  
10 manipulación de la actividad de la GBSSI controlando el abastecimiento de malto-oligosacáridos es el objeto de una patente reciente (WO 97/16554) y sugiere que un aumento en la concentración de malto-oligosacáridos, y por tanto un aumento en la proporción de amilosa con respecto a amilopectina en el almidón, puede producirse por la introducción de enzimas degradativas, concretamente  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, enzima desproporcionante, enzima desramificante y almidón fosforilasa. La patente WO 97/16554 también indica que se han clonado genes para  
15 isoformas plastidiales de estas enzimas. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, genes no  $\beta$ -amilasa aislados hasta ahora codifican una enzima  $\beta$ -amilasa con una secuencia de dirección proteica y, además, existen dudas de que las  $\alpha$ -amilasas se dirijan originalmente por plastos (Chen y col., 1994; Chan y col., 1994). Posteriormente en el documento WO 97/16554, se hace referencia a la manipulación por ingeniería genética de una secuencia de ADNc de  $\beta$ -amilasa para añadir una secuencia de dirección plastidial.

20 Además de los usos industriales para el almidón en los órganos de almacenamiento, la cantidad de almidón en la hoja tiene importancia significativa para la agronomía de un cultivo. El almidón se sintetiza en la hoja durante el día a partir del carbono fijado durante la fotosíntesis. El almidón se almacena en el cloroplasto y se degrada por la noche para convertirse en una fuente de energía y en productos intermedios para el metabolismo en la planta. Hasta el  
25 momento se desconocen los mecanismos mediante los cuales se controla la relación fuente-vertedero, sin embargo, está claro que la manipulación de la cantidad y disponibilidad del almidón en plastos de hojas tendrá una profunda influencia sobre la productividad de las plantas (biomasa y producción).

30 La cantidad de almidón en la hoja también será importante para aquellos cultivos en los que la hoja es el artículo de consumo principal de la planta, por ejemplo el cultivo de la planta del tabaco. Se sabe que el contenido del almidón tiene una influencia sobre el sabor eventual del tabaco cuando se fuma. La provisión de un medio para manipular el nivel de almidón en las hojas del tabaco sería de interés para la industria del tabaco.

35 En la presente memoria se describe, por primera vez, el aislamiento de un ADNc que codifica una nueva enzima  $\beta$ -amilasa que está dirigida a plastos (conocida en lo sucesivo en la presente memoria como  $\beta$ -amilasa (ct) dirigida a cloroplastos) mediante una nueva secuencia de dirección. El aislamiento de esta secuencia codificante completa es sorprendente, ya que generalmente se pensaba que la  $\beta$ -amilasa solo participaría en la hidrólisis del almidón una vez liberados los fragmentos de poliglucano más pequeños, bien por translocación o por degradación de la  
40 membrana, desde el plasto dentro del citoplasma. La localización de la enzima en los plastos ofrece la posibilidad inesperada de que la  $\beta$ -amilasa ct está implicada en la degradación del almidón transitorio localizado en los cloroplastos y almidón de almacenamiento localizado en los amiloplastos.

45 La similitud de las características entre los cloroplastos y los amiloplastos (Thomson y Whatley, 1980) es de importancia para la presente invención, ya que ha demostrado que los péptidos transitorios de polipéptidos dirigidos a cloroplastos pueden importar polipéptidos heterólogos dentro de amiloplastos y viceversa. Por ejemplo, cuando el péptido transitorio de la enzima almidón sintasa unida a gránulo del maíz se fusiona con la proteína  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *E. coli* importará la proteína GUS no solamente dentro de los amiloplastos sino también dentro de los cloroplastos (Klosgen y Weil, 1991).

50 Además, los autores de la invención demuestran que la expresión del gen *ct-Bmy* en *Arabidopsis* y la expresión de fusiones promotor de *Bmy ct* : GUS en tabaco transgénico puede regularse independientemente mediante luz y sacarosa. Esto es sorprendente considerando el fuerte acoplamiento en cuanto a las respuestas de inducción de luz y azúcar de la *AT $\beta$ -Amy* de *Arabidopsis* (Mita et al., 1995).

55 La presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico, conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 1, que comprende de 1-294 nucleótidos y que codifica una secuencia capaz de dirigir una proteína a un plasto de una planta, o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección.

60 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico codifica aproximadamente 94 y más preferentemente aproximadamente 85 restos de aminoácidos.

65 La presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 2, que comprende de 1-1662 nucleótidos y que en su interior posee una secuencia capaz de

codificar la  $\beta$ -amilasa o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la secuencia descrita en la SEC ID N°: 2 y que tiene la misma capacidad de codificación.

5 La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 3, que comprende de 1-1953 nucleótidos y que codifica la  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos, o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la secuencia descrita en la SEC ID N°: 3 y que comprende 1-294 nucleótidos de la SEC ID N°: 3 y que se hibrida con dicha SEC ID N°: 3 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos.

10 Las secuencias homólogas también incluyen aquellas secuencias que se hibridan con la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 en condiciones de medio rigurosas (lavado a 2x SSC a 65 °C).

15 Preferentemente la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ARNm o de ADNc, aunque puede ser ADN genómico.

20 La presente invención también proporciona un método para aumentar o disminuir la actividad de la  $\beta$ -amilasa en una planta, comprendiendo el método las etapas de incorporar, de manera estable, en un genoma de una planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dirigida a plastos, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico la secuencia conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 1, que comprende de 1-294 nucleótidos y que codifica una secuencia capaz de dirigir una proteína a un plasto de una planta o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifica una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección y una secuencia codificante de  $\beta$ -amilasa y que regenera una planta que tiene un genoma modificado. Dicha secuencia codificante puede ser la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 2, que es una  
25 secuencia codificante de  $\beta$ -amilasa.

30 La presente invención también proporciona un método para aumentar o disminuir la actividad de la  $\beta$ -amilasa en una planta, comprendiendo el método las etapas de incorporar, de manera estable, en un genoma de la planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico la secuencia conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 3 y que comprende de 1-1953 nucleótidos y que codifica una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos, o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 3 y que comprenden 1-294 nucleótidos de la SEC ID N°: 3 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 3 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos y que regenera una planta que tiene un genoma modificado. Dicha enzima puede ser la  $\beta$ -amilasa no plastidial.  
35

40 La presente invención también proporciona un método para dirigir proteínas o enzimas a un plasto de una planta, comprendiendo el método las etapas de incorporar, de manera estable, en un genoma de una planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dirigida a plastos y una secuencia codificante de una proteína o una enzima y la regeneración de una planta que tiene un genoma modificado, estando una o más de la proteína o enzima en la ruta de los siguientes grupos: síntesis de lípidos, fotosíntesis, metabolismo de aminoácidos, fijación de nitrógeno, fijación o síntesis de carbono de polímeros de hidratos de carbono; o siendo capaz de otorgar una característica a la planta, siendo la secuencia de ácido nucleico la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1 o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibrida con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifica  
45 una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección. Las características pueden seleccionarse de uno o más del siguiente grupo: resistencia a herbicidas y resistencia a plagas, incluyendo, por ejemplo, resistencia a hongos, bacterias o virus.

50 La presente invención también proporciona plantas que en su interior poseen un gen quimérico que comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico codificante que codifica la secuencia dirigida a plastos, siendo la secuencia capaz de dirigir una secuencia codificante de una enzima en la ruta biosintética o degradativa del almidón a un plasto de una planta y un terminador.

55 Dicho gen quimérico puede comprender un promotor, siendo dicho promotor una secuencia de ácido nucleico conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 8 o que en su interior tiene una homología de al menos un 65% y que tiene sustancialmente la misma función que esta y siendo dicha secuencia de ácido nucleico sensible a estímulos, siendo el nivel de expresión de dicho producto variable en respuesta al estímulo aplicado a dicha secuencia de ácido nucleico.

60 La descripción también se refiere a un método para variar el nivel de expresión de un producto codificado por una secuencia codificante unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de dicho producto en una planta, comprendiendo dicho método las etapas de incorporar, de manera estable, en un genoma de una planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un producto codificado por una secuencia codificante que está unida operativamente a la misma, teniendo dicha  
65 secuencia de ácido nucleico sustancialmente la secuencia de la SEC ID N°: 8 o teniendo una homología de al menos

un 65% con la misma y teniendo sustancialmente la misma función que esta y siendo sensible a estímulos. Preferentemente los estímulos se producen en presencia o ausencia de luz y/o de diversos niveles de azúcar. Como alternativa el estímulo es un estímulo que se controla evolutivamente.

5 Ventajosamente el azúcar es uno o más de sacarosa o glucosa.

Preferentemente el azúcar es sacarosa.

10 Ventajosamente el promotor inducible, o la secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de dicho producto en una planta, es operativa en condiciones en las que no hay luz pero sí azúcar, o en las que no hay azúcar pero sí luz. El tejido de una planta donde no hay luz pero sí azúcar puede estar adecuadamente en órganos subterráneos u órganos vertedero. Los órganos subterráneos pueden ser, por ejemplo, tubérculos, rizomas o raíces mientras que los órganos vertedero pueden ser hojas jóvenes o semillas.

15 El tejido de una planta en la que no hay azúcar pero sí luz puede ser hojas maduras (en las que no se transporta azúcar), partes de flores o semillas en germinación.

Las construcciones y genes quiméricos que poseen las características estructurales de ADN descritas anteriormente también son aspectos de la invención.

20 Son también un aspecto de esta invención las células de las plantas que contienen un gen quimérico comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dirigida a plastos, descrita anteriormente en la presente memoria, y una secuencia codificante de ácido nucleico de una enzima en la ruta biosintética o degradativa del almidón o un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una  
25 secuencia codificante adicional o un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente en la presente memoria, que es sensible a estímulos y una secuencia codificante, siendo variable el nivel de expresión de dicha secuencia codificante en respuesta al estímulo aplicado a dicha secuencia de ácido nucleico, como lo es la semilla de la planta transformada que contiene uno o más genes quiméricos de acuerdo con la invención.

30 Ventajosamente la secuencia dirigida a plastos es la SEC ID N°: 1.

En un primer aspecto de la presente invención el método anterior puede usarse para modificar el metabolismo de una hoja, de manera que el almidón se acumule en su interior o se movilice de ahí, en su conjunto, este proceso  
35 modifica la relación fuente-vertedero en la planta. Esto puede conseguirse proporcionando la secuencia de dirección y una secuencia codificante de ácido nucleico de una enzima en la ruta de la biosíntesis o degradativa del almidón bajo la dirección de un promotor adecuado. La selección del promotor adecuado daría como resultado en plantas un aumento o disminución de los niveles de almidón en las hojas que podría ser útil, por ejemplo, en la industria del tabaco; o de manera alternativa daría como resultado cambios en la producción del almidón en diversos tejidos de  
40 plantas distintos tales como tubérculos, frutas y raíces después de la modificación de la relación fuente-vertedero de la planta.

En esta realización de la invención un promotor adecuado dirigiría la expresión de la secuencia dirigida a plastos y la secuencia codificante de una enzima en la ruta biosintética o degradativa del almidón a lo largo de toda la planta,  
45 denominada expresión constitutiva, o específicamente en las hojas. Estos cambios tendrán un efecto profundo de manera que el contenido y/o la producción de almidón de los órganos de la planta se modificarían de manera significativa.

Un promotor preferido capaz de dirigir la expresión a lo largo de todos los tejidos de la planta es el promotor extraído del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor. Para la expresión en hojas, los promotores preferidos pueden extraerse del gen de la subunidad menor de la ribulosa bifosfato carboxilasa o del gen de plastocianina del guisante. Un experto en la materia reconocerá otros promotores adecuados tanto para la expresión constitutiva como para la expresión en específica en hojas, tales como el promotor de nopalina sintasa y el promotor de la proteína de unión a clorofila a/b, respectivamente.

55 La secuencia codificante, o partes de la misma, para la enzima en la ruta biosintética o degradativa del almidón puede disponerse en la dirección de marco de lectura normal, es decir, con sentido, o en la dirección de marco de lectura inversa, es decir antisentido. La regulación positiva o negativa de la actividad de la enzima en una planta usando tecnología con sentido, antisentido o cosupresora (siendo la última como se describe por DNAP en sus patentes europeas Nos 0465572 y 0647715) puede usarse para conseguir la modificación en el almidón de la planta.

En un segundo aspecto de la invención el método de la misma también puede usarse para modificar el metabolismo de almidón en órganos de almacenamiento de manera que el contenido del almidón aumente y/o el almidón se proporcione en una forma adecuada según se requiera para los propósitos de los procesos industriales particulares.  
65 Dichos procesos incluyen la elaboración de papel; fabricación de productos farmacéuticos, textiles, colorantes y productos de construcción; suministro de pan, productos lácteos y aperitivos; fabricación de conservas, productos

secos o instantáneos, malteado del grano y producción de jarabes y alcohol.

