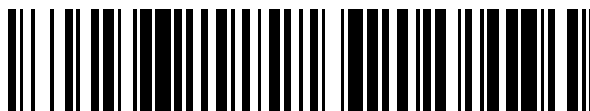


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 712**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/29** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2006 E 06790424 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1945768**

54 Título: **Modificación de la biosíntesis de flavonoides en plantas**

30 Prioridad:

**26.10.2005 AU 2005905942**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.08.2013**

73 Titular/es:

**AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD  
(100.0%)  
475 MICKLEHAM ROAD  
ATTWOOD VICTORIA 3049, AU**

72 Inventor/es:

**MOURADOV, AIDYN y  
SPANGENBERG, GERMAN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 416 712 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

Modificación de la biosíntesis de flavonoides en plantas

5 La presente invención se refiere de manera general a fragmentos de ácido nucleico y a sus secuencias de aminoácidos codificadas para enzimas para la biosíntesis de flavonoides en plantas, y al uso de los mismos para la modificación de la biosíntesis de flavonoides en plantas.

10 Los flavonoides constituyen una familia relativamente diversa de moléculas aromáticas que se derivan de fenilalanina y malonil-coenzima A (CoA, mediante la ruta de ácidos grasos). Estos compuestos incluyen seis subgrupos principales que se encuentran en la mayoría de las plantas superiores: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas y las taninas condensadas (o proantocianidinas). Un séptimo grupo, las auronas, está ampliamente extendido, pero no es ubicuo.

15 Algunas especies vegetales también sintetizan formas especializadas de flavonoides, tales como los isoflavonoides que se encuentran en legumbres y un pequeño número de plantas no leguminosas. De manera similar, el sorgo y el maíz están entre las pocas especies que se sabe que sintetizan 3-desoxiantocianinas (o flobafenos en la forma polimerizada). Los estilbenos, que están estrechamente relacionados con los flavonoides, se sintetizan por otro grupo de especies no relacionadas que incluye la uva, el cacahuete y el pino.

Además de proporcionar pigmentación a flores, frutas, semillas y hojas, los flavonoides también tienen papeles clave en la señalización entre plantas y microbios, en la fertilidad de machos de algunas especies, en la defensa como agentes antimicrobianos y agentes disuasorios de la alimentación, y en la protección frente a UV.

20 Los flavonoides también tienen actividades significativas cuando los ingieren animales, y hay un gran interés en sus posibles beneficios para la salud, particularmente para compuestos tales como isoflavonoides, que se han asociado con beneficios anticancerígenos, y estilbenos que se cree que contribuyen a una reducción de la cardiopatía.

25 Las rutas de ramificación principales de la biosíntesis de flavonoides comienzan con el metabolismo general de fenilpropanoides y conducen a los nueve subgrupos principales: las chalconas incoloras, las auronas, los isoflavonoides, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, las taninas condensadas y los pigmentos de flobafeno. La enzima fenilalanina amoniaco liasa (PAL) de la ruta general de fenilpropanoides conducirá a la producción de ácido cinámico. La cinamato-4-hidroxilasa (C4H) producirá ácido p-cumárico que se convertirá, mediante la acción de la 4-cumaroil:CoA-ligasa (4CL), en la producción de 4-cumaroil-CoA y malonil-CoA.

30 En la ruta de fenilpropanoides, la chalcona sintasa (CHS) usa malonil CoA y 4-cumaril CoA como sustratos. La chalcona reductasa (CHR) equilibra la producción de 5-hidroxilo o 5-desoxiflavonoides. La siguiente enzima, la chalcona isomerasa (CHI), cataliza el cierre de anillo para formar una flavanona, pero la reacción también puede producirse de manera espontánea. Enzimas adicionales en la ruta son: flavanona 3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) y flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H).

35 En la ramificación de la ruta de fenilpropanoides que es específica para la producción de taninas condensadas y antocianinas, pueden reducirse leucoantocianidinas para dar catequinas mediante leucoantocianidina reductasa (LAR) o para dar antocianidinas mediante leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX). Las antocianidinas pueden convertirse en antocianinas mediante la adición de grupos azúcar, o en epicatequinas mediante antocianidina reductasa (ANR), codificada por el gen *banyuls*. Las catequinas y epicatequinas son las subunidades de taninas condensadas (CT), que se piensa que en *Arabidopsis* se transportan en la vacuola mediante una proteína de tipo transportador secundario de múltiples fármacos, testa transparente 12 (TT12), y se polimerizan mediante un mecanismo desconocido.

40 Se ha encontrado que las enzimas en la ruta de flavonoides se controlan mediante una gama de factores de transcripción en *Arabidopsis*, maíz y petunia. En *Arabidopsis*, la biosíntesis de taninas condensadas requiere la función de testa transparente 2 (TT2), un factor de la familia de myb, testa transparente 8 (TT8), un factor de la familia de myc y testa transparente glabra 1 (TTG1), un factor de la familia de WD40, entre otros factores de transcripción. Se piensa que estas tres proteínas forman un complejo de transcripción que activa de manera coordinada múltiples enzimas de la ruta de flavonoides con el fin de fomentar la producción de taninas condensadas en semillas de *Arabidopsis*. Otros factores de transcripción de la familia de myc y myb regulan distintas partes de la ruta de flavonoides en maíz, petunia y otras especies vegetales.

50 El pigmento de antocianina púrpura 1 (PAP1) de *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia de los factores de transcripción de tipo myb, incluyendo *an2* (*Petunia hybrida*) y *ant1* (*Lycopersicon esculentum*), que controlan la producción de antocianinas en plantas. PAP1 regula de manera positiva la producción de antocianinas en el follaje de *Arabidopsis* induciendo de manera transcripcional siete enzimas de la ruta de flavonoides comunes a la biosíntesis de flavonoides y de taninas condensadas, concretamente, PAL, 4CL, CHS, CHI, F3H, DFR y LDOX.

5 Aunque se han aislado secuencias de ácido nucleico que codifican para factores de transcripción de tipo PAP1 para determinadas especies de plantas, sigue existiendo la necesidad de materiales útiles para modificar la biosíntesis de flavonoides; para modificar la unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación y absorción de luz UV; para modificar la producción de pigmentos de la planta; para modificar la defensa de la planta frente a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos, patógenos fúngicos; para modificar la calidad del forraje, por ejemplo alterando la espuma de proteínas y confiriendo protección en cuanto a la inflamación de la panza por el pasto, particularmente en hierbas y legumbres de forraje, incluyendo alfalfa, medicagos, tréboles, centenos y festucas, y de métodos para su uso.

10 Un objeto de la presente invención es superar, o al menos aliviar, una o más de las dificultades o deficiencias asociadas con la técnica anterior o ayudar a cumplir las necesidades mencionadas anteriormente.

15 La invención proporciona un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico purificado o aislado que codifica para una proteína de pigmento de antocianina púrpura 1 (PAP1), o un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico que codifica para una secuencia que es complementaria o antisentido con respecto a una secuencia que codifica para una proteína PAP1, incluyendo dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) secuencias mostradas en las figuras 1 y 4 en el presente documento (ID de secuencia n.<sup>os</sup>: 1 y 3, respectivamente);

(b) complementos de las secuencias mencionadas en (a);

20 (c) fragmentos funcionalmente activos de las secuencias mencionadas en (a) y (b), que pueden modificar la biosíntesis de flavonoides en una planta y que tienen un tamaño de al menos 60 nucleótidos;

(d) variantes funcionalmente activas de las secuencias mencionadas en (a) y (b) que pueden modificar la biosíntesis de flavonoides en una planta y que tienen al menos el 90% de identidad con la secuencia mencionada en (a) o (b).

25 La invención también proporciona un polipéptido de PAP1 purificado o aislado que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) secuencias mostradas en las figuras 2 y 5 en el presente documento (ID de secuencia n.<sup>os</sup>: 2 y 4, respectivamente); y

30 (b) variantes funcionalmente activas de las secuencias mencionadas en (a) que tienen una o más de las propiedades biológicas de PAP1 y que tienen al menos el 90% de identidad con ID de secuencia n.<sup>o</sup>: 2 o ID de secuencia n.<sup>o</sup>: 4.