En el primer o segundo aspecto del método la enzima seleccionada para usar en el gen quimérico de los métodos puede ser una procedente de la ruta degradativa del almidón, es decir, una enzima degradativa de almidón. Ventajosamente, el gen quimérico comprende una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos (en lo sucesivo en la presente memoria conocida como  $\beta$ -amilasa ct) y más preferentemente comprende una  $\beta$ -amilasa ct derivada de *Arabidopsis thaliana* (en lo sucesivo en la presente memoria conocida como  $\beta$ -amilasa ct At), véase la SEC ID N°: 3. También pueden usarse secuencias homólogas a la  $\beta$ -amilasa ct At que pueden derivar de otras fuentes de plantas tales como patata, tabaco, trigo, maíz y cebada. Para aislar secuencias de dichos organismos, pueden usarse métodos convencionales de clonación por hibridación o técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR): por ejemplo técnicas de clonación molecular, tales como las descritas por Sambrook et al. (1989) y las técnicas por PCR descritas por Innes et al. (1990). Otras enzimas degradativas del almidón, cuya una o más secuencias codificantes serían adecuadas para usar con la secuencia dirigida a plastos, incluyen la enzima  $\alpha$ -amilasa, la enzima desproporcionante, la enzima desramificante, la almidón fosforilasa, la  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -amilasa no plastidial.

En el segundo aspecto del método de la invención, los promotores preferidos que dirigirían la expresión a los órganos de almacenamiento de las plantas podrían seleccionarse, por ejemplo, de los genes del siguiente listado: el gen de glutenina de elevado peso molecular del endospermo del trigo; el gen de  $\alpha_1\beta$ -gliadina del endospermo del trigo; el gen de hordeína del endospermo de la cebada o el gen de la patatina de tubérculos de patata. Los expertos en la materia conocen otros promotores adecuados.

En cualquier aspecto de la presente invención, la modificación del metabolismo tisular o la modificación de las características o del tipo de almidón puede hacerse sensible a estímulos, es decir inducible, en virtud del uso del promotor inducible descrito en la presente memoria (SEC ID N°: 8). Por ejemplo, para manipular el conjunto de semillas, podría usarse el aspecto de inducibilidad por luz del promotor inducible induciendo un gen, tal como Barnasa, (como se ilustra en la patente WO 98/10081) para influir en el desarrollo del polen o para influir en genes no sensibles a luz en procesos dependientes de luz de otra manera tales como maduración de frutos o germinación de semillas. El promotor inducible por luz también podría usarse para activar genes que influyen en la producción de metabolitos secundarios en hojas, por ejemplo producción de alcaloides. Los promotores inducibles por luz también pueden usarse para manipular genes de enzimas biosintéticas de almidón en hojas u otros tejidos fotosintéticos o por ejemplo en la activación de genes después de la retirada de tubérculos, por ejemplo del almacenamiento en la oscuridad. El aspecto de inducibilidad por azúcar del promotor inducible podría usarse para regular genes, por ejemplo, en el desarrollo de tubérculos u otro tejido no fotosintético tal como genes de resistencia a plagas y/o genes que podrían influir en la calidad del cultivo después de la cosecha. Para las patatas, los genes de resistencia a podredumbre, pie negro y raíz seca podrían ser particularmente beneficiosos y podrían clonarse más ventajosamente en genes recombinantes con promotores inducibles por azúcar. Como alternativa, el aspecto de inducibilidad por azúcar del promotor inducible podría usarse para conducir la expresión de genes para marcadores de selección en el proceso de cultivo de tejidos.

Un experto en la materia puede diseñar fácilmente el elemento sensible inducible por azúcar de la SEC ID N°: 8 y/o el elemento sensible inducible por luz usando técnicas bien conocidas, tales como estudios de delección. Pwee y Gray (1993) describen dicho estudio de delección dentro del gen de plastocianina del guisante usando un gen marcador para determinar regiones operativas del mismo.

Los métodos descritos en la presente memoria o, por ejemplo, en manuales de laboratorio de Sambrook et al (1989) y Gelvin y Stanton (1995) por clonación de secuencias de genes e insertándolas en vehículos apropiados (vectores o plásmidos etc.) son técnicas bien conocidas por los expertos para poner en práctica dichos conceptos. El gen (o genes) quimérico, como se ha descrito anteriormente, puede introducirse en si mismo o acompañarle uno o más genes quiméricos distintos, tal como uno o más de los otros genes descritos anteriormente. En el caso de las realizaciones descritas anteriormente, utilizando un primer gen quimérico que codifica una enzima de la ruta degradativa del almidón, el segundo gen quimérico puede, por ejemplo, comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique una enzima de la ruta biosintética del almidón también bajo la dirección de un promotor y un terminador adecuados. El promotor y/o terminador del segundo gen quimérico puede ser el mismo o diferente del promotor y/o terminador del primer gen quimérico. Las secuencias adecuadas que codifican enzimas de la ruta biosintética del almidón son las secuencias de ácido nucleico para la sacarosa sintasa, ADP fosforilasa, almidón sintasa y pueden también incluir enzimas ramificadoras,  $\alpha$ -amilasa, isoamilasa,  $\beta$ -amilasa no plastidial,  $\alpha$ -glucosidasa, almidón fosforilasa y enzima desproporcionante.

Se han descrito los procedimientos para la introducción de más de un gen quimérico en una planta y comprenden la construcción de un vector binario con los genes quiméricos unidos entre sí en una molécula de ácido nucleico; la cotransformación usando dos o más células de *Agrobacterium* diferentes, por ejemplo, con diferentes vectores binarios que contienen diferentes genes quiméricos en su interior; o la transformación de una planta que ya tiene un gen quimérico con un segundo gen quimérico diferente, es decir, retransformación. En el último caso, el método de selección de plantas transgénicas después de la introducción del segundo gen quimérico debe ser diferente del método de selección usado para la introducción del primer gen quimérico. Los marcadores de selección adecuados

podrían incluir los de resistencia a higromicina, a kanamicina, a sulfonamida y a Basta. También pueden usarse métodos biológicos, tales como cruzamiento de dos plantas, en el que cada planta contiene un solo gen quimérico.

5 Para modificar el contenido en almidón de una planta ya transformada podría realizarse el uso de dos construcciones de genes quiméricos que presenten un aumento significativo en una primera actividad enzimática y un cambio consecuente en la síntesis de almidón.

10 Por tanto, la presente invención también proporciona un método para modificar, en una planta transgénica que ya presenta un aumento o disminución en una actividad enzimática en la ruta biosintética de almidón como resultado de transformación genética, otra enzima para regular positiva o negativamente dicha otra enzima y por lo tanto aumentar o disminuir la cantidad de almidón producida por la planta retransformada, siendo dicha otra enzima una  $\beta$ -amilasa dirigida a plastos que codifica una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 1 o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifica una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección.

Dicha  $\beta$ -amilasa dirigida a plastos está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 2.

20 Ventajosamente, la primera planta transformada es una planta que posee una actividad enzimática aumentada en la ruta biosintética del almidón. Un ejemplo de un intento para aumentar el contenido de almidón de una planta es una planta de patata transgénica transformada con el gen de ADPD-PPasa, por ejemplo *g1gC16* (véase por ejemplo, el documento WO 91/19806). La cantidad de almidón que aumentó en dicha planta fue relativamente pequeña. Esta primera planta transformada se volvió a transformar, ventajosamente, con un gen quimérico de una enzima degradativa de almidón, que comprendía adecuadamente, por ejemplo,  $\beta$ -amilasa ct At. La proteína *g1gC16* se expresó en los primeros tubérculos transformados dando como resultado un aumento de la actividad ADPG-PPasa y un aumento del flujo de carbono para almidón. Ventajosamente, la expresión del gen  $\beta$ -amilasa ct At quimérico, o partes del mismo, en los tubérculos retransformados dieron como resultado la regulación negativa de la actividad  $\beta$ -amilasa ct, es decir, cosupresión o tecnología antisentido, proporcionando por tanto un aumento en la acumulación de almidón.

Preferiblemente la expresión de la segunda enzima se dirige a los tubérculos. Un promotor adecuado para dirigir la expresión del gen quimérico de  $\beta$ -amilasa ct At en tubérculos es promotor del gen de la patatina.

35 La primera planta de patata transformada que expresa *g1gC16* es resistente a kanamicina, por lo tanto la construcción de vector binario para el gen quimérico de  $\beta$ -amilasa ct At lleva un gen de resistencia diferente, adecuadamente un gen de resistencia a sulfonamida, por ejemplo. La producción de almidón aumentada en el tubérculo de la patata podría ser beneficiosa, por ejemplo, para la fabricación de patatas fritas ya que un aumento de un 1% de materia seca de patata podría dar como resultado un aumento de un 4% en el producto.

40 La fabricación de patatas fritas también sirve para ilustrar otro beneficio de la invención. Cuando los tubérculos de la patata se almacenan a temperaturas por debajo de 8 °C, se acumulan azúcares reductores, glucosa y fructosa a partir de la degradación del almidón. Cuando las patatas se frien para obtener patatas fritas los azúcares reductores reaccionan con los aminoácidos en la reacción Maillard para dar lugar al color marrón y a sabores en el producto. La introducción de un gen quimérico en plantas de patata que detuviese la degradación del almidón y por tanto la acumulación de azúcares reductores podría ser beneficiosa para la industria de aperitivos. Preferiblemente el gen comprendería la secuencia codificante, o una parte de la secuencia, de la  $\beta$ -amilasa ct en una construcción cosupresora o antisentido, dirigido por un promotor y un terminador adecuados. Un promotor adecuado podría extraerse del gen de patatina en tubérculos de patata. Ventajosamente, en lugar de la  $\beta$ -amilasa ct, también podrían usarse cualquiera de las otras enzimas degradativas de almidón mencionadas anteriormente.

45 En la construcción también podría usarse el promotor inducible de la SEC ID N° :8 si fuera necesaria la expresión coordinada en el desarrollo de la hoja y en el desarrollo del tubérculo, ya que el promotor de la patatina también es inducible por sacarosa (Rocha-Sosa et al (1989). De manera similar, también podría usarse la secuencia para el polipéptido dirigido a cloroplastos de la SEC ID N°: 1 con cualquier otro gen que careciese de su propia secuencia de dirección y que fuera necesario para dirigirse a los plastos.

50 Los ejemplos anteriores sirven para ilustrar los posibles beneficios del uso de la presente invención. Un experto en la materia reconocerá que la combinación de genes y las plantas para las cuales puede aplicarse la invención es considerable.

60 Preferiblemente, las combinaciones de genes incluirán  $\beta$ -amilasa ct con uno o más de los genes de sacarosa sintasa, ADPG fosforilasa, almidón sintasa, enzima ramificadora,  $\alpha$ -amilasa, isoamilasa,  $\beta$ -amilasa no plastidial,  $\alpha$ -glucosidasa, almidón fosforilasa y enzima desproporcionante, cuyas secuencias conocen los expertos en la materia. Como alternativa, la secuencia de dirección de la  $\beta$ -amilasa ct puede usarse con uno o más de los genes anteriores.

La lista de plantas que se transformarían incluye, preferentemente, patata, trigo, maíz, cebada, tomate, arroz, guisante, soja, cacahuete, yuca, ñame, banana y tabaco.

5 La invención se describirá ahora, como ejemplo, con referencia a una realización para el aislamiento del ADNc de la  $\beta$ -amilasa ct de *Arabidopsis thaliana* y para incorporar el ADNc en plantas de tabaco y patata. También se proporcionan ejemplos sobre el promotor sensible a estímulos y su actividad en plantas transgénicas.

10 Seguidamente, para poder llevar a la práctica fácilmente la invención se hará referencia, como ejemplo, a los siguientes dibujos esquemáticos en los que;

15 La Figura 1 muestra el resultado de productos de traducción importados *in vitro* radiomarcados muestreados en gel SDS-PAGE seguido de fluorografía. Leyenda: Marcadores de peso molecular (carril M); productos de traducción (carril Tr); cloroplastos reaislados y tratados con termolisina después de incubación para importación (carril C); fracción estromal (carril S); tilacoides lavados (carril T); tilacoides tratados con termolisina (carril tT), fracción de envoltura interna (carril I); fracción de envoltura externa (carril O). Supuesto precursor (P), formas intermedia (I) y madura (M) de  $\beta$ -amilasa, respectivamente. Kilodaltons (K);

20 La Figura 2 muestra el efecto de la luz y el efecto de la luz y de los azúcares sobre la expresión del transcrito de  $\beta$ -amilasa ct en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. La Figura 2a muestra un análisis de transferencia de Northern de los ARN totales de plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas de vida cultivadas en suelo y expuestas a 2 días de luz continua (L), 2 días de oscuridad continua (D), 2 días de oscuridad seguido de 3 días de luz continua (LL) o 2 días de oscuridad seguido de 3 días de luz continua (DL). La Figura 2b muestra un análisis de transferencia de Northern de los ARN totales de plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas de vida, cultivadas *in vitro*, transferidas a agua y expuestas a 3 días de luz continua (WL); o transferidas a sacarosa al 5% y expuestas a 3 días de oscuridad (SD) o a 3 días de luz continua (SL); o transferidas a glucosa al 5% y expuestas a 3 días de oscuridad (GD) o a 3 días de luz continua (GL). Las transferencias de Northern se hibridaron con un inserto de ADNc de *ct-Bmy* radiomarcado y se autorradiografió (paneles superiores). Los correspondientes geles de formaldehído-agarosa teñidos con bromuro de etidio se muestran en los paneles inferiores;

30 La Figura 3 muestra la representación esquemática del ADN-T de los genes quiméricos del promotor GUS de  $\beta$ -amilasa ct construidos en el ejemplo 3 a continuación, en el que NosP representa el promotor de nopalina sintasa; NosT representa el terminador de nopalina sintasa; BR es la repetición inversa del margen derecho y BL es la repetición inversa del margen izquierdo del ADN-T de pBI101; NPTII representa la secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa II; GUS representa la secuencia codificante de la  $\beta$ -glucuronidasa. Los fragmentos del promotor de  $\beta$ -amilasa ct se representan mediante rectángulos con entramado; los fragmentos comunicantes Xho I-Bam HI amplificados por PCR se representan por rectángulos negros;

40 La Figura 4 muestra el efecto de la luz y la sacarosa sobre la actividad de GUS expresada a partir de un gen quimérico GUS promotor de *ct Bmy* en plántulas de tabaco;

La Figura 5 muestra el mapa plasmídico del vector donante pDV35S (SK) V;

La Figura 6 muestra el mapa plasmídico del vector donante pDV02000;

45 La Figura 7 muestra el mapa plasmídico del plásmido binario pBNP10431 en el que 35Sp representa el promotor 35S del CaMV, ct bamy representa el ADNc de  $\beta$ -amilasa ct de longitud completa, 35St representa el terminador 35S del CaMV, RB representa el margen derecho del vector binario pBinPlus, colE1ori representa el origen de replicación bacteriana co1E1, RKori representa el origen oriV de la replicación del plásmido RK2, nptIII representa el gen de neomicina fosfotransferasa de resistencia bacteriana a kanamicina, LB representa la secuencia del margen izquierdo del vector binario y kan representa el gen recombinante de neomicina fosfotransferasa en plantas necesario para resistencia a kanamicina en plantas;

50 La Figura 8 muestra el mapa plasmídico del plásmido binario pBNP10432 en el que las abreviaturas son como las indicadas en la Figura 7;

55 La Figura 9 muestra el mapa plasmídico del plásmido binario pBNP02331 en el que las abreviaturas son como las indicadas en la Figura 7 salvo que patp representa el promotor de patatina de clase I del vector pDV02000 en la Figura 6 y nost representa el terminador de nopalina sintasa y

60 La Figura 10 muestra el mapa plasmídico del plásmido binario pBNP02432 en las que las abreviaturas son como las indicadas en la Figura 9.

En el listado de secuencias:

65 La SEC ID N°: 1 es el ácido nucleico capaz de dirigir una secuencia codificante a un plasto de una planta,

particularmente a un cloroplasto;

La SEC ID N°: 2 es el ácido nucleico que codifica la  $\beta$ -amilasa;

5 La SEC ID N°: 3 es la secuencia completa de la  $\beta$ -amilasa (ct) dirigida a cloroplastos;

Las SEC ID N°s: 4 y 5 son cebadores usados en el proceso de amplificación del Ejemplo 3;

La SEC ID N°s: 6 y 7 son cebadores usados en el proceso de amplificación del Ejemplo 4; y

10

La SEC ID N°: 8 es el ácido nucleico que es sensible a estímulos, particularmente a luz y/o a azúcar.

### Ejemplo 1

#### 15 **Aislamiento y caracterización de la $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos de *Arabidopsis thaliana***

##### **Secuenciación del inserto de ADNc en pBmy81**

La exploración con la base de datos BLASTN de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN del cromosoma IV de *Arabidopsis* de 37 kb en el cósmido G16599 (Bevan et al., 1998) reveló la presencia de un gen que compartía una homología significativa con la  $\beta$ -amilasa extracloroplástica de *Arabidopsis*, cebada, maíz, soja y arroz. La exploración también identificó diversas secuencias EST 3' terminales, una de las cuales, la EST 81E10T7 (Newman et al., 1995), denominada en lo sucesivo en la presente memoria, pBmy81, era idéntica más de aproximadamente 300 nucleótidos. El Biological Resource Center (ABRC) DNA Stock Center (Universidad de Ohio, Estados Unidos) proporcionó el clon EST 81E10T7 de *Arabidopsis*. Como moldes de ADN bicatenario en las reacciones de secuenciación de ciclos mediante PCR, se usó un conjunto anidado de subclones de delección de *Ba/31*, abarcando el inserto de ADNc en pBmy81, usando cebadores universales marcados con colorante fluorescente. Las reacciones de secuenciación se analizaron sobre un secuenciador automatizado de Applied Biosystems modelo 373A. La secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc en pBmy81 se muestra en la SEC ID N°: 3. Advanced Technologies (Cambridge) Limited of 210 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 4WA, depositó la construcción pBmy81, según el tratado de Budapest, en el International Recognition of the Deposit of Micro-Organisms para los propósitos de procedimientos de patente en el National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St. Machar Street, Aberdeen Scotland el 4 de agosto de 1998 con el número de acceso NCIMB 40964.

35

##### **Identificación de una supuesta señal dirigida a cloroplastos**

El inserto de ADNc en pBmy81 comprende 36 nucleótidos no traducidos en el extremo 5', un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína de 548 aminoácidos y una región no traducida (UTR) de 232 pb. La proteína codificada por el inserto de ADNc en pBmy81 tiene un peso molecular previsto de 61 kDa y comparte una alta similitud de aminoácidos con las  $\beta$ -amilasas extracloroplásticas de plantas del maíz, arroz, cebada, soja y batata. Sin embargo, la proteína codificada por pBmy81 se diferencia de las  $\beta$ -amilasas restantes, indicadas hasta ahora, en que contiene una sola extensión N-terminal que posee las características de una señal dirigida a cloroplastos, es decir, un alto contenido de serina (16%), treonina (10%) y restos de aminoácidos cargados positivamente (15%) (Baier y Dieter, 1997). En la secuencia señal se identificaron tres dominios que son características distintivas de señales dirigidas a cloroplastos (Schatz y Dobberstein, 1996): un dominio amino-terminal sin carga; un dominio central rico en aminoácidos hidroxilados y un dominio carboxi-terminal con posibilidad de formar una cadena  $\beta$  anfífila.

##### **50 El inserto de ADNc en pBmy81 codifica una $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos**

Se aislaron cloroplastos intactos de 50-60 g de brotes de guisante (*Pisum sativum* L. var Feltham First) usando gradientes de progresión Percoll. El material vegetal se cultivó y los cloroplastos se aislaron de acuerdo con el método de Mould y Gray (1997a).

55

Mediante digestión, con la enzima de restricción *NotI*, el plásmido pBmy81 se linealizó y se transcribió *in vitro* usando la ARN polimerasa de T7. La proteína precursora radiomarcada se sintetizó en un sistema de traducción de germen de trigo, que incluía <sup>35</sup>S-metionina y <sup>35</sup>S-cisteína de transcritos de ADNc en pBmy81 como describen básicamente Mould y Gray (1997b).

60

La importación de los productos de traducción *in vitro* radiomarcados se realizó como describen Mould y Gray (1997b). Después de la incubación para la importación, se trataron cloroplastos intactos con termolisina (concentración final 0,2 mg/ml en tampón de importación) durante 30 minutos en hielo y después se detuvo la reacción de proteasa por la adición de EDTA a 50 mM en tampón de importación. Los cloroplastos se volvieron a aislar a través de un amortiguador de Percoll al 40% en tampón de importación y después se lavaron en tampón de

65

importación (Mould y Gray, 1997b). Para el análisis se tomó una alícuota (1/10) de la muestra de cloroplasto tratada con termolisina y el resto se fraccionó esencialmente como describen Schnell y Blobel (1993). Las muestras de los cloroplastos tratados con termolisina, la fracción estromal, los tilacoides y los tilacoides tratados con termolisina, se cuantificaron por SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie y densitometría de barrido de las bandas de proteína teñidas (como patrones se usaron subunidades de ribulosa biscofosfato carboxilasa y proteínas complejas captadoras de luz). Se recuperaron cantidades equivalentes de estas fracciones (aproximadamente igual a un 2% de los cloroplastos recuperados del gradiente Percoll) y 505 de las fracciones de envoltura interna y externa, se analizaron por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, seguido de fluorografía. Los resultados (Figura 1) muestran que el producto principal de la traducción (carril Tr) era de aproximadamente de 58 kDa. Cuando se aislaron, los cloroplastos de guisante intactos se incubaron con la proteína radiomarcada en presencia de ATP, se generaron polipéptidos de aproximadamente 50 kDa y 48 kDa (carril C). La resistencia de estos polipéptidos a la degradación por termolisina añadida exógenamente indica que son productos de importación de la proteína radiomarcada. El fraccionamiento en el estroma de los cloroplastos intactos tratados con termolisina, tilacoides lavados, tilacoides tratados con termolisina, envolturas interna y externa, demostró que los dos polipéptidos radiomarcados se localizaban en la fracción estromal.

## EJEMPLO 2

### Inducción con sacarosa y luz del gen de $\beta$ -amilasa ct de *Arabidopsis thaliana*

Para demostrar la inducción por luz de la  $\beta$ -amilasa ct, en un invernadero a 18 °C, se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg con un régimen de 18 horas de luz, 6 horas de oscuridad. Después de 5 semanas, dos bandejas de plántulas se transfirieron a oscuridad completa y dos bandejas de plántulas se cultivaron con luz continua. Después de dos días, una bandeja de plántulas adaptadas a la oscuridad y una bandeja de plántulas cultivadas con luz se usaron para el aislamiento de los ARN totales y la segunda bandeja de cada una se expusieron a 3 días más de luz continua.

Para los tratamientos combinados de sacarosa-luz-oscuridad, se esterilizó la superficie de las semillas del ecotipo Landsberg, se colocaron en medio con agar MS que contenía sacarosa al 1% y se cultivaron en una sala de cultivo con un régimen de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad. Plántulas de 5 semanas de edad se transfirieron sobre agua destilada esterilizada o sobre una solución de sacarosa al 5% o de glucosa en agua. Las plántulas se mantuvieron con luz continua u oscuridad durante tres días. Los ARN totales se prepararon a partir de las plántulas de cada ensayo y se analizaron por análisis de transferencia de Northern como describen Eggermont et al. (1996). Los análisis de transferencia Northern se exploraron con el inserto de ADNc en pBmy81, purificado en gel, después de marcar al azar con <sup>32</sup>P-dCTP, como describen Feinberg y Vogelstein (1983).

Los resultados mostrados en la Figura 2A indican que el transcrito del gen  $\beta$ -amilasa ct es inducible debido a la luz.

Los resultados mostrados en la Figura 2B indican que el transcrito del gen  $\beta$ -amilasa ct se induce en la oscuridad con sacarosa al 5% y en menor medida con glucosa al 5%. Esta inducción se potencia adicionalmente en la luz en presencia de los azúcares. Estos resultados muestran que el efecto de la luz y de los azúcares es independientes entre sí.

## EJEMPLO 3

### Construcción de fusiones del promotor GUS de la $\beta$ -amilasa ct

Por digestión con enzimas de restricción se aislaron fragmentos del promotor del gen de  $\beta$ -amilasa ct localizado en el cósmido G16599 (Bevan et al., 1998). Los sitios de restricción convenientes en el promotor fueron *Hind* III, en la posición nucleotídica -1662 pb (comenzando en el pb 9.179 en la cadena negativa de la SEC ID N°: 8), *Sal* I en la posición -1127 pb y *Pst* I en la posición -371 pb y se usó un sitio *Xho* I, localizado en la posición +21 pb aguas abajo de la metionina de inicio de la  $\beta$ -amilasa ct para aislar tres longitudes diferentes de la secuencia peptídica transitoria más la promotora (a la A del codon ATG de la metionina de inicio de la traducción se la asigna el número +1).

Se amplificó un fragmento de 294 pb (SEC ID N°: 1) del gen de  $\beta$ -amilasa ct localizado en el cósmido G16599 (Bevan et al., 1998) usando los cebadores oligonucleotídicos:

SEC ID N°: 4

P1: (5' - AAT TCC TCG AGT TCT CTT ATC - 3') y

SEC ID N°: 5

P2: (5' - cgg gAT CCC TGA CAT TGT TAG - 3').

En el cebador P1, las bases subrayadas se refieren al sitio *Xho* I localizado en la posición +21 pb; en el cebador P2

las bases en letras minúsculas se refieren a los nucleótidos añadidos para crear un sitio *Bam* HI.