La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico sustancialmente purificados o aislados que codifican para secuencias de aminoácidos para una clase de proteínas que están relacionadas con PAP1, o fragmentos funcionalmente activos o variantes de las mismas. Tales proteínas se denominan en el presente documento de tipo PAP1.

35 Por un polipéptido de tipo PAP1 quiere decirse que se aplica uno cualquiera de ambos de los siguientes criterios: (i) el gen que codifica para el polipéptido se expresa de una manera similar a PAP1, y (ii) el polipéptido tiene actividad funcional similar a PAP1. En una realización preferida, el polipéptido de tipo PAP1 tiene al menos aproximadamente el 70%, preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de identidad con PAP1.

40 También se proporcionan ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico sustancialmente purificados o aislados complementarios y antisentido con respecto a fragmentos de ácido nucleico que codifican para polipéptido de tipo PAP1.

45 El solicitante ha encontrado que la potenciación individual o simultánea o la manipulación de otro modo de la expresión de polipéptidos de PAP1 o de tipo PAP1 en plantas puede potenciar o alterar de otro modo la biosíntesis de flavonoides; puede potenciar o alterar de otro modo la capacidad de la planta para la unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación o absorción de luz W; puede potenciar o reducir o alterar de otro modo la producción de pigmentos de la planta.

El solicitante también ha encontrado que la potenciación individual o simultánea o la manipulación de otro modo de

la expresión de ANR o polipéptidos de tipo ANR en plantas puede potenciar o alterar de otro modo la biosíntesis de flavonoides; puede potenciar o alterar de otro modo la capacidad de la planta para la unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación o absorción de luz UV; puede potenciar o reducir o alterar de otro modo la producción de pigmentos de la planta.

- 5 En una realización particularmente preferida el solicitante ha encontrado que la sobreexpresión secuencial, simultánea o combinada de candidatos para PAP1 y ANR (*banyuls*) de especies vegetales, incluyendo especies de trébol (*Trifolium*), medicago (*Medicago*), centeno (*Lolium*) y festuca (*Festuca*), puede conferir una potenciación de la calidad del herbaje y/o la seguridad en cuanto a la inflamación en plantas, tales como plantas de pastos, preferiblemente mediante la regulación por incremento de taninas condensadas por ejemplo en sus hojas.
- 10 Métodos para la manipulación de actividades de genes de PAP1 y/o ANR o de ese tipo en plantas, incluyendo legumbres tales como tréboles (especies de *Trifolium*), alfalfa (*Medicago sativa*) y especies de hierbas tales como centenos (especies de *Lolium*) y festucas (especies de *Festuca*), pueden facilitar la producción de, por ejemplo, legumbres de forraje e hierbas de forraje y otros cultivos con tolerancia potenciada frente a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos y patógenos fúngicos; pigmentación alterada en flores; legumbres de forraje
- 15 con potenciación de la calidad del herbaje y seguridad en cuanto a la inflamación; cultivos con potenciación del contenido de isoflavonoides que conduce a beneficios para la salud.

El uso de factores de transcripción para modificar múltiples enzimas específicas de producto en la ruta de flavonoides puede ser una estrategia alternativa útil a la clonación de genes que codifican para muchas enzimas y la modificación de su expresión en plantas transgénicas.

- 20 La especie de trébol (*Trifolium*), medicago (*Medicago*), centeno (*Lolium*) o festuca (*Festuca*) puede ser de cualquier tipo adecuado, incluyendo trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), alfalfa (*Medicago sativa*), centeno italiano o anual (*Lolium multiflorum*), centeno perenne (*Lolium perenne*), festuca alta (*Festuca arundinacea/Lolium arundinaceum*), festuca de la pradera (*Festuca pratensis*) y festuca roja (*Festuca rubra*). Preferiblemente la especie es un trébol o un centeno, más preferiblemente trébol blanco (*T. repens*) o centeno perenne (*L. perenne*). El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y el centeno perenne (*Lolium perenne* L.) son hierbas y legumbres de pasto claves, respectivamente, en climas templados en todo el mundo. El centeno perenne también es una hierba de césped importante.

- Los ácidos nucleicos según la invención pueden ser genes de longitud completa o parte de los mismos, y también se denominan "fragmentos de ácido nucleico" y "secuencias de nucleótidos" en esta memoria descriptiva. Por
- 30 conveniencia, se usa la expresión "ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico" para cubrir todos ellos.

El ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico puede ser de cualquier tipo adecuado e incluye ADN (tal como ADNc o ADN genómico) y ARN (tal como ARNm) que es mono o bicatenario, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas, y combinaciones de las mismas.

- El término "aislado" significa que el material está retirado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de manera natural). Por ejemplo, un ácido nucleico que se produce de manera natural presente en una planta viva no está aislado, pero el mismo ácido nucleico, separado de parte o la totalidad de los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales ácidos nucleicos pueden ser parte de un vector y/o tales ácidos nucleicos pueden ser parte de una composición, y todavía están aislados porque un vector o una composición de este tipo no es parte de su entorno natural.

- 40 Tales ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico pueden ensamblarse para formar un cóntigo consenso. Tal como se usa en el presente documento, el término "cóntigo consenso" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se ensambla a partir de dos o más secuencias de nucleótidos constituyentes que comparten regiones comunes o solapantes de homología de secuencia. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de dos o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico puede compararse y alinearse con el fin de identificar secuencias comunes o solapantes. Cuando existen secuencias comunes o solapantes entre dos o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico, las secuencias (y por tanto sus correspondientes ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico) pueden ensamblarse en una única secuencia de nucleótidos contiguos.

- Por "funcionalmente activo" en relación con ácidos nucleicos quiere decirse que el fragmento o la variante (tal como un análogo, derivado o mutante) codifica para un polipéptido que puede modificar la biosíntesis de flavonoides; en una planta. Tales variantes incluyen variantes alélicas que se producen de manera natural y variantes que no se producen de manera natural. Se contemplan adiciones, deleciones, sustituciones y derivatizaciones de uno o más de los nucleótidos siempre que las modificaciones no den como resultado una pérdida de la actividad funcional del fragmento o la variante. Preferiblemente el fragmento o la variante funcionalmente activo tiene al menos aproximadamente el 75% de identidad con la parte relevante de la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80% de identidad, más preferiblemente al menos
- 55

aproximadamente el 90% de identidad, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de identidad. Tales variantes y fragmentos funcionalmente activos incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen cambios de ácido nucleico que dan como resultado sustituciones de aminoácidos conservativas de uno o más residuos en la secuencia de aminoácidos correspondiente. Preferiblemente el fragmento tiene un tamaño de al menos 30 nucleótidos, más preferiblemente al menos 45 nucleótidos, lo más preferiblemente al menos 60 nucleótidos.

Se han aislado e identificado ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico que codifican para al menos una parte de un ortólogo de PAP1 candidato. Los ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse para aislar ADNc y genes que codifican para proteínas homólogas de la misma o de otras especies vegetales. El aislamiento de genes homólogos usando protocolos dependientes de secuencias, tales como métodos de hibridación de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ADN y ARN tal como se muestra a modo de ejemplo por los diversos usos de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa), se conoce bien en la técnica.

Por ejemplo, pueden aislarse directamente genes que codifican para otras proteínas de tipo PAP1, o bien como ADNc o bien como ADN genómicos, usando la totalidad o una parte de los ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico de la presente invención como sondas de hibridación para examinar bibliotecas de la planta deseada empleando la metodología bien conocida por los expertos en la técnica. Pueden diseñarse y sintetizarse sondas oligonucleotídicas específicas basándose en las secuencias de ácido nucleico de la presente invención mediante métodos conocidos en la técnica. Además, pueden usarse directamente las secuencias completas para sintetizar sondas de ADN mediante métodos conocidos por el experto en la técnica tales como marcaje de ADN con cebadores al azar, traslado de mellas o técnicas de marcaje de extremos, o sondas de ARN usando sistemas de transcripción *in vitro* disponibles. Además, pueden diseñarse cebadores específicos y usarse para amplificar una parte o la totalidad de las secuencias de la presente invención. Los productos de amplificación resultantes pueden marcarse directamente durante las reacciones de amplificación o marcarse tras las reacciones de amplificación, y usarse como sondas para aislar ADNc de longitud completa o fragmentos genómicos en condiciones de rigurosidad apropiada.