Se crearon genes quiméricos GUS promotores de  $\beta$ -amilasa ct por ligamiento triple del fragmento promotor; el fragmento comunicante de la PCR digerido con *Xho* I y *Bam* HI; y el vector GUS pBI101 (Jefferson et. al., 1987) digerido con *Hind* III-*Bam* HI, *Sal* I-*Bam* HI o *Pst* I-*Bam* HI (Figura 3). Las construcciones se denominaron H $\beta$ GUS, S $\beta$ GUS y P $\beta$ GUS respectivamente.

Las construcciones de genes quiméricos se transfirieron a *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por emparejamiento triparental (Bevan, 1984) y se introdujeron en *Nicotiana tabacum* var Samsun mediante el método de transformación sobre discos foliares (Horsch et al., 1985).

### **EJEMPLO 3A**

#### **Inducción por sacarosa y luz del gen quimérico GUS promotor de la $\beta$ -amilasa ct de *Arabidopsis thaliana* en plántulas de tabaco**

Para investigar la expresión inducible por luz y por sacarosa de los genes quiméricos, se usaron plantas que contenían las construcciones H $\beta$ GUS y P $\beta$ GUS, que expresaban altos niveles de actividad GUS, y la progenie F1 de las plántulas. Se esterilizó la superficie de las semillas de tabaco F1, se pusieron en un medio con agar MS que contenía sacarosa al 1% y se cultivaron en una sala de cultivo con un régimen de 18 horas de luz, 6 horas de oscuridad. Plántulas de dos a tres semanas de vida se transfirieron sobre una solución de sacarosa al 5% o sobre agua destilada y se mantuvieron con luz continua o a la oscuridad durante tres días. Se analizaron extractos de proteína total de grupos 10 a 14 plántulas para determinar la actividad de GUS usando el sustrato fluorogénico 4-metilumbelliferil-glucuronido (4-MUG), como describen Jefferson et al. (1987). Con ambas construcciones, el nivel de actividad de GUS en plántulas expuestas a luz continua, en ausencia de sacarosa, fue similar a los niveles de actividad de GUS en plántulas expuestas a sacarosa en ausencia de luz (Figura 4). Sin embargo, la exposición de plántulas tanto a luz continua como a sacarosa, aumentó los niveles de la actividad de GUS aproximadamente de dos a tres veces. Estos resultados coinciden plenamente con los resultados de los experimentos realizados con el propio gen de  $\beta$ -amilasa ct que mostraron que la inductividad por luz y la inductividad por sacarosa son procesos independientes.

La tinción histoquímica de GUS mostró que la actividad se detectaba en los cotiledones de plántulas de dos semanas de vida y una escasa o ninguna actividad en las primeras hojas verdaderas o en los tallos y raíces. En plántulas de cuatro semanas de vida, se mostró actividad GUS adicional en todas las primeras hojas verdaderas y también en los tallos. La tinción de GUS se asoció particularmente con células parenquimáticas ricas en cloroplastos (clorénquima) localizadas entre los rayos del xilema y entre el xilema y los haces del floema que constituyen el floema interno en los tallos.

### **EJEMPLO 4**

#### **Construcción de plásmidos de $\beta$ -amilasa ct para su uso en la transformación de hojas de tabaco y de patata**

Para transformar el sitio *Kpn* I, localizado en la posición 2302 pb del plásmido pBmy81, en un sitio *Bam* HI, se usó mutagénesis dirigida.

Se diseñaron los cebadores oligonucleotídicos

SEC ID N°: 6

P3: (5' - GCT GGT ACG CCT GCA GGA TCC GGT CCG GAA TTC CC - 3') y

SEC ID N°: 7

P4: (5' - GGG AAT TCC GGA CCG GAT CCT GCA GGC GTA CCA GC - 3')

y se usaron con el kit Quick Change (Promega) de mutagénesis dirigida. El fabricante diseñó el protocolo.

La secuencia codificante de  $\beta$ -amilasa ct de longitud completa se separó del plásmido pBmy81 mutado por escisión con *Bam* HI y después se purificó con GeneClean (BIO 101). El fragmento *Bam* HI se ligó en el sitio *Bam* HI de los vectores donantes pDV35S(SK) V (véase Figura 5) y pDV02000 (véase Figura 6). El vector pDV35S(SK) V consta de pBluescript (Stratagene) que lleva un terminador 35S - promotor 35S del CaMV, en la técnica se conocen construcciones similares (por ejemplo Odell et al., 1985). El vector pDV02000 consta de pBluescript con un terminador de nopalina sintasa - promotor de patatina de 1,4 kpb. Un experto en la materia podría realizar construcciones similares a partir de secuencias conocidas (por ejemplo Liu et al., 1990). Se aislaron plásmidos con la secuencia codificante, en orientación sentido y antisentido, con respecto a los promotores y en el vector binario pBinPlus se subclonaron los genes quiméricos de  $\beta$ -amilasa ct de los vectores donantes (van Engelen et al., 1995).

Los mapas plasmídicos se muestran en las Figuras 7-10.

#### **EJEMPLO 5**

##### **5 Transformación o Retransformación de plantas**

Se transformaron plantas de patata usando el método de cocultivo en discos foliares, como describe básicamente Horsch (1985). Como se ha descrito anteriormente, los vectores binarios, se transfirieron a LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* usando el método de electroporación y en la transformación se usaron los cultivos de dicha *Agrobacteria*, de manera que las plantas regeneradas llevan los genes quiméricos como se describe en el Ejemplo 4.

Para transformar una planta de patata que ya lleva el gen quimérico *g1gC16* de ADPG-Ppasa de *E. coli* por los métodos de cocultivo en disco foliar, puede usarse el plásmido binario de gen quimérico terminador de nopalina sintasa - promotor de  $\beta$ -amilasa ct de patatina.

#### **EJEMPLO 6**

##### **Construcción de plásmidos con el péptido de dirección de la $\beta$ -amilasa ct AT**

La secuencia dirigida a plastos de la  $\beta$ -amilasa ct AT está contenida dentro de un fragmento de 294 pb equivalente a la SEC ID N°: 1. La amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción puede usarse para aislar fragmentos de ADN de los plásmidos descritos en el Ejemplo 3, es decir fragmentos constituidos por el promotor 35 S del CaMV más la secuencia de dirección a plastos o por el promotor de patatina más la secuencia dirigida a plastos. Pueden construirse genes quiméricos por ligamiento de secuencias codificantes de proteínas o enzimas como fusiones traduccionales con la secuencia peptídica transitoria. Las proteínas traducidas se transportarían a los plastos para proporcionar nuevas actividades o para influir en las rutas metabólicas.

##### **Referencias**

- Ainsworth, C., Clark, J. y Balsdon, J. (1993). *Plant. Mol. Biol.*, 22, 67-82.
- Baier, M. y Dietz, K.J., (1997) *Plant J.* 12, 179-190
- Bevan, M.W. (1984) *Nucl. Acids. Res.*, 12, 8711-8721
- Bevan, M.W. et al. (1998). *Nature*, 391, 485-488.
- Chan, MT., Chao, YC. y Yu, SM. (1994). *J. Biol. Chem.*, 269, 17635-17641.
- Chen, MH., Liu, LF., Chen, YR., Wu, HK. y Yu, SM. (1994). *Plant J.*, 6, 625-636.
- Daussant, J., Zbaszyniak, B., Sadowski, J. y Wiatroszak, I. (1981). *Planta*, 151, 176-179.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H. y Smith, A.M. (1996). *Plant J.*, 10, 1135-1143.
- Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L. y Kossmann, J. (1997). *Plant J.*, 12, 323-333.
- Eggermont, K., Goderis, I. J. y Broekaert, W. F. (1996). *Plant Mol. Biol. Rep.* 14, 273-279.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983). *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Gelvin, S. B. y Schilperoort, R. A. (1995). *Plant Molecular Biology Manual*. 2ª edición. Kluwer Academic Publishers, Países Bajos.
- Hildebrand, D.F. y Hymowitz, T. (1981). *Physiol. Plant.*, 53, 429-434.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. y Swaley, R.T. (1985) *Science*, 227. 1229-1231.
- Hylton, C.M., Denyer, K., Keeling, P.L., Chang, MT. y Smith, A.M. (1995) . *Planta*, 198, 230-237.
- Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. (1990). *PCR Protocols*. Publisher: Academic Press.
- James, M.G., Robertson, D.S. y Myers, A.M. (1995). *Plant Cell*, 7, 417-429.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987) *EMBO, J.*3901-3907.
- Kakefuda, G., Duke, S.H. y Hostak, M.H. (1986). *Planta*, 168, 175-182.
- Klosgen, R.B. y Weil, J.H. (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 225, 297- 304
- Li, B., Servaites, J.C. y Geiger, D.R. (1992). *Plant Physiol.*, 98, 1277-1284.
- Liu, X.J., Prat, S., Willmitzer, L. y Frommer, W.B. (1990) *Mol. Gen. Genet.*, 223, 401-406.
- Mita, S., Suzuki-Fujii, K. y Nakamura, K. (1995) *Plant Physiol.* 107,895-904.
- Mita, S., Murano, N. , Akaike, M. y Nakamura, K. (1997). *Plant J.*, 11, 841-851.
- Mould, R.M. y Gray, J.C. (1997a). In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, segunda edición, Volumen 2. (Cells, J.E. ed). Nueva York: Academic Press, págs. 81-86.
- Mould, R.M. y Gray, J.C. (1997b). In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, second edition, Volumen 2. (Cells, J.E. ed). Nueva York: Academic Press, pp. 286-292.
- Nakamura, K., Ohto, M., Yoshida, N. y Nakamura, K. (1991). *Plant Physiol.*, 96, 902-909.
- Neuhaus, H.E., Henrichs, G. y Schiebe, R. (1995). *Planta*, 194, 454-460.
- Newman, T. et al. (1994). *Plant Physiol.*, 106, 1241-1255.
- Nielson, T.H., Deiting, U. y Stitt, M. (1997). *Plant Physiol.*, 113, 503-510.
- Odell, J.T. Nagy, P. y Chua, N.H. (1985) *Nature*, 313, 810- 812.

- Peavey, D.G., Steup, M. y Gibbs, M. (1977). *Plant Physiol.*, 60, 305-308.
- Pwee, K-H. y Gray, J.C. (1993) *Plant J.* 3, 437-449.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. y Willmitzer, L. (1989) *EMBO*, 8, 23-29.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Publisher: Cold Spring Harbour.
- 5 Schatz, G. y Dobberstein, B. (1996). *Science*, 271, 1519-1526.
- Schnell, D.J. y Blobel, G. (1993). *J. Cell. Biol.*, 120, 103-Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B. y Steup, M. (1995). *Plant. Mol. Biol.*, 27, 567-576
- Sweetlove, L.J., Burrell, M.M. y ap Rees, T. (1996). *Biochem. J.*, 320, 493-498.
- Thomson, W.W. y Whatley, J.M. (1980) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 375-394.
- 10 van Engelen, F. A., Molthoff, J. W., Conner, A. J. , Nap, J-P., Pereira, A. y Stiekema, W. J. (1995). *Transgenic Res.* 4, 288- 290.
- van der Leij, F.R., Visser, R.G.F., Ponstein, A.S., Jacobsen, E. y Feenstra, W.J. (1991). *Mol. Gen. Genet.*, 228, 240-248.
- Wang, SM., Lue, WL. y Chen, J. (1996). *Plant Mol. Biol.*, 31, 975-982.
- Wang, SM., Lue, WL., Huang, HW. y Chen, J. (1997). *Plant Physiol.*, 113, 403-409.
- 15

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- (I) INFORMACIÓN GENERAL
- (i) SOLICITANTES:
- (A) NOMBRE: Advanced Technologies (Cambridge) Limited
- (B) CALLE: Globe House, 1 Water Street
- (C) CIUDAD: Londres
- (E) PAIS: Inglaterra
- (F) CÓDIGO POSTAL: WC2R 3 LA
- (ii) TTITULO DE LA INVENCIÓN: Una nueva secuencia de ácido nucleico dirigida a plastos, una nueva secuencia  $\beta$ -amilasa, un promotor sensible a estímulos y usos de los mismos
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA: British American Tobacco (Investments) Limited
- (A) DIRECCIÓN
- (B) CALLE: Regents Park Road
- (C) CIUDAD: Southampton
- (D) ESTADO: Hampshire
- (E) PAÍS: Inglaterra
- (F) CÓDIGO POSTAL: S015 8TL
- (v) FORMATO DE LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Diskette 3.50 inch
- (B) ORDENADOR: Viglen P5/75
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS Windows 95
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Microsoft Word 97
- (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUALES:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: Aún desconocida
- (C) CLASIFICACIÓN: Aún desconocida
- (viii) MANDATARIO/AGENTE
- INFORMACIÓN:
- (A) NOMBRE: Mrs. M.R. Walford/ Mr. K J.H. MacLean
- (C) REFERENCIA: RD-ATC-18
- (ix) TELECOMUNICACIÓN
- INFORMACIÓN:
- (A) TELÉFONO: 01703 777155
- (B) FAX: 01703 779856

ES 2 375 034 T3

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 294 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) NÚMERO DE CADENAS: Doble  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: de ADNc a ARNm
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Arabidopsis thaliana  
 (B) CEPA: Ecotipo Colombia  
 (F) TIPO DE TEJIDO: Hoja
- (vii) FUENTE INTERMEDIA:
- (A) BIBLIOTECA: ABRCDNA Stock Centre  
 (B) CLÓN: EST 81E10T7
- (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:
- (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: Cromosoma IV
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOMBRE: Péptido transitorio  
 (B) LOCALIZACIÓN: 37-291 pb
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1

1 TCATTTCTCATCATAACAAAGAGAGAGAAAAAACTATGGAATTGACACTGAATTCCTCG  
 M E L T L N S S 8

61 AGTTCTCTTATCAAACGTAAAGATGCCAAGAGTTCTAGAAACCAAGAAAGTTCCCTCCAAC  
 S S L I K R K D A K S S R N Q E S S S N 28

121 AACATGACCTTTGCGAAGATGAAGCCGCCAACATATCAGTTCCAAGCAAAGAACTCGGTT  
 N M T F A K M K P P T Y Q F Q A K N S V 48

181 AAGGAAATGAAGTTCACTCACGAGAAGACCTTCACGCCAGAAGGTGAAACCCTTGAGAAA  
 K E M K F T H E K T F T P E G E T L E K 68

241 TGGGAGAAGCTCCACGTTCTCTCATACCCACACTCCAAGAACGACGCTAGCGTT  
 W E K L H V L S Y P H S K N D A S V 85

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 1662 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) NUMERO DE CADENAS: Doble  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: de ADNc a ARNm

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Arabidopsis thaliana  
 (B) CEPA: Ecotipo Colombia  
 (F) TIPO DE TEJIDO: Hoja

(vii) FUENTE INTERMEDIA:

(A) BIBLIOTECA: ABRCDNA Stock Centre  
 (B) CLÓN: EST 81E10T7

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: Cromosoma IV

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE: Secuencia codificante  
 (B) LOCALIZACIÓN: 1-1393 pbs  
 (D) OTRA INFORMACIÓN: Péptido maduro

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2

1 GTTCCGGTGTTCGTCATGTTACCGCTCGACACAGTAACAATGTCAGGGCATTGGAACAAA  
 V P V F V M L P L D T V T M S G H L N K 20

61 CCACGAGCCATGAACGCTAGTTTGATGGCTCTGAAAGGAGCTGGTGTGGAAGGTGTGATG  
 P R A M N A S L M A L K G A G V E G V M 40

121 GTGGATGCTTGGTGGGGATTGGTGGAGAAAGATGGACCTATGAATTATAACTGGGAAGGC  
 V D A W W G L V E K D G P M N Y N W E G 60

181 TATGCCGAGCTTATACAGATGGTTCAAAGCACGGTCTCAAACCTCCAGGTCGTTATGTCA  
 Y A E L I Q M V Q K H G L K L Q V V M S 80

241 TTCCATCAATGTGGAGGAAACGTAGGAGACTCTTGCAGTATCCCCTTGCCCTCCATGGGTG  
 F H Q C G G N V G D S C S I P L P P W V 100

301 CTTGAAGAGATCAGCAAGAACCCTGATCTTGTCTACACAGACAAATCTGGGAGAAGGAAC  
 L E E I S K N P D L V Y T D K S G R R N 120

361 CCTGAATATATCTCCTTGGGATGTGATTCTGTGCCTGTCCTAAGAGGAAGAACACCTATC  
 P E Y I S L G C D S V P V L R G R T P I 140

421 CAGGTCTACTCAGATTTTCATGAGGAGCTTCCGTGAACGATTTGAAGGCTACATAGGAGGA  
 Q V Y S D F M R S F R E R F E G Y I G G 160

481 GTTATTGCGGAAATTCAAGTAGGAATGGGACCTTGTGGAGAATTGAGATACCCATCATAC  
 V I A E I Q V G M G P C G E L R Y P S Y 180  
 541 CCTGAAAGCAACGGGACCTGGAGATTCCCCGGAATTGGAGAGTTCCAGTGCTACGACAAG  
 P E S N G T W R F P G I G E F Q C Y D K 200  
 601 TATATGAAATCGTCACTTCAGGCATATGCTGAATCAATTGGGAAAACCTAACTGGGGAACA  
 Y M K S S L Q A Y A E S I G K T N W G T 220  
 661 AGCGGACCTCATGATGCCGCGAGTACAAGAACCTCCAGAAGATACTGAATTTTTTCAGG  
 S G P H D A G E Y K N L P E D T E F F R 240  
 721 AGAGACGGAACATGGAATAGCGAGTATGGAAAGTTTTTCATGGAATGGTACTCCGGGAAG  
 R D G T W N S E Y G K F F M E W Y S G K 260  
 781 CTGCTAGAACATGGAGACCAACTCCTATCTTCAGCGAAAGGTATCTTTCAAGGAAGCGGA  
 L L E H G D Q L L S S A K G I F Q G S G 280  
 841 GCAAAGCTATCAGGAAAGGTAGCTGGAATTCCTGGCACTACAACACCAGGTACACGCA  
 A K L S G K V A G I H W H Y N T R S H A 300  
 901 GCTGAGCTAACCGCTGGATATTACAACACAAGAAACCATGACGGGTATCTGCCAATAGCT  
 A E L T A G Y Y N T R N H D G Y L P I A 320  
 961 AAGATGTTCAACAAACATGGAGTTGTGCTCAACTTCACCTGCATGGAGATGAAAGACGGG  
 K M F N K H G V V L N F T C M E M K D G 360  
 1021 GAGCAACCTGAGCACGCGAATTGCTCACCAGAAGGTCTGGTCAAGCAAGTACAGAACCGG  
 E Q P E H A N C S P E G L V K Q V Q N A 380  
 1081 ACAAGGCAGGCCGGAACCGAAGTAGCAGGGGAGAACGCGCTAGAACGATATGACTCGAGC  
 T R Q A G T E L A G E N A L E R Y D S S 400  
 1141 GCATTCGGACAAGTGGTAGCAACAAATAGGTGAGATTCTGGAAATGGGTTAACCGCATTT  
 A F G Q V V A T N R S D S G N G L T A F 420  
 1201 ACTTACCTAAGAATGAACAAGCGGTTATTTGAGGGTCAAAATGGCAGCAGTTAGTGGAG  
 T Y L R M N K R L F E G Q N W Q Q L V E 440  
 1261 TTTGTTAAGAACATGAAGGAAGGTGGTCATGGGAGGAGACTCTCAAAGAAGACACAACCT  
 F V K N M K E G G H G R R L S K E D T T 460  
 1321 GGAAGTGACCTTTATGTTGGATTGTCAAAGGCAAGATCGCTGAGAATGTGGAGGAGGCT  
 G S D L Y V G F V K G K I A E N V E E A 480  
 1381 GCTTTAGTGTAATTTCCACATAGGTACATACATATAGTGTGGTGT'TTATTGTATTCCCTG  
 A L V - 483  
 1441 TCTGATAAATAACTAGAGAGATCAAACCAGTAAGAGTGT'TAAAGCTATAGATTTGCACAA  
 1501 TTCTGGGTCAGAGTCAGAGCAAGGAGAAGCAAATCAAGATGATGTACACTTAGATGTAT  
 1561 CCTATGAGTTTTCTTGTACATCATCTTCACTCTTAATCTCAAATACTATGCATTTTT  
 1621 CTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCGCTCTAGAGGATCC

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 1953 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) NÚMERO DE CADENAS: Doble  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: de ADNc a ARNm

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Arabidopsis thaliana  
 (B) CEPA: Ecotipo Colombia  
 (F) TIPO DE TEJIDO: Hoja

(vii) FUENTE INTERMEDIA:

(A) BIBLIOTECA: ABRCDNA Stock Centre  
 (B) CLÓN: EST 81E10T7

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO: Cromosoma IV

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE: CDS  
 (B) LOCALIZACIÓN: 37-1683 pb  
 (C) OTRA INFORMACIÓN: dirigida a Cloroplastos

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 3

1 TCATTTCTCATCATAACAAAGAGAGAGAAAAAACTATGGAATTGACACTGAATTCCTCG  
 M E L T L N S S 8

61 AGTTCTCTTATCAAACGTAAAGATGCCAAGAGTTCTAGAAACCAAGAAAGTTCCCTCCAAC  
 S S L I K R K D A K S S R N Q E S S S N 28

121 AACATGACCTTTGCGAAGATGAAGCCGCCAACATATCAGTTCCAAGCAAAGAACTCGGTT  
 N M T F A K M K P P T Y Q F Q A K N S V 48

181 AAGGAAATGAAGTTCACTCACGAGAAGACCTTCACGCCAGAAGGTGAAACCCTTGAGAAA  
 K E M K F T H E K T F T P E G E T L E K 68

241 TGGGAGAAGCTCCACGTTCTCTCATACCCACACTCCAAGAACGACGCTAGCGTTCCGGTG  
 W E K L H V L S Y P H S K N D A S V P V 88

301 TTCGTCATGTTACCGCTCGACACAGTAACAATGTCAGGGCATTGAAACAAACCACGAGCC  
 F V M L P L D T V T M S G H L N K P R A 108

361 ATGAACGCTAGTTTGATGGCTCTGAAAGGAGCTGGTGTGGAAGGTGTGATGGTGGATGCT  
 M N A S L M A L K G A G V E G V M V D A 128

421 TGGTGGGGATTGGTGGAGAAAGATGGACCTATGAATTATAACTGGGAAGGCTATGCCGAG  
 W W G L V E K D G P M N Y N W E G Y A E 148

481 CTTATACAGATGGTTCAAAGCACGGTCTCAAACCTCCAGGTCGTTATGTCATTCCATCAA  
 L I Q M V Q K H G L K L Q V V M S F H Q 168  
 541 TGTGGAGGAAACGTAGGAGACTCTTGCAGTATCCCCTTGCCTCCATGGGTGCTTGAAGAG  
 C G G N V G D S C S I P L P P W V L E E 188  
 601 ATCAGCAAGAACCCTGATCTTGTCTACACAGACAAATCTGGGAGAAGGAACCCTGAATAT  
 I S K N P D L V Y T D K S G R R N P E Y 208  
 661 ATCTCCTTGGGATGTGATTCTGTGCCTGTCTAAGAGGAAGAACACCTATCCAGGCTCTAC  
 I S L G C D S V P V L R G R T P I Q V Y 228  
 721 TCAGATTTTCATGAGGAGCTTCCGTGAACGATTTGAAGGCTACATAGGAGGAGTTATTGCC  
 S D F M R S F R E R F E G Y I G G V I A 248  
 781 GAAATTCAGTAGGAATGGGACCTTGTGGAGAATTGAGATACCCATCATAACCTGAAAAGC  
 E I Q V G M G P C G E L R Y P S Y P E S 268  
 841 AACGGGACCTGGAGATTCCCCGGAATTGGAGAGTTCCAGTGCTACGACAAGTATATGAAA  
 N G T W R F P G I G E F Q C Y D K Y M K 288  
 901 TCGTCACTTCAGGCATATGCTGAATCAATTGGGAAAACCTAAGTGGGGAACAAGCGGACCT  
 S S L Q A Y A E S I G K T N W G T S G P 308  
 961 CATGATGCCGCGAGTACAAGAACCCTCCAGAAGATACTGAATTTTTTCAGGAGAGACCGGA  
 H D A G E Y K N L P E D T E F F R R D G 328  
 1021 ACATGGAATAGCGAGTATGGAAAGTTTTTCATGGAATGGTACTCCGGGAAGCTGCTAGAA  
 T W N S E Y G K F F M E W Y S G K L L E 348  
 1081 CATGGAGACCAACTCCTATCTTCAGCGAAAGGTATCTTTCAAGGAAGCGGAGCAAAGCTA  
 H G D Q L L S S A K G I F Q G S G A K L 368  
 1141 TCAGGAAAGGTAGCTGGAATTCACTGGCACTACAACACCAGGTCACACGCAGCTGAGCTA  
 S G K V A G I H W H Y N T R S H A A E L 388  
 1201 ACCGCTGGATATTACAACACAAGAAACCATGACGGGTATCTGCCAATAGCTAAGATGTTTC  
 T A G Y Y N T R N H D G Y L P I A K M F 408  
 1261 AACAAACATGGAGTTGTGCTCAACTTCACCTGCATGGAGATGAAAGACGGGGAGCAACCT  
 N K H G V V L N F T C M E M K D G E Q P 428  
 1321 GAGCACGCGAATTGCTCACCAGAAGGTCTGGTCAAGCAAGTACAGAACGCGACAAGGCAG  
 E H A N C S P E G L V K Q V Q N A T R Q 448  
 1381 GCCGGAACCGAACTAGCAGGGGAGAACGCGCTAGAACGATATGACTCGAGCGCATTCCGGA  
 A G T E L A G E N A L E R Y D S S A F G 468  
 1441 CAAGTGGTAGCAACAAATAGGTCAGATTCTGGAAATGGGTTAACCGCATTACTTACCTA  
 Q V V A T N R S D S G N G L T A F T Y L 488  
 1501 AGAATGAACAAGCGGTTATTTGAGGGTCAAATTTGGCAGCAGTTAGTGGAGTTTGTTAAG  
 R M N K R L F E G Q N W Q Q L V E F V K 508  
 1561 AACATGAAGGAAGGTGGTTCATGGGAGGAGACTCTCAAAGAAGACACAACCTGGAAGTGAC  
 N M K E G G H G R R L S K E D T T G S D 528