Además, pueden usarse segmentos cortos de los ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico de la presente invención en protocolos para amplificar ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico más largos que codifican para genes homólogos a partir de ADN o ARN. Por ejemplo, puede realizarse la reacción en cadena de la polimerasa con una biblioteca de fragmentos de ácido nucleico clonados en la que la secuencia de un cebador se deriva de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención, y la secuencia del otro cebador se aprovecha de la presencia de tramos de poli(ácido adenílico) hacia el extremo 3' del precursor de ARNm que codifica para genes vegetales. Alternativamente, la segunda secuencia de cebador puede basarse en secuencias derivadas del vector de clonación. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden seguir el protocolo RACE (Frohman *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998) para generar ADNc usando PCR para amplificar copias de la región entre un único punto en el transcrito y el extremo 3' o 5'. Usando sistemas de RACE en 3' y RACE en 5' comercialmente disponibles (BRL), pueden aislarse fragmentos de ADNc en 3' o 5' específicos (Ohara *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5673; Loh *et al.* (1989) Science 243: 217). Pueden combinarse productos generados mediante los procedimientos de RACE en 3' y 5' para generar ADNc de longitud completa.

En un segundo aspecto de la presente descripción se proporciona un factor de transcripción sustancialmente purificado o aislado que regula la biosíntesis de flavonoides de una especie de legumbres o hierbas. Preferiblemente, la presente descripción proporciona un polipéptido sustancialmente purificado o aislado seleccionado del grupo que consiste en PAP1 y proteínas de tipo PAP1, y fragmentos funcionalmente activos y variantes de las mismas, preferiblemente de una especie de trébol (*Trifolium*), medicago (*Medicago*), centeno (*Lolium*) o festuca (*Festuca*).

La especie de trébol (*Trifolium*), medicago (*Medicago*), centeno (*Lolium*) o festuca (*Festuca*) puede ser de cualquier tipo adecuado, incluyendo trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), alfalfa (*Medicago sativa*), centeno italiano o anual (*Lolium multiflorum*), centeno perenne (*Lolium perenne*), festuca alta (*Festuca arundinacea/Lolium arundinaceum*), festuca de la pradera (*Festuca pratensis*) y festuca roja (*Festuca rubra*). En particular, la especie puede ser un trébol o un centeno, más particularmente trébol blanco (*T. repens*) o centeno perenne (*L. perenne*).

En una realización preferida de este aspecto de la descripción, el polipéptido de PAP1 o de tipo PAP1 sustancialmente purificado o aislado incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias mostradas en las figuras 2 y 5 en el presente documento (SEQ ID N<sup>os</sup>: 2 y 4, respectivamente), y fragmentos funcionalmente activos y variantes de las mismas.

Por "funcionalmente activo" en relación con polipéptidos quiere decirse que el fragmento o la variante tiene una o más de las propiedades biológicas de las proteínas PAP1 y de tipo PAP1, respectivamente. Se contemplan adiciones, deleciones, sustituciones y derivatizaciones de uno o más de los aminoácidos siempre que las modificaciones no den como resultado una pérdida de actividad funcional del fragmento o la variante.

Preferiblemente el fragmento o la variante funcionalmente activo tiene al menos aproximadamente el 60% de identidad con la parte relevante de la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80% de identidad, lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de identidad. Tales variantes y fragmentos funcionalmente activos incluyen, por ejemplo, los que tienen sustituciones de aminoácido conservativas de uno o más residuos en la secuencia de aminoácidos correspondiente. Preferiblemente el fragmento tiene un tamaño de al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente al menos 15 aminoácidos, lo más preferiblemente al menos 20 aminoácidos.

En una realización adicional de este aspecto de la descripción, se proporciona un polipéptido producido de manera recombinante a partir de un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la presente descripción.

La disponibilidad de las secuencias de nucleótidos de la presente descripción y las secuencias de aminoácidos deducidas facilita el examen inmunológico de bibliotecas de expresión de ADNc. Pueden sintetizarse péptidos sintéticos que representan partes de las presentes secuencias de aminoácidos. Estos péptidos pueden usarse para inmunizar animales para producir anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidad para péptidos y/o proteínas que incluyen las secuencias de aminoácidos. Estos anticuerpos pueden usarse entonces para examinar bibliotecas de expresión de ADNc para aislar clones de ADNc de longitud completa de interés.

Todavía en un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona un método de aislamiento de un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico de la presente descripción, incluyendo dicho método secuenciar fragmentos de ácido nucleico a partir de una biblioteca de ácido nucleico.

La biblioteca de ácido nucleico puede ser de cualquier tipo adecuado y es preferiblemente una biblioteca de ADNc.

El ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico puede aislarse de un plásmido recombinante o puede amplificarse, por ejemplo usando la reacción en cadena de la polimerasa.

La secuenciación puede realizarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Todavía en un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona el uso de un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico de la presente descripción, y/o información de secuencia de nucleótidos del mismo, como marcador genético molecular.

Más particularmente, pueden usarse ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico según la presente descripción y/o información de secuencia de nucleótidos de los mismos como marcador genético molecular para el marcaje con etiqueta de locus con carácter cuantitativo (QTL), mapeo de QTL, determinación de la huella de ADN y en selección asistida por marcador, particularmente en tréboles, alfalfa, centenos y festucas. Incluso más particularmente, pueden usarse ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico según la presente descripción y/o información de secuencia de nucleótidos de los mismos como marcadores genéticos moleculares en la mejora de plantas en relación con la tolerancia de plantas a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos, patógenos fúngicos; en relación con la calidad del forraje; en relación con la seguridad en cuanto a la inflamación; en relación con el contenido de taninas condensadas; en relación con la pigmentación de la planta. Incluso más particularmente, pueden usarse SNP que revelan información de secuencia en variantes alélicas de los ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico de la presente descripción y/o información de secuencia de nucleótidos de los mismos como marcadores genéticos moleculares para el marcaje con etiqueta y mapeo de QTL y en la selección asistida por marcador, particularmente en tréboles, alfalfa, centenos y festucas.

Todavía en un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un constructo que incluye un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la presente invención.

El término "constructo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico artificialmente ensamblada o aislada, que incluye el gen de interés. En general un constructo puede incluir el gen o los genes de interés, un gen de marcador que en algunos casos también puede ser el gen de interés y secuencias reguladoras apropiadas. Debe apreciarse que la inclusión de secuencias reguladoras en un constructo es opcional, por ejemplo, tales secuencias pueden no requerirse en situaciones en las que deben usarse las secuencias reguladoras de una célula huésped. El término constructo incluye vectores pero no debe considerarse limitado a los mismos.

Todavía en un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un vector que incluye un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la presente invención.

Todavía en un aspecto adicional de la presente descripción se proporciona un constructo o vector que incluye un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico que codifica para un factor de transcripción de PAP1 o de tipo PAP1, o un fragmento funcionalmente activo o variante del mismo. Opcionalmente, el constructo o vector puede incluir

además un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico que codifica para ANR (*banyuls*), o un fragmento funcionalmente activo o variante del mismo. Preferiblemente los ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico codifican para PAP1 o ANR de una especie de legumbre o hierba, tales como una especie de trébol (*Trifolium*), medicago (*Medicago*), centeno (*Lolium*) y/o festuca (*Festuca*).

5 El término “vector” tal como se usa en el presente documento abarca tanto vectores de clonación como de expresión. Los vectores son con frecuencia moléculas recombinantes que contienen moléculas de ácido nucleico de varias fuentes.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el vector puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la presente invención y un terminador; estando dicho elemento regulador, ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico y terminador operativamente unidos.