1621 CTTTATGTTGGATTTGTCAAAGGCAAGATCGCTGAGAATGTGGAGGAGGCTGCTTTAGTG  
 L Y V G F V K G K I A E N V E E A A L V 548

1681 TAATTTCCCACATAGGTACATACATATAGTGTGGTGTATTATGTTATTCCTGTCTGATAAA

1741 TAACTAGAGAGATCAAACCAGTAAGAGTGTTAAAGCTATAGATTTGCACAATTCTGGGTC

1801 AGAGTCAGAGCAAAGAGAAGCAAATCAAGATGATGTACACTTAGATGTATCCTATGAGT

1861 TTTCCCTGTACATCATCTTCATACTCTTAATCTCAAATACTATGCATTTTTCTCCAAAAA

1921 AAAAAAAAAAAGGGCGGCCGCTCTAGAGGATCC

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 4
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- |                        |               |
|------------------------|---------------|
| (A) LONGITUD:          | 21 pbs        |
| (B) TIPO:              | Nucleótido    |
| (C) NÚMERO DE CADENAS: | Monocatenaria |
| (D) TOPOLOGÍA:         | Lineal        |
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 4

AATTCCTCGA GTTCTCTTAT C

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 5
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 21 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) NÚMERO DE CADENAS: Monocatenaria  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5
- GGGGATCCCT GACATTGTTA C 21

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 6
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 35 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) TIPO DE CADENA: Monocatenaria  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 6
- GCTGGTAC<sup>6</sup>CTGCAGGATC CGGTCCGGAA TTCCC 35

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 7
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 35 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) NUMERO DE CADENAS: Monocatenaria  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7
- GGGAATTCCG GACCGGATCC TGCAGGCGTA CCAGC 35

INFORMACIÓN DE SECUENCIA PARA LA SEC ID Nº: 8

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 1652 pbs  
 (B) TIPO: Nucleótido  
 (C) NÚMERO DE CADENAS: Bicatenaria  
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: AND Genómico
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Arabidopsis thaliana  
 (B) CEPA: Ecotipo Colombia  
 (F) TIPO DE TEJIDO: Hoja
- (vii) FUENTE INTERMEDIA:
- (A) BIBLIOTECA: EU Arabidopsis Genome Project  
 (B) CLÓN: Cósmodo G16599
- (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:
- (A) CROMOSOMA/SEGMENTO: Cromosoma IV
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOMBRE: Promotor  
 (B) LOCALIZACIÓN: 17534-19185 pb de G16599  
 Cadena complementaria
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8
- 1 AAGCTTGTGT CTATTTCAA TTCTTGACCG TAGATGTCAC AACATGCATA
- 51 TATCATTGAA AACAGAGCAA CACAGGAAAC CAAGCATATG TATCTAGATA
- 101 TACTTAGCAA GACATAACTA TAGTCTTTGA ATCAACATAG GGATTAATGA
- 151 TAGAGAATGA GGAAGCTCAA GATTTTATAC TCAGTTTCTT ACAAACAAA
- 201 TTTCTCTCTA ACTGCAAAA CACCAATTAG GATTTGAAGA GCGTACCTGT
- 251 TTGAGTCAAT GTCCAATGTC GTCCCCCGC CTTCTACATT TCTTAGCCTG
- 301 CTGAATAAAA GCACAAGCCA AAATGAGAAG GTGCCAAAGG CGATAAGGAT
- 351 CAATTTCTAC CATTCAAAA ACTAATGGTG AGAATTAGAA ACGAGAGAAA
- 401 ACTACTTGTT GAGGAAATAG CCAAAGCGC AATCTTCGTC ACCTGAATAA
- 451 AGACCAAACC GTCAC'TTTCA ATGAGTCAGC AAGAAAAGA GAGAGAGAGA
- 501 GAGAGAGATT CTCTATAACA TTTGAGTCGA CATGGATTCT AATGCATCAA

ES 2 375 034 T3

551 AAGTCATCTC CAATAAACAA ACACTTGAAA CTCACATGGC TAATAGAACA  
 601 AGATCAAAGC CTTAAGTATT AAGCATTACA GACACTACTG GCTAACTTTT  
 651 GACACATGTT CTTAAGTAAC ATAGTATCAA TATCCGTGAA TCACATCGAA  
 701 CACACACAAC AAGGGCTTAA TGCATCAAAG TCCTGTTATT TCCATATAAC  
 751 AACATATTTT ATTTACAAAC AGAATGCAGC ATTCAGGCAG TCCAAATGGA  
 801 AAGGTTGACA AAAAAATATA ATCTTGTAAC TCTACATATA TGGCAGAATG  
 851 TAATAACCAG GCAAGAAAAA AACAGAATAA ACAGATCAAT GAGTATGATA  
 901 TAAAAAAAAG TCACAAAGAA TGTGCCACAG TGAACAAGAG GGCCATGAGA  
 951 AGAAATTTTC AAAGAAAATA TTAGCATTGT TAGAATTTTT TGGGTCAATG  
 1001 GATCTGTCAG CTGCTTAGTT GGAAAACACA AATCTTACAG GAAGGAAAGT  
 1051 CCAAGAAAAA GAAAATAAGC AAAGTTAATA GCCACCACAA GAAATTTTCAT  
 1101 ACAGAAATAA TTAAATCGTT GCACTTATCT TCTTATTCAA ACTAAAATCA  
 1151 AGAGAACTTA ATAATTTTCA GCCACACGAA CCATGTGTTC AAAGCCAAAG  
 1201 GTGAGAAGCC AAAATTATCA GCTTATCTCC ATTAACAAGG GAAAAGCAAG  
 1251 ACTAGATTTA AGAGTTCTCT GTAACTAAA ACTGCAGGAG TGAGTAAGTA  
 1301 AATAATTAC CAACAGGAAA ACAAACTCA ATTATCTATA GCTGAATACA  
 1351 CATGTAAATG AGAATTTATT AACTAAAACA TCTTCCTTTG TAACTGATGT  
 1401 GACATTTACA ATTTTTCATT TTGAGGTGTA AGAACCGTGT GACAAGTGAA  
 1451 AAGGTTAAAA TAAGCAACCT TTGTGATATT TTCTCTCCAC TTTTGAAT  
 1501 TGGGTCTCCA AACCACAGCC AATCAATATT CTTTATAAAT ACAAACACAC  
 1551 AAACAGCATC TTTCTCTCAA ACACAAACAT ATCTTCTATC AAACACCAAC  
 1601 AGCTCTATTC TCTACCTCAT TTCTCATCAT AACAAAGAGA GAGAAAAAAA  
 1651 CT

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar o disminuir la actividad de la  $\beta$ -amilasa en una planta, comprendiendo el método las etapas de incorporar, de manera estable, en el genoma de una planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dirigida a plastos, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico la secuencia conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 1 y que tiene 1-294 nucleótidos y que codifica una secuencia capaz de dirigir una proteína a un plasto de una planta o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección y una secuencia codificante de  $\beta$ -amilasa y que regenera una planta que tiene un genoma modificado.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia codificante es la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 2, que es una secuencia codificante de  $\beta$ -amilasa.
3. Un método para aumentar o disminuir la actividad de la  $\beta$ -amilasa en una planta, comprendiendo el método las etapas de incorporar, de manera estable, en el genoma de una planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico la secuencia conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 3 y que tiene 1-1953 nucleótidos y que codifica una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 3 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 3 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos y que regenera una planta que tiene un genoma modificado.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enzima es la  $\beta$ -amilasa no plastidial.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho gen quimérico comprende adicionalmente la secuencia codificante de una enzima del grupo que consiste en sacarosa sintasa, ADPG pirofosforilasa, almidón sintasa, enzima ramificadora,  $\alpha$ -amilasa, isoamilasa,  $\beta$ -amilasa no plastidial,  $\alpha$ -glucosidasa, almidón fosforilasa y enzima desproporcionante.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho gen quimérico comprende adicionalmente un promotor, siendo dicho promotor una secuencia de ácido nucleico conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 8 o que tiene al menos una homología de un 65% con la misma y que tiene sustancialmente la misma función que esta y siendo dicha secuencia de ácido nucleico sensible a estímulos, siendo el nivel de expresión de dicho producto variable en respuesta al estímulo aplicado a dicha secuencia de ácido nucleico.
7. Un método para dirigir proteínas o enzimas a un plasto de una planta, comprendiendo el método las etapas de incorporar, de manera estable, en el genoma de una planta, un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dirigida a un plasto y una secuencia codificante de una proteína o una enzima y que regenera una planta que tiene un genoma modificado, siendo la proteína o enzima una o más en la rutas del siguiente grupo: síntesis de lípidos, fotosíntesis, metabolismo de aminoácidos, fijación de nitrógeno, fijación de carbono o síntesis de polímeros de hidratos de carbono o que es capaz de conferir una característica a la planta, siendo la secuencia de ácido nucleico la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1 o teniendo la secuencias una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicha característica se selecciona de uno o más de los siguientes grupos: resistencia a herbicidas y resistencia a plagas.
9. Una secuencia de ácido nucleico conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 1 y que tiene 1-294 nucleótidos y que codifica una secuencia capaz de dirigir una proteína a un plasto de una planta o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la SEC ID N°: 1 y que se hibrida con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifica una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección.
10. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha secuencia codifica 85 restos de aminoácidos.
11. Una secuencia de ácido nucleico conocida, en la presente memoria, como SEC ID N°: 3 y que tiene 1-1953 nucleótidos y que codifica una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% o más con la secuencia descrita en la SEC ID N°: 3 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 3 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una  $\beta$ -amilasa dirigida a cloroplastos.
12. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que dicha secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ARNm, ADNc o ADN genómico.

- 5 13. Un método de modificación en una planta transgénica, cuya planta ya presenta un aumento o disminución de una actividad enzimática en la ruta biosintética del almidón como resultado de transformación genética, una enzima adicional para regular positiva o negativamente dicha enzima adicional y por lo tanto aumentar o disminuir la cantidad de almidón producido por la planta retransformada, siendo dicha enzima adicional una  $\beta$ -amilasa dirigida a plastos que se codifica por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 1 o secuencias que tienen una homología de al menos un 65% con la SEC ID N°: 1 y que se hibridan con dicha SEC ID N°: 1 en condiciones de medio rigurosas y que codifican una secuencia que tiene la misma capacidad de dirección.
- 10 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 2 codifica dicha  $\beta$ -amilasa dirigida a plastos.
- 15 15. un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha primera planta transformada es una planta de patata transgénica transformada con el gen de adenosina difosfoglucosa fosforilasa (ADPG-PPAsa).
- 20 16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 7, en el que dicho gen quimérico comprende adicionalmente un promotor seleccionado del grupo que consiste en el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (completo o truncado), el promotor de rubisco, el promotor de plastocianina del guisante, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de unión a clorofila a/b, el promotor de glutenina de alto peso molecular, el promotor de  $\alpha,\beta$ -gliadina, el promotor de hordeína y el promotor de patatina.
- 25 17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 7, en el que dicha secuencia codificante de dicha enzima en dicho gen quimérico proporciona regulación positiva o negativa de la actividad de dicha enzima.
- 30 18. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.
- 35 19. Un gen quimérico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia dirigida a plastos de acuerdo con la reivindicación 9 y un ácido nucleico que codifica la secuencia de una enzima en la ruta degradativa del almidón, codificándose la enzima por la secuencia de acuerdo con la SEC ID N°: 2.
20. Células vegetales que comprenden la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 9, 11 ó 12.
21. Semilla de la planta transformada que contiene una o más de la secuencias de ácido nucleico de la reivindicación 9 o de la reivindicación 11.
22. Plantas que comprenden células vegetales de acuerdo con la reivindicación 20.
23. Plantas de acuerdo con la reivindicación 22, en la que dichas plantas son una o más del grupo que consiste en patata, trigo, maíz, cebada, tomate, arroz, guisante, soja, cacahuete, yuca, ñame, banana y tabaco.

Fig.1.



Fig.2(a).

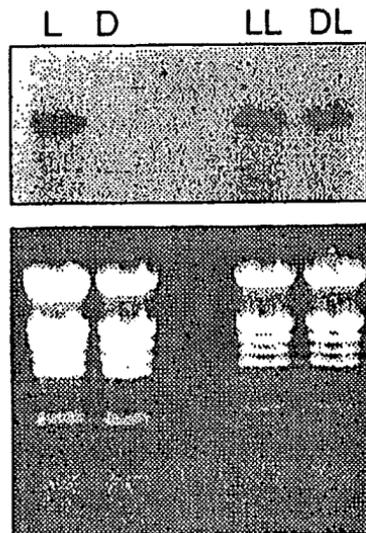


Fig.2(b).

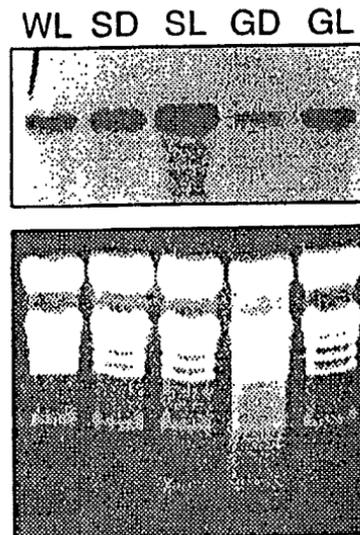


Fig.3.

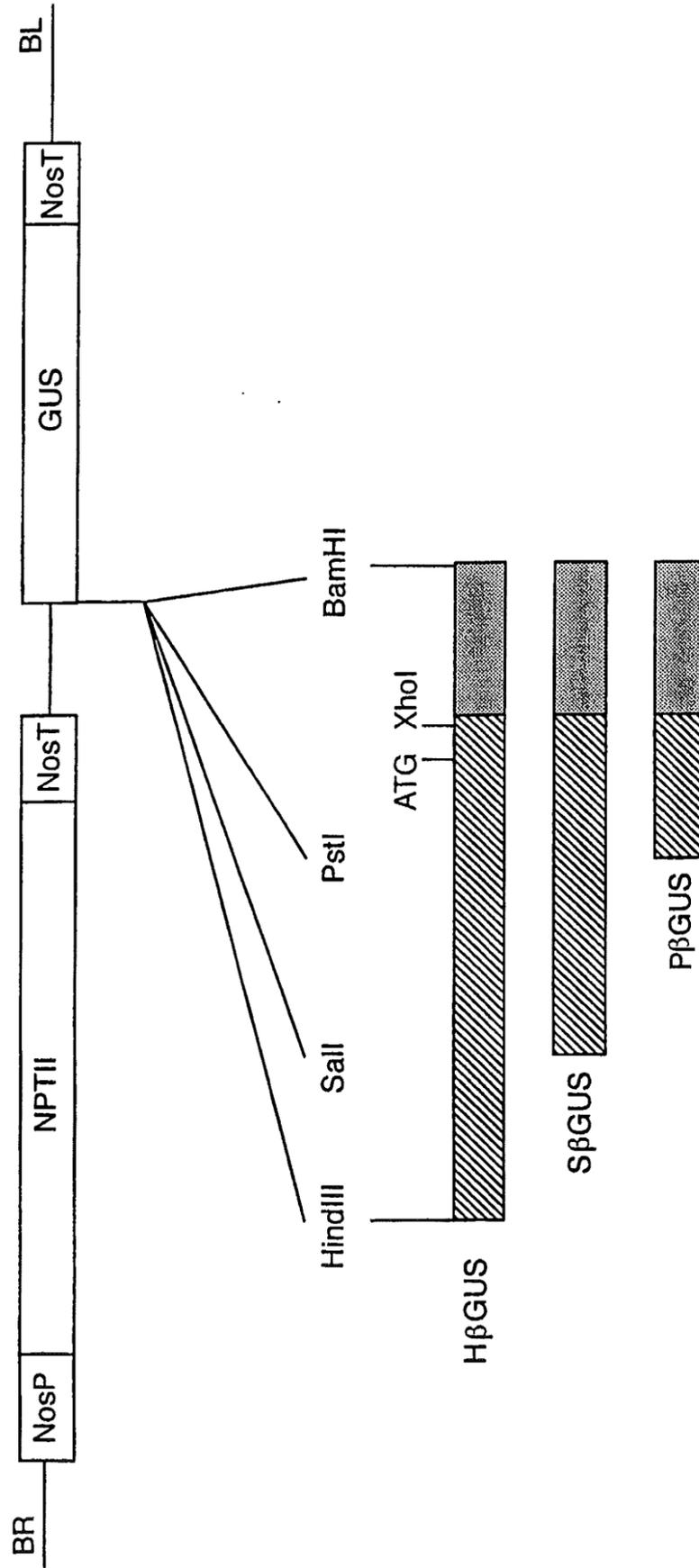


Fig.4.

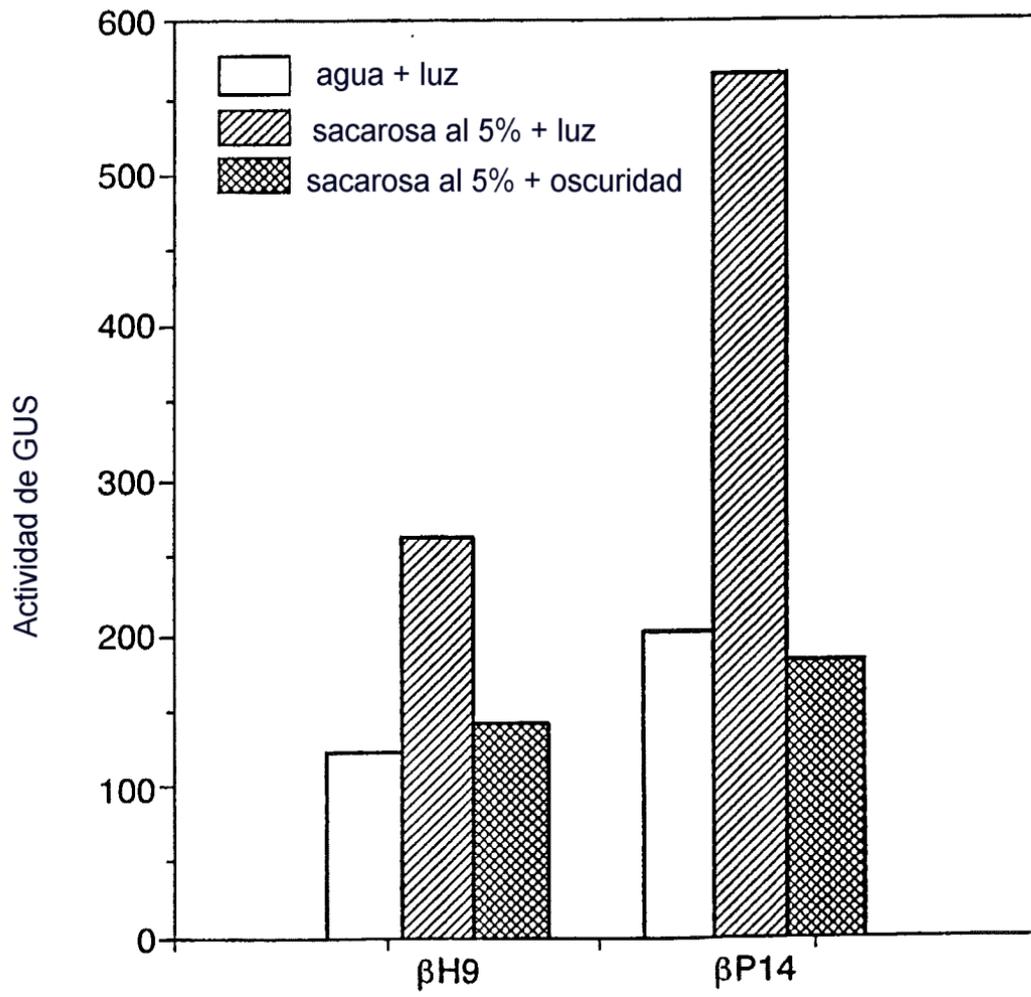


Fig.5.

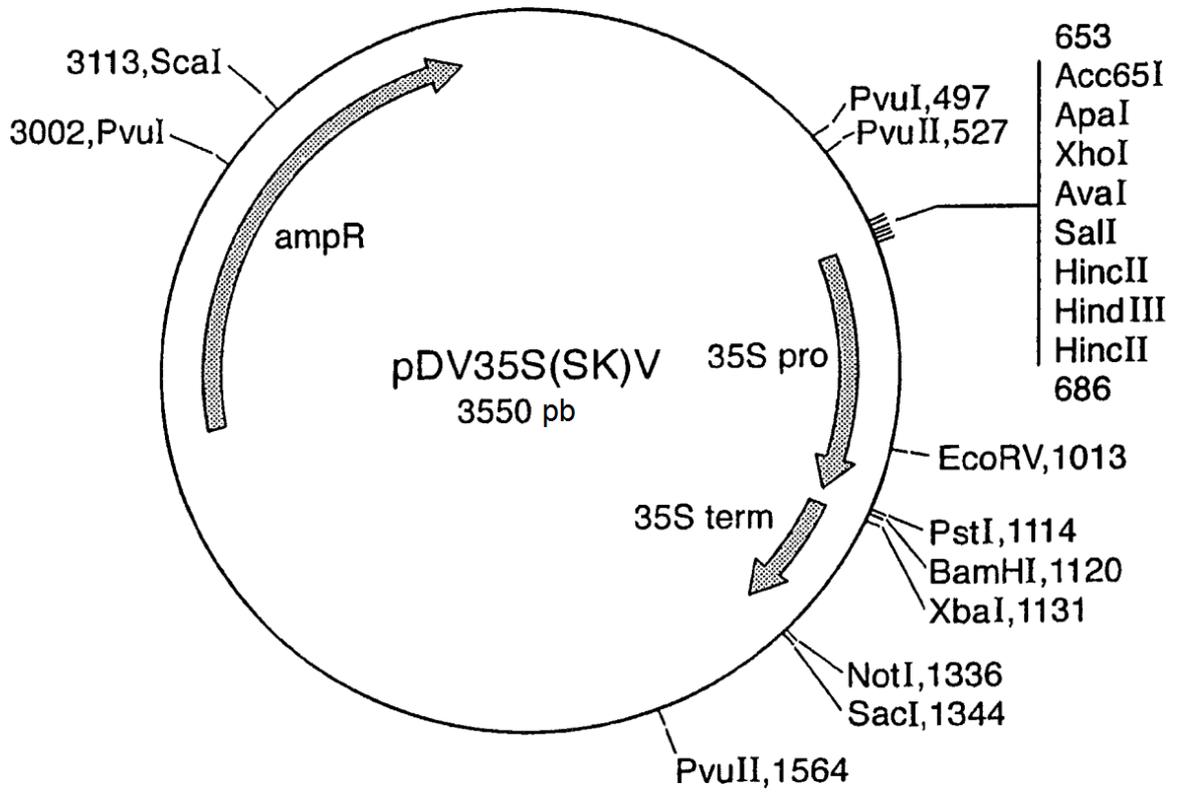


Fig.6.

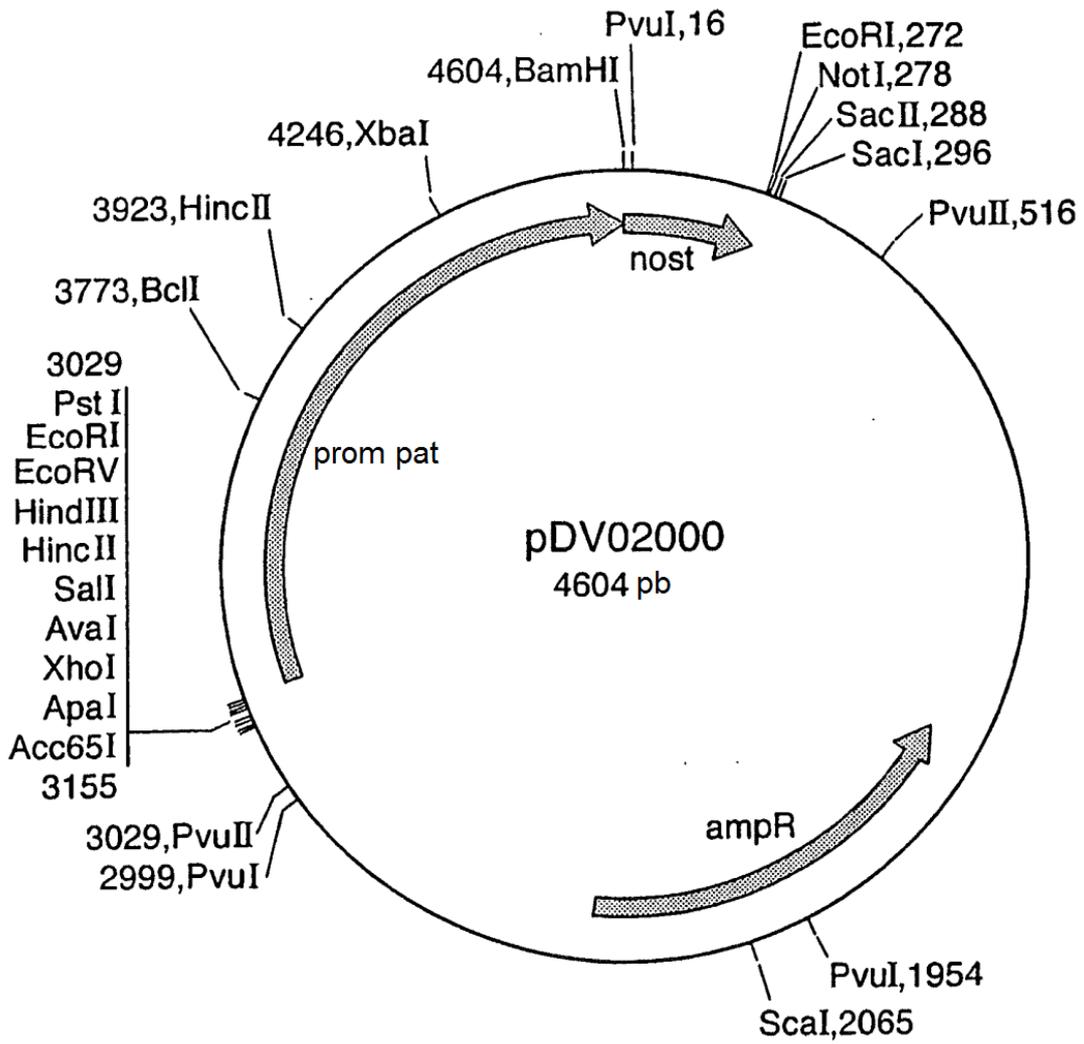


Fig.7.