15 Por “operativamente unido” quiere decirse que dicho elemento regulador puede provocar la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico en una célula vegetal y dicho terminador puede terminar la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico en una célula vegetal. Preferiblemente, dicho elemento regulador está en el sentido de 5’ de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico y dicho terminador está en el sentido de 3’ de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico.

20 El vector puede ser de cualquier tipo adecuado y puede ser viral o no viral. El vector puede ser un vector de expresión. Tales vectores incluyen secuencias de ácido nucleico cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo, derivados de virus de plantas; plásmidos bacterianos; derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, derivados del plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes*; ADN de fago; cromosomas artificiales de levaduras; cromosomas artificiales bacterianos; cromosomas artificiales bacterianos binarios; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago. Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre que sea replicable, integrativo o viable en la célula vegetal.

El elemento regulador y terminador pueden ser de cualquier tipo adecuado y pueden ser endógenos para la célula vegetal diana o pueden ser exógenos, siempre que sean funcionales en la célula vegetal diana.

25 Preferiblemente el elemento regulador es un promotor. Los expertos en la técnica conocen una variedad de promotores que pueden emplearse en los vectores de la presente invención. Los factores que influyen en la elección del promotor incluyen la especificidad de tejido deseada del vector, y si se desea la expresión constitutiva o inducible y la naturaleza de la célula vegetal que va a transformarse (por ejemplo, monocotiledónea o dicotiledónea). Los promotores constitutivos particularmente adecuados incluyen el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S de CaMV), el promotor de ubiquitina del maíz y el promotor de actina del arroz.

Los expertos en la técnica también conocen bien una variedad de terminadores que pueden emplearse en los vectores de la presente invención. El terminador puede ser del mismo gen que la secuencia de promotor o de un gen diferente. Terminadores particularmente adecuados son señales de poliadenilación, tales como la poliA de 35S de CaMV y otros terminadores de los genes de nopalina sintasa (nos) y octopina sintasa (ocs).

35 El vector, además del elemento regulador, el ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico de la presente invención y el terminador, puede incluir elementos adicionales necesarios para la expresión del ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico, en diferentes combinaciones, por ejemplo estructura principal de vector, origen de replicación (*ori*), sitios de clonación múltiple, secuencias espaciadoras, potenciadores, intrones (tales como el intrón *Ubi* de ubiquitina del maíz), genes de resistencia a antibióticos y otros genes de marcadores seleccionables [tales como el gen de neomicina fosfotransferasa (*npt2*), el gen de higromicina fosfotransferasa (*hph*), el gen de fosfinotricina acetiltransferasa (*bar* o *pat*)] y genes indicadores (tales como gen de beta-glucuronidasa (GUS) (*gusA*)). El vector también puede contener un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

45 Como alternativa al uso de un gen de marcador seleccionable para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, la presencia del vector en células transformadas puede determinarse mediante otras técnicas bien conocidas en la técnica, tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), análisis de hibridación por transferencia de tipo Southern, ensayos de GUS histoquímicos, análisis de hibridación por transferencia tipo Northern y Western.

50 Los expertos en la técnica apreciarán que los diversos componentes del vector están operativamente unidos, de modo que dan como resultado la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas para unir operativamente los componentes del vector de la presente invención. Tales técnicas incluyen el uso de ligadores, tales como ligadores sintéticos, por ejemplo que incluyen uno o más sitios de enzimas de restricción.

Los vectores de la presente invención pueden incorporarse en una variedad de plantas, incluyendo monocotiledóneas (tal como hierbas de los géneros *Lolium*, *Festuca*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Panicum* y otras hierbas de forraje y de césped, maíz, avena, caña de azúcar, trigo y cebada), dicotiledóneas (tales como arábidopsis, tabaco, tréboles, medicagos, eucalipto, patata, remolacha de azúcar, canola, semilla de soja, garbanzo) y gimnospermas. En una realización preferida, los vectores pueden usarse para transformar monocotiledóneas, preferiblemente especies de hierba tales como centenos (especies de *Lolium*) y festucas (especies de *Festuca*), más preferiblemente centeno perenne, incluyendo variedades de tipo de forraje y de césped. En una realización preferida alternativa, los vectores pueden usarse para transformar dicotiledóneas, preferiblemente especies de legumbres de forraje tales como tréboles (especies de *Trifolium*) y medicagos (especies de *Medicago*), más preferiblemente trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Tréboles, alfalfa y medicagos son legumbres de pasto clave en climas templados en todo el mundo.

Los expertos en la técnica conocen bien técnicas para incorporar los vectores de la presente invención en células vegetales (por ejemplo mediante transducción, transfección o transformación). Tales técnicas incluyen introducción mediada por *Agrobacterium*, electroporación en tejidos, células y protoplastos, fusión de protoplastos, inyección en órganos reproductores, inyección en embriones inmaduros e introducción por proyectiles de alta velocidad en células, tejidos, callos, embriones inmaduros y maduros. La elección de la técnica dependerá en gran medida del tipo de planta que va a transformarse.

Pueden seleccionarse células que incorporan los vectores de la presente invención, tal como se describió anteriormente, y después cultivarse en un medio apropiado para regenerar plantas transformadas, usando técnicas bien conocidas en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, resultarán evidentes para el experto en la técnica. Las plantas resultantes pueden reproducirse, de manera o bien sexual o bien asexual, usando métodos bien conocidos en la técnica, para producir generaciones sucesivas de plantas transformadas.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de planta, que incluye, por ejemplo transformada con, un vector o constructo, ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico de la presente invención.

La célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de planta puede ser de cualquier especie adecuada, incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas. En una realización preferida la célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de planta puede ser de una monocotiledónea, preferiblemente una especie de hierba, más preferiblemente un centeno (especie de *Lolium*) o festuca (especie de *Festuca*), más preferiblemente centeno perenne, incluyendo tanto variedades de tipo de forraje como de césped. En una realización preferida alternativa la célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de planta puede ser de una dicotiledónea, preferiblemente especies de legumbres de forraje tales como tréboles (especie de *Trifolium*) y medicagos (especie de *Medicago*), más preferiblemente trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

La presente invención también proporciona una planta, semilla de planta u otra parte de planta, o un extracto de planta derivado de una célula vegetal de la presente invención, y que incluye preferiblemente, por ejemplo transformado con, un vector o constructo, ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico de la presente invención.

Usando los métodos y materiales de la presente invención, puede aumentarse o reducirse la biosíntesis de flavonoides. Puede aumentarse, por ejemplo, incorporando copias adicionales de un ácido nucleico sentido de la presente invención. Puede reducirse, por ejemplo, incorporando un ácido nucleico antisentido o ARNbc o ARN de interferencia pequeño (ARNip) derivado de las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Además, el número de copias de genes que codifican para diferentes enzimas implicadas en la biosíntesis de flavonoides puede manipularse para modificar la biosíntesis de flavonoides, unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación, absorción de luz UV, producción de pigmentos de la planta, defensa de la planta frente a estreses bióticos y modificación de la calidad del forraje.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método de modificación de la biosíntesis de flavonoides; de modificación de la quelación de metales, antioxidación y absorción de luz UV; de modificación de la producción de pigmentos de la planta; de modificación de la defensa de la planta frente a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos, patógenos fúngicos; de modificación de la calidad del forraje alterando la espuma de proteínas y confiriendo protección en cuanto a la inflamación de la panza por el pasto, incluyendo dicho método introducir en dicha planta una cantidad eficaz de un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico, constructo y/o vector según la presente invención.

La presente invención también proporciona un método de potenciación de la calidad del herbaje y/o seguridad en cuanto a la inflamación en una planta, método que incluye sobreexpresar PAP1 y ANR (*banyuls*) en dicha planta de una manera secuencial, simultánea o combinada.



En una realización preferida, el método incluye introducir en dicha planta una cantidad eficaz de uno o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico que codifican para PAP1 y ANR (*banyuls*), preferiblemente de una especie de legumbre o hierba, tal como especies de trébol (*Trifolium*), medicago (*Medicago*), centeno (*Lolium*) y/o festuca (*Festuca*).

5 En una realización adicional preferida, la planta es una planta de pasto.

Por “una cantidad eficaz” quiere decirse una cantidad suficiente para dar como resultado un rasgo fenotípico identificable en dicha planta, o una planta, semilla de planta u otra parte de planta derivada de la misma. Tales cantidades pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica apropiado, teniendo en cuenta el tipo de planta, la vía de administración y otros factores relevantes. Una persona de este tipo podrá determinar fácilmente una cantidad adecuada y método de administración. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

15 Usando los métodos y materiales de la presente invención, pueden aumentarse o alterarse de otro modo la biosíntesis de flavonoides, unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación, absorción de luz UV, tolerancia a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos y patógenos fúngicos; pigmentación por ejemplo en flores y hojas; calidad del herbaje y seguridad en cuanto a la inflamación; contenido de isoflavonoides que conduce a beneficios para la salud, por ejemplo incorporando copias adicionales de un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico sentido de la presente invención. Pueden disminuirse o alterarse de otro modo, por ejemplo incorporando un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico antisentido de la presente invención.

20 Ahora se describirá la presente invención más completamente con referencia a los ejemplos y dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción es únicamente ilustrativa y no debe interpretarse como restricción de ninguna manera de la generalidad de la invención descrita anteriormente.

En las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de la etiqueta de secuencia expresada TrPAP1 (SEQ ID No: 1).

25 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la etiqueta de secuencia expresada TrPAP1 (SEQ ID No: 2).

La figura 3 muestra un mapa de plásmido del ADNc de longitud completa que codifica para PAP1 de trébol blanco.

La figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de longitud completa de PAP1 de trébol blanco (SEQ ID No: 3).

30 La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de longitud completa de PAP1 de trébol blanco (SEQ ID No: 4).

La figura 6 muestra mapas de plásmido del ADNc que codifica para la PAP1 de trébol blanco en las orientaciones sentido y antisentido en un vector de transformación binario pPZP221 modificado.

35 La figura 7 muestra mapas de plásmido del vector de transformación binario pPZPRCS2 que contiene el gen de marcador seleccionable nptII y de los vectores auxiliares pAUX3132 y pAUX3131 que contienen ADNc que codifican para antocianidina reductasa (TrBANA) y PAP1 de trébol blanco en la orientación sentido.

La figura 8 muestra un mapa de plásmido del vector de entrada pDONR221 GATEWAY (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.).

40 La figura 9 muestra etapas de selección durante la transformación mediada por *Agrobacterium* de cotiledones de trébol blanco. Se extraen explantes cotiledonarios de semillas empapadas (A), se cultivan conjuntamente con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el vector de transformación binario y se someten a una serie de etapas selectivas de 2 semanas en placas de cultivo tisular (B, C y D). Se escinden brotes y se hacen crecer en medios inductores de raíces en recipientes de cultivo tisular (E). Finalmente, se transfieren plántulas de trébol blanco transgénico a condiciones de invernadero (F y G), dejando que tengan lugar análisis moleculares y fenotípicos.

45 La figura 10 muestra patrones de tinción con 4-dimetilaminocinamaldehído (DMACA) en tejido de hoja (A) y de inflorescencia inmadura (B) de *Trifolium repens* (cv “Mink”) y en tejido de hoja (C) de *Lotus corniculatus* (cv “Draco”).

La figura 11 muestra la expresión comparativa de los homólogos de trébol de genes relacionados con flavonoides *banyuls* (antocianidina reductasa) y PAP1 y el gen expresado de manera ubicua S-adenosil-metionina sintetasa

(SAMS), normalizada frente a la expresión de factor de elongación 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ), otro gen expresado de manera ubicua. Se midió la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real con química de SYBR Green en capullos inmaduros superiores (U), inferiores (L) y completos (W) de *T. repens* cv Mink. Se diseñaron conjuntos de cebadores usando clones de ADNc de genes relacionados con flavonoides (tabla 4) y el método  $\delta\delta$ CT de análisis de datos.

## 5 EJEMPLO 1

Preparación de bibliotecas de ADNc, aislamiento y secuenciación del ADNc que codifica para proteínas de tipo PAP1 a partir de trébol blanco (*Trifolium repens*)

10 Se prepararon bibliotecas de ADNc que representaban ARNm, de diversos órganos y tejidos de trébol blanco (*Trifolium repens*). Las características de las bibliotecas de trébol blanco, respectivamente, se describen a continuación (tablas 1 y 2).

TABLA 1

<b>Bibliotecas de ADNc de trébol blanco (<i>Trifolium repens</i>)</b>	
<b>Biblioteca</b>	<b>Órgano/tejido</b>
01wc	Plantón completo, crecido ligeramente
02wc	Plantón de 3, 5, 10, 14, 21 y 28 días con raíz nodulada
03wc	Nódulos extraídos por apriete de raíces de plantas inoculadas con rizobio de 42 días
04wc	Hoja cortada y tallo recogido después de 0, 1, 4, 6 y 14 h tras cortar
05wc	Inflorescencias: <50% abiertas, no completamente abiertas y completamente abiertas
06wc	Etiolado hecho crecer en la oscuridad
07wc	Inflorescencia: estadios muy tempranos, alargamiento de tallo, < 15 pétalos, 15-20 pétalos
08wc	semilla congelada a -80°C, empapada en la oscuridad durante la noche a 10°C
09wc	Plantas sometidas a estrés de sequía
10wc	Hoja infectada por AMV
11wc	Hoja infectada por WCMV
12wc	Plantas privadas de fósforo
13wc	Punta de estolón vegetativa
14wc	Iniciales de raíz de estolón
15wc	Estolón senescente
16wc	Hoja senescente

15 Las bibliotecas de ADNc pueden prepararse mediante cualquiera de muchos métodos disponibles. Por ejemplo, puede aislarse ARN total usando el método de Trizol (Gibco-BRL, EE.UU.) o el minikit para plantas RNeasy (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Pueden generarse ADNc usando el kit de síntesis de ADNc mediante PCR SMART (Clontech, EE.UU.), pueden amplificarse ADNc mediante reacción en cadena de la polimerasa de largo alcance usando el sistema de enzimas de PCR Advantage 2 (Clontech, EE.UU.), pueden limpiarse ADNc usando la columna de centrifugación GeneClean (Bio 101, EE.UU.), añadir una cola y fraccionarse por tamaños, según el protocolo proporcionado por Clontech. Los ADNc pueden introducirse en el sistema de vector

pGEM-T Easy 1 (Promega, EE.UU.) según el protocolo proporcionado por Promega. Los ADNc en el vector de plásmido pGEM-T Easy se transfecan a células ultracompetentes *Escherichia coli* Epicurian coli XL10-Gold (Stratagene, EE.UU.) según el protocolo proporcionado por Stratagene.

5 Alternativamente, pueden introducirse los ADNc en vectores de plásmido para preparar en primer lugar las bibliotecas de ADNc en vectores Uni-ZAP XR según el protocolo del fabricante (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EE.UU.). Se convierten las bibliotecas de Uni-ZAP XR en bibliotecas de plásmidos según el protocolo proporcionado por Stratagene. Tras la conversión, se contendrán insertos de ADNc en el vector de plásmido pBluescript. Además, pueden introducirse directamente los ADNc en vectores pBluescript II SK(+) previamente cortados (Stratagene) usando ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), seguido por transfección en células *E. coli* 10 DH10B según el protocolo del fabricante (GIBCO BRL Products).

Una vez que los insertos de ADNc están en vectores de plásmido, se preparan ADN de plásmido a partir de colonias bacterianas escogidas al azar que contienen plásmidos recombinantes, o se amplifican las secuencias de ADNc insertadas mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos para secuencias de vector que flanquean a las secuencias de ADNc insertadas. La preparación de ADN de plásmido puede realizarse de 15 manera robótica usando el kit QiaPrep Turbo de Qiagen (Qiagen, Alemania) según el protocolo proporcionado por Qiagen. Se secuencian ADN insertados amplificados en reacciones de secuenciación con colorante-terminador para generar secuencias de ADNc parciales (etiquetas de secuencia expresada o "EST"). Se analizan las EST resultantes usando un analizador de secuencias ABI 3700 de Applied Biosystems.