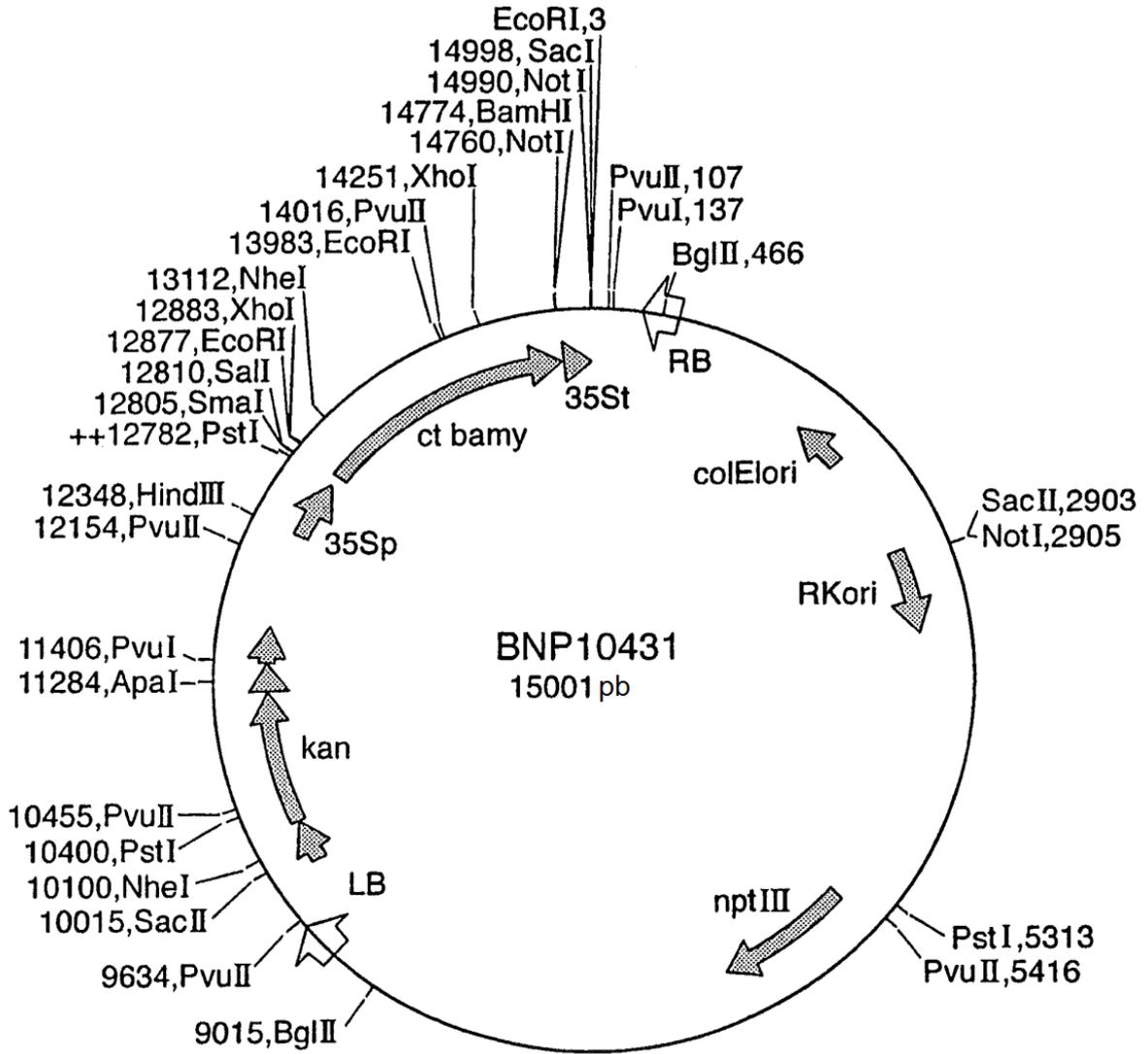


Fig.8.

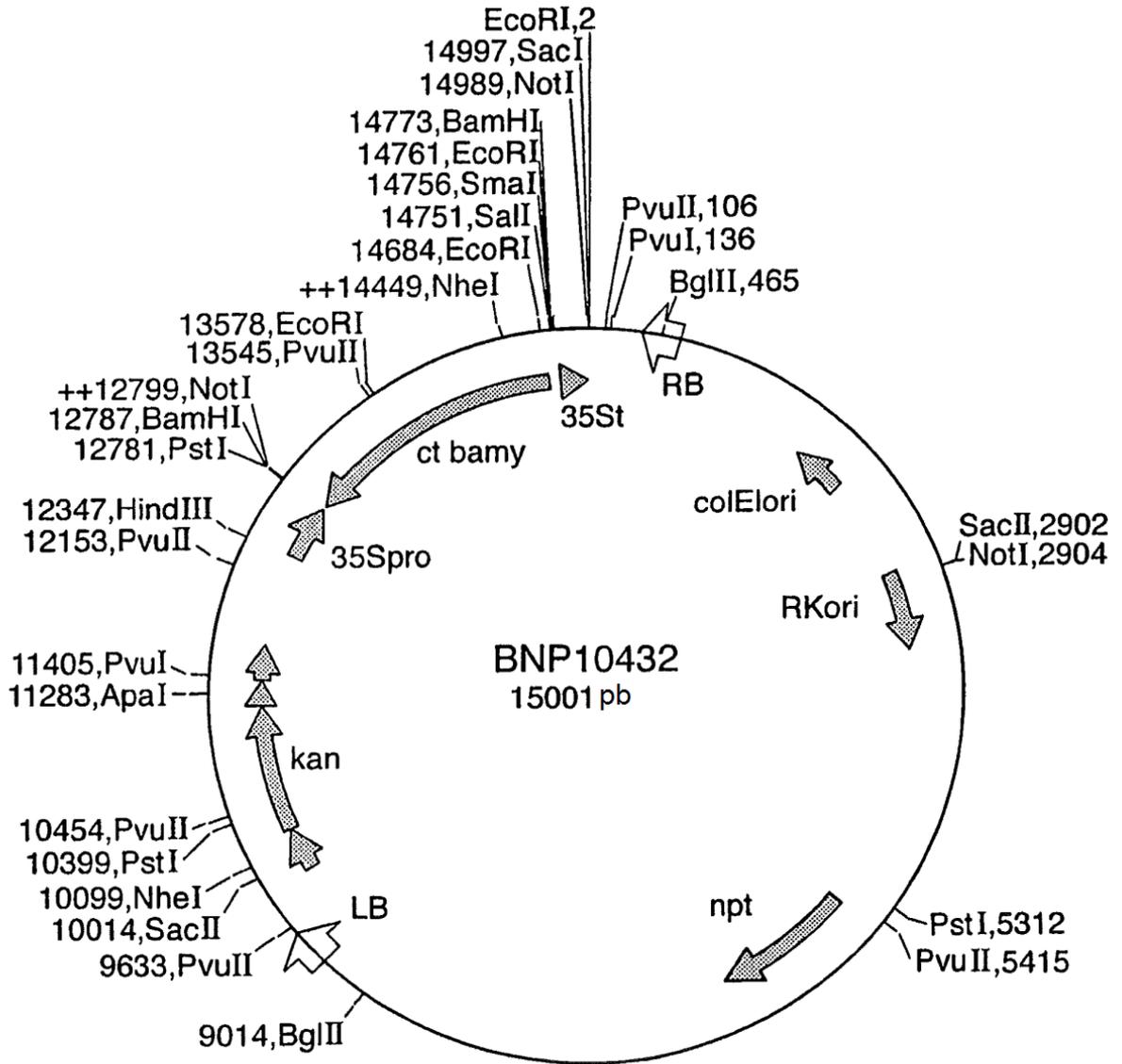


Fig.9.

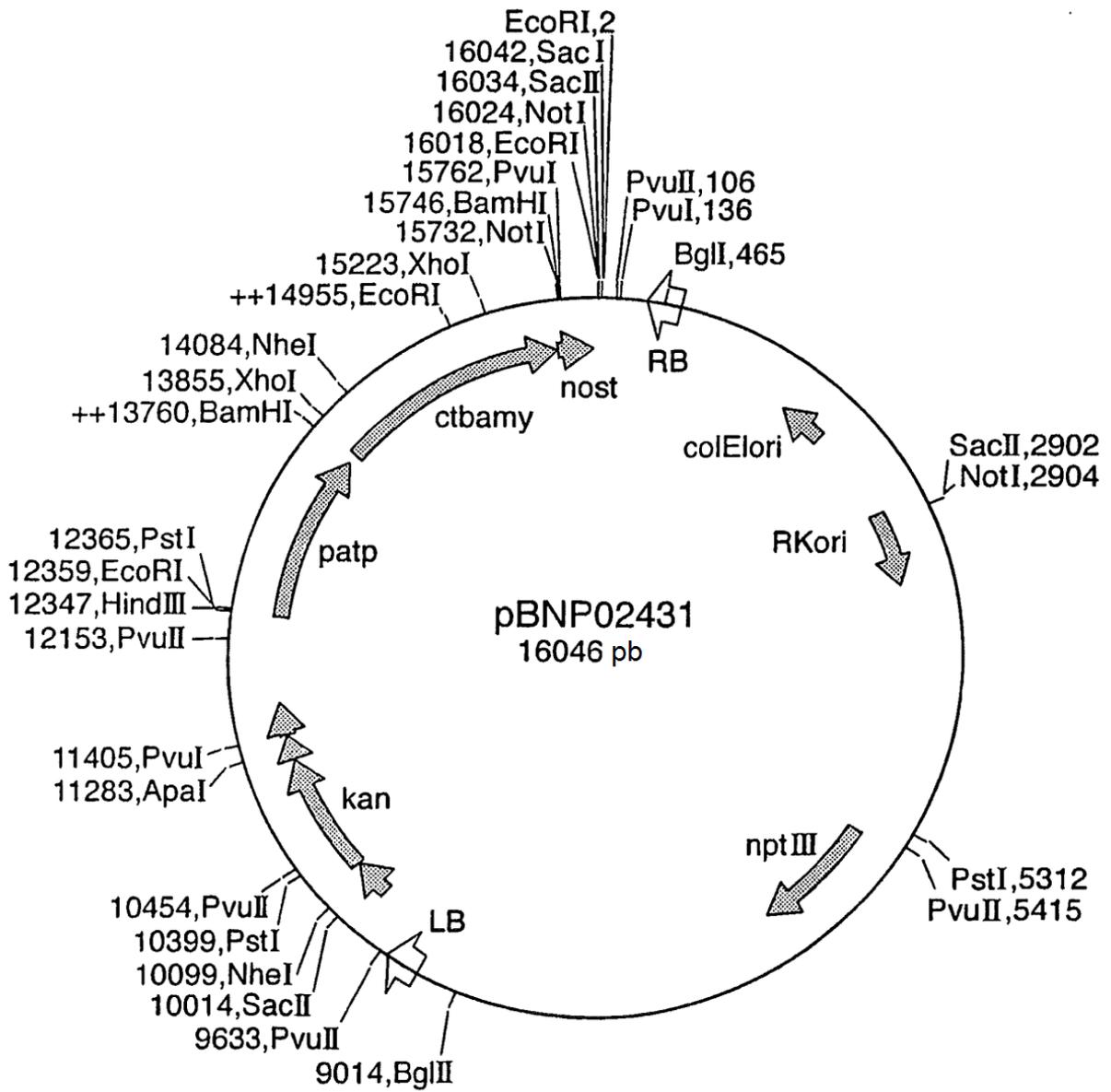


Fig.10.