## EJEMPLO 2

20 Análisis de la secuencia de ADN

Se identificó el clon de ADNc que codificaba para una proteína de tipo PAP1 realizando búsquedas con BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica; Altschul *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.* 215:403-410). Se analizó la secuencia de ADNc obtenida para determinar la similitud con todas las secuencias de ADN disponibles para el público contenidas en la base de datos de nucleótidos eBioinformatics usando el algoritmo de BLASTN 25 proporcionado por el centro nacional para información en biotecnología (NCBI). Se tradujo la secuencia de ADN en todos los marcos de lectura y se comparó para determinar su similitud con todas las secuencias de proteína disponibles para el público contenidas en la base de datos de secuencias de proteína SWISS-PROT usando el algoritmo BLASTx (v 2.0.1) (Gish y States (1993) *Nature Genetics* 3:266-272) proporcionado por el NCBI.

## EJEMPLO 3

30 Identificación y secuenciación de longitud completa del ADNc que codifica para la proteína PAP1 de trébol blanco

Para caracterizar completamente para los fines de la generación de sondas para experimentos de hibridación y la generación de vectores de transformación, se identificó el ADNc que codificaba para la proteína PAP1 de trébol blanco y se secuenció completamente.

35 Se identificó el ADNc de longitud completa a partir de la base de datos de secuencias de EST usando secuencias publicadas relevantes (banco de datos del NCBI) como consultas para búsquedas con BLAST. Se identificó el ADNc de longitud completa mediante alineación de las secuencias de consulta y de resultado positivo usando Sequencher (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI 48108, EE.UU.). Entonces se usó el ADNc original en el vector pGEM-T Easy para transformar células DH5 alfa químicamente competentes (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Se escogieron al 40 menos dos colonias por transformación para la secuenciación inicial con cebadores M13F y M13R. Se alinearon las secuencias resultantes con la secuencia de EST original usando Sequencher para confirmar la identidad y se escogió uno de los dos clones para la secuenciación de longitud completa, habitualmente aquél con el mejor resultado de secuenciación inicial.

45 Se completó la secuenciación mediante paseo de cebador, es decir se diseñó un cebador oligonucleotídico para la secuencia inicial y se usó para secuenciar adicionalmente desde el extremo 5'. La secuencia de este cebador oligonucleotídico se muestra en la tabla 2. Una cola de poli-A extendida necesitó que se completara la secuenciación del ADNc desde el extremo 5'.

Entonces se ensambló el cóntigo en Sequencher. El cóntigo incluyó el extremo 5' de la secuencia de EST original y se extendió más allá de la cola de poli-A en el extremo 3' del ADNc.

50 Se obtuvieron el mapa de plásmido y las secuencias de ADNc completo del gen de PAP1 de trébol blanco en el vector pGEM-T Easy (figuras 3 y 4).

TABLA 2

Cebador usado para la secuenciación del ADNc de longitud completa			
Nombre del gen	ID del clon	Cebador de secuenciación	Secuencia de cebador (5'>3')
TrPAP1	05wc1SsA01	05wc1SsA01.f1	CAGGAAGGACAGCAAATGA (SEQ ID No. 5)

**EJEMPLO 4**

5 Desarrollo de vectores de transformación binarios que contienen genes quiméricos con secuencias de ADNc de TrBANA y TrPAP1 de trébol blanco

10 Para alterar la expresión de las proteínas implicadas en la biosíntesis de flavonoides, unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación, absorción de luz UV, tolerancia a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos y patógenos fúngicos; pigmentación por ejemplo en flores y hojas; calidad del herbaje y seguridad en cuanto a la inflamación y contenido de isoflavonoides que conduce a beneficios para la salud usando tecnología de supresión antisentido y/o sentido y sobreexpresión de homólogos de TrPAP1 y TrBANA de trébol en plantas transgénicas, se produjo un conjunto de vectores de transformación binarios y antisentido.

15 Se generaron fragmentos de ADNc mediante PCR de alta fidelidad usando el ADNc de plásmido pGEM-T Easy original como molde. Los cebadores usados (tabla 3) contenían sitios de recombinación de GATEWAY® attB1 y attB2 para la clonación direccional en el vector diana. Tras la amplificación mediante PCR y purificación de los productos, se clonaron los fragmentos de ADNc en el sitio de recombinación del vector pDONR221™ (figura 8) usando tecnología BP GATEWAY® (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Se modificó el vector binario pZPRCS2 (Hajdukiewicz *et al.* 1994) para contener el casete 35S<sup>2</sup> de pKILX71:35S<sup>2</sup> tal como sigue. Se cortó pKILX71:35S<sup>2</sup> con ClaI. Se rellenó la proyección en 5' usando Klenow y se aplicó una cola de A al extremo romo con Taq polimerasa. Tras cortar con EcoRI, se purificó en gel el fragmento de 2 kb con una cola de A en 3' y una compatible con EcoRI. Se cortó pZP221 con HindIII y se rellenó la proyección en 5' resultante y se aplicó una cola de T con Taq polimerasa. Se eliminó el resto del sitio de clonación múltiple de pZP221 original mediante digestión con EcoRI, y se clonó el casete de expresión en el sitio de EcoRI y la restauración de la proyección de T en 3' del sitio de HindIII. Este vector binario contiene entre el borde izquierdo y derecho el gen de marcador seleccionable vegetal aaaC1 bajo el control del promotor de 35S y el terminador de 35S y el casete de expresión derivado de pKILX71:35S<sup>2</sup> con un promotor de 35S de CaMV con una región de potenciador duplicada y un terminador de rbcS. Se preparó este vector para GATEWAY® digiriéndolo con XbaI y formando extremos romos usando ADN polimerasa de Klenow, permitiendo la clonación del casete de recombinación de RfA en la orientación sentido o antisentido entre el promotor de 35S potenciado y el terminador de rbcS.

30 Se generaron vectores de transformación que contenían genes quiméricos usando ADNc de marco de lectura abierto de longitud completa que codifican para la proteína TrPAP1 de trébol blanco en la orientación sentido y orientaciones antisentido bajo el control de los promotores de 35S o 35S<sup>2</sup> de CaMV, usando tecnología de GATEWAY® (figura 6). Se comprobó la orientación de los constructos de PAP1 de trébol blanco (sentido o antisentido) mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

35 Se desarrolló un vector de transformación de múltiples genes basado en el sistema de Goderis *et al.* (2002) con el fin de modificar la expresión de homólogos de trébol blanco de ANR y PAP1 en plantas transgénicas. Se amplificó el promotor de 35S potenciado unido al terminador de rbcS mediante PCR de alta fidelidad a partir de un vector basado en pZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para añadir un sitio de AgeI en el extremo 5' y un sitio de NotI en el extremo 3' del fragmento de PCR (tabla 3). Este vector basado en pZP200 se había modificado tal como ya se describió para contener el casete de expresión 35S<sup>2</sup>:rbcS y un casete de marcador seleccionable de promotor de nos:nptII:terminador de nos. Se digirieron el producto de PCR y pAUX3131 con AgeI y NotI y se ligaron entre sí. Se cortó un casete que contenía el promotor de 35S unido al terminador de 35S del vector pDH51 usando EcoRI y se clonó en el sitio de EcoRI de pAUX3132. Se prepararon las versiones modificadas de pAUX3131 y pAUX3132 para GATEWAY® digiriéndolas con BamHI y preparando extremos romos usando ADN polimerasa de Klenow, permitiendo la clonación del casete de recombinación RfB en la orientación sentido entre las secuencias de promotor y terminador de cada vector. Se generaron vectores auxiliares que contenían genes quiméricos usando ADNc de marco de lectura abierto de longitud completa que codificaban para los genes de BAN y PAP1 de trébol blanco en la orientación sentido bajo el control de los promotores de 35S o 35S<sup>2</sup> de CaMV, usando tecnología GATEWAY® (figura 7).

50 Se amplificó un casete de marcador seleccionable de promotor de nos:nptII:terminador de nos que codificaba para resistencia a la kanamicina, mediante PCR de alta fidelidad a partir del vector pZP200 modificado ya descrito,

usando cebadores diseñados para añadir sitios de Ascl en los extremos 5' y 3' (tabla 3). Se digirieron el producto de PCR y el vector de transformación binario pZPRCS2 (Goderis *et al.*, 2002) usando Ascl y se ligaron entre sí (figura 7). Se añadieron los casetes de BAN y PAP1 de trébol blanco a este vector de transformación binario mediante digestiones secuenciales y ligaciones que implicaban las enzimas de direccionamiento I-Ceul y I-Scel, respectivamente (figura 7)

5

TABLA 3

<b>Lista de cebadores usados para amplificar mediante PCR los marcos de lectura abiertos de genes relacionados con flavonoides a partir de trébol blanco y casetes de expresión usados en vectores de transformación binarios</b>			
<b>Nombre del gen</b>	<b>ID del clon</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia del cebador (5'-&gt;3')</b>
TrBANa	05wc2XsG02	TrBANaGW.f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTAGA GCACTAGTGTGTATAAGTTTCTTGG (SEQ ID No: 6)
TrBANa	05wc2XsG02	TrBANaGW.r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGAT CAAATCTAATTCTTCAGTGC (SEQ ID No: 7)
TrPAP1	05wc1SsA01	TrPAP1GW.f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGG GTGGTGTTCATGGAC (SEQ ID No: 8)
TrPAP1	05wc1SsA01	TrPAP1GW.r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAG AAGAAAAATCAATTATACATATC (SEQ ID No: 9)
casete 35S2:rbcS	N/A	P35S2Agel.f	ATAATAACCGGTGCCCGGGGATCTCCTTTGCC (SEQ ID No: 10)
casete 35S2:rbcS	N/A	TrbcSNotl.r	ATAATAGCGGCCGCATGCATGTTGTCAATCAATTG G (SEQ ID No: 11)
casete Nos:nptII:nos	N/A	PnosAscl.f	ATAATAGGCGCGCCTGATCATGAGCGGAGAATTAA GGG (SEQ ID No: 12)
casete Nos:nptII:nos	N/A	TnosAscl.r	ATAATAGGCGCGCCTAGTAAACATAGATGACACCGC G (SEQ ID No: 13)

**EJEMPLO 5**

10 Producción y análisis de plantas transgénicas de trébol blanco que llevan genes de TrBANa y TrPAP1 quiméricos de trébol blanco implicados en la biosíntesis de flavonoides

Se produjo un conjunto de plantas transgénicas de trébol blanco que llevaban genes de trébol blanco implicados en la biosíntesis de flavonoides, unión de proteínas, quelación de metales, antioxidación, absorción de luz UV,

tolerancia a estreses bióticos tales como virus, microorganismos, insectos y patógenos fúngicos; pigmentación por ejemplo en flores y hojas; calidad del herbaje y seguridad en cuanto a la inflamación y contenido de isoflavonoides que conduce a beneficios para la salud.

5 Se generaron vectores de transformación basados en pPZP221 con ADNc de TrBANA y TrPAP1 que comprendían las secuencias de marco de lectura abierto completas en orientaciones sentido y antisentido bajo el control del promotor de 35S de CaMV con región de potenciador duplicada (35S<sup>2</sup>), tal como se detalló en el ejemplo 4.

Se realizaron experimentos de transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* usando estos vectores de transformación.

10 La producción de plantas transgénicas de trébol blanco que llevan los ADNc de TrBANA y TrPAP1 de trébol blanco bajo el control del promotor de 35S de CaMV con y sin la región de potenciador duplicada (35S<sup>2</sup>) se describe en detalle en este caso. El procedimiento de selección se muestra en la figura 9.

#### Preparación de explantes cotiledonarios de trébol blanco

15 Se aclararon semillas de trébol blanco (cv "Mink") durante 5 minutos en agua de grifo corriente y se incubaron dos veces, durante 5 minutos en etanol al 70% v/v en un recipiente de cultivo tisular de 120 ml con agitación suave. Se usó el mismo recipiente para incubar las semillas durante 2 minutos en hipoclorito de sodio al 1% (razón 1:3 de lejía Domestos™ en agua) con agitación suave. Entonces se aclararon las semillas seis veces en agua estéril en una campana de flujo laminar y se incubaron durante 18 horas a 4°C en la oscuridad. Se extrajeron explantes cotiledonarios usando jeringas de 10 ml unidas a agujas de 21 G (Terumo, Japón) bajo el microscopio de disección en una campana de flujo laminar. Se separaron mediante pelado ambas capas del recubrimiento de la semilla, se eliminó mediante corte el extremo del hipocótilo y se separaron los cotiledones con aproximadamente 4 mm de hipocótilo y se transfirieron a una placa de Petri de 90 x 90 x 20 mm que contenía medio MGL.

#### Preparación de *Agrobacterium*

25 Se cultivó en línea la cepa AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía cada vector de expresión binario derivado de PZP221 en medio LB que contenía rifampicina 50 µg/ml y espectinomicina 100 µg/ml y se hizo crecer a 27°C durante 48 horas. Se usó una única colonia para inocular 5 ml de medio LB que contenía rifampicina 50 µg/ml y espectinomicina 100 µg/ml y se hizo crecer durante la noche a 27°C y 250 rpm en un agitador orbital. Se usó el cultivo durante la noche como inóculo para 40 ml de medio YEP que contenía espectinomicina 100 µg/ml y acetosiringona 40 mg/l. Se realizó la incubación durante la noche a 27°C y 250 rpm en un agitador orbital en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

30 Los cultivos durante la noche se centrifugaron durante 15 min. a 5500 xg y se descartó el sobrenadante. Volvieron a suspenderse las células en medios MGL con acetosiringona 40 mg/l hasta un volumen correspondiente a una lectura de DO<sub>600</sub> de 0,4. Entonces se incubaron las células a 27°C y 250 rpm hasta que la lectura de DO<sub>600</sub> alcanzó 0,8.

#### Cultivo conjunto y selección de transformantes de trébol blanco

35 Se eliminó el medio MGL de la placa de Petri que contenía explantes cotiledonarios de trébol blanco y se sustituyó por la suspensión de *Agrobacterium* preparada usando una pipeta serológica estéril. Se selló la placa de Petri con película de laboratorio, se cubrió con lámina de aluminio y se incubó con agitación suave durante 45 min. Se abrió la placa en la campana de flujo laminar y se retiró la suspensión de *Agrobacterium* con una pipeta. Entonces se transfirieron los explantes a placas que contenían medios RM73 con acetosiringona 40 mg/l (tabla 4) y se incubaron durante 3 días en una sala de cultivo de tejido vegetal a 22°C con un fotoperiodo de 16 horas. Después de esto, se transfirieron los explantes, con el extremo de hipocótilo en los medios, a placas que contenían medios RM73 con gentamicina 75 mg/l y cefotaxima 250 mg/l. Se transfirieron los explantes a placas recientes cada dos semanas durante 6-8 semanas. Entonces se transfirieron brotes a recipientes de cultivo tisular de 120 ml que contenían medios RIM (tabla 5) con gentamicina 75 mg/l y cefotaxima 250 mg/l. Cuando se habían desarrollado raíces, se transfirieron las plántulas a macetas de tierra y tras 2 semanas de recuperación en un banco de niebla, se hicieron crecer en condiciones de invernadero convencionales.

#### Preparación de ADN genómico

50 Se recogieron 1-2 folíolos de plantas de trébol blanco recuperadas del procedimiento de transformación y se liofilizaron. Se homogeneizó el tejido en un molino mezclador MM300 de Retsch, después se centrifugó durante 10 min. a 1700xg para recoger residuo celular. Se aisló ADN genómico del sobrenadante usando kits Wizard Magnetic 96 DNA Plant System (Promega) en un instrumento Biomek FX (Beckman Coulter). Entonces se analizaron 5 µl de la muestra (50 µl) en un gel de agarosa para comprobar el rendimiento y la calidad del ADN genómico.

Análisis de ADN de posibles líneas transgénicas usando PCR en tiempo real

Se analizó el ADN genómico para determinar la presencia del transgén mediante PCR en tiempo real usando química de SYBR Green. Se diseñaron pares de cebadores de PCR para detectar el gen de resistencia a la gentamicina aacC1 y el gen de resistencia a la kanamicina nptII en las regiones de ADN-T transferido de vectores de transformación binarios basados en pPZP221 y pPZPRCS2, respectivamente, usando MacVector (Accelrys). Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

5	nptII.f	5'-GGCTATGACTGGGCACAACA-3'	(SEQ ID No: 14)
	nptII.r	5'-ACCGGACAGGTCTGGTCTTG-3'	(SEQ ID No: 15)
	pZPaacC1-1.r.f	5'-TCAAGTATGGGCATCATTGCGAC-3'	(SEQ ID No: 16)
10	pZPaacC1-1.r	5'-TGCTCAAACCGGGCAGAACG-3'	(SEQ ID No: 17)

Se empleó 1 µl de cada muestra de ADN genómico en una reacción de PCR de 25 µl que incluía SYBR Green en un instrumento ABI (Applied Biosystems) junto con muestras que contenían ADN aislado de plantas de trébol blanco de tipo natural (cv "Mink", control negativo), muestras que contenían tampón en lugar de ADN (control de tampón) y muestras que contenían el plásmido usado para la transformación (control de plásmido positivo).

15 TABLA 4

<b>Composición de medios de cultivo tisular RM73, pH 5,75</b>		
Componente	[Disolución madre]	Para 1 litro
Macronutrientes de MS	10 x	100 ml
Micronutrientes de MS	100 x	10 ml
Vitaminas de MS	100 x	10 ml
TDZ	100 mM	50 µl
NAA	1 mM	0,5 ml
Sacarosa (BDH Chemicals)	-	30 g
Agar	-	8 g

TABLA 5

<b>Composición de medios de cultivo tisular inductores de raíz (RIM73), pH 5,75</b>		
Componente	[Disolución madre]	Para 1 litro
Macronutrientes de MS	10 x	100 ml
Micronutrientes de MS	100 x	10 ml
Vitaminas de MS	100 x	10 ml
Ácido indol-3-butírico	1 mM	1,2 ml

(continuación)

Composición de medios de cultivo tisular inductores de raíz (RIM73), pH 5,75		
Sacarosa (BDH Chemicals)	-	15 g
Agar (Becton-Dickinson)	-	8 g

**EJEMPLO 6**

5 Análisis de taninas condensadas y sus monómeros en las hojas de plantas de trébol blanco transgénicas que llevan genes de TrPAP1 y TrBANA de trébol blanco quimérico implicados en la biosíntesis de flavonoides

Se analizó cualitativamente la acumulación de taninas condensadas y sus monómeros en hojas de plantas de trébol blanco transgénicas y de tipo natural (cv "Mink") usando tinción con 4-dimetilaminocinamaldehído (DMACA). Se decoloraron dos folíolos maduros de cada planta en etanol absoluto en placas de cultivo tisular de 6 pocillos durante 3 horas con agitación suave. Se eliminó el etanol y se sustituyó por una disolución al 0,01% p/v de DMACA (Fluka), recién preparada en etanol absoluto con ácido clorhídrico concentrado al 2,4% v/v. Tras 1 hora de incubación con agitación suave, se aclararon los folíolos con agua destilada y se montaron en glicerol al 50% para su análisis con un microscopio de disección. Las plantas de trébol blanco de tipo natural mostraron tinción azul en células epidérmicas en los órganos florales y en tricomas. *Lotus corniculatus* (cv "Draco"), una legumbre de forraje con un nivel "seguro en cuanto a la inflamación" de taninas condensadas en las hojas, muestra tinción azul de aproximadamente el 50% de las células mesófilas en las hojas (figura 10). Alcanzar un nivel de taninas condensadas en hojas de trébol blanco que sea comparable al nivel observado en hojas de *L. corniculatus* mediante ingeniería metabólica sería valioso desde el punto de vista de la agricultura.

La tinción con DMACA puede detectar niveles económicamente significativos de taninas condensadas y sus monómeros en las hojas de legumbres de forraje seguras en cuanto a la inflamación establecida. Sin embargo, la condensación de monómeros de catequinas para formar taninas condensadas y su transporte desde el citoplasma hasta la vacuola se entienden poco. Por tanto, modificar la regulación de enzimas y factores de transcripción conocidos en la ruta de flavonoides puede regular por incremento los niveles de catequinas pero no aumentar los niveles de taninas condensadas, y, por tanto, la seguridad en cuanto a la inflamación. El ensayo de PVPP-butanol-HCl sólo detecta taninas condensadas, basándose en la capacidad de las taninas condensadas, pero no de sus monómeros, de unirse a PVPP. El método detallado es tal como sigue.

Se sometió a congelación instantánea tejido de hojas e inflorescencias (control positivo) de trébol y se trituró para obtener un polvo fino en un mortero y mano de almirez bajo nitrógeno líquido. Tras la trituración, se transfirieron 0,75 g del polvo de cada muestra a un tubo de centrifugadora de 14 ml con tapa de rosca (Falcon), se mezcló con vórtice con 1,5 ml de tampón de extracción que contenía metanol al 80% v/v en agua destilada con bisulfito de sodio 5,3 mM. Se mezclaron las muestras durante 5 horas en una rueda mezcladora antes de la centrifugación a 3000 xg durante 10 minutos. Se transfirió una alícuota de 1 ml de cada sobrenadante a un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml y se redujo hasta 0,25 ml en una centrifugadora de vacío. Se añadieron volúmenes iguales de la muestra a cada uno de dos 1,5 ml tubos de microcentrifugadora que contenían 25 mg de polivinil-polipirrolidona (PVPP). Se mezcló con vórtice cada mezcla de manera intermitente durante 15 min. y se centrifugaron durante 1 min. a velocidad máxima en una microcentrifugadora. Tras la eliminación del sobrenadante, se lavó el sedimento cuatro veces con 1 ml de metanol, con una etapa de centrifugación de 1 min. a velocidad máxima en una microcentrifugadora entre cada lavado. Se añadió una disolución recién preparada 70:30 (v/v) de butanol y ácido clorhídrico concentrado a cada sedimento y se incubó un tubo de mezcla durante 1 hora a 70°C, mientras que el otro tubo se incubó a temperatura ambiente. La diferencia en la absorbancia (530 nm) entre los dos tubos de cada muestra de planta fue proporcional al nivel de taninas condensadas en la muestra. Este ensayo puede cuantificarse con una tanina condensada de concentración conocida, aunque en este experimento sólo se midieron los niveles relativos de taninas.

**EJEMPLO 7**

45 Diseño de cebadores de RT-PCR en tiempo real basándose en las secuencias de ADNc del gen de TrPAP1 de trébol

La RT-PCR en tiempo real es una técnica recientemente desarrollada que permite análisis más cuantitativos de la expresión génica que experimentos de tipo Northern o RT-PCR convencional. Esencialmente, la RT-PCR en tiempo real con química de SYBR Green y cebadores específicos de genes implica la medición automática del nivel de un producto de PCR fluorescente generado a partir de una especie de ADNc a lo largo de cada ciclo. La abundancia de cada molde es proporcional a la tasa de amplificación. Por tanto, un umbral correspondiente al inicio de la fase



exponencial de PCR permite normalizar la abundancia relativa de genes diana frente a un gen “de mantenimiento” expresado de manera uniforme en cada tejido y compararla con un control negativo sin molde. La RT-PCR en tiempo real con química de SYBR Green se ha usado satisfactoriamente en el campo para cuantificar la expresión de cuatro genes relacionados con flavonoides en plantas de *Lotus comiculatus* expuestas a diferentes regímenes de luz (Paolucci *et al.* 2005).

Se usó una estrategia de RT-PCR en tiempo real que implicaba química de SYBR Green y el método de  $\delta\delta CT$  de análisis para caracterizar la expresión de TrPAP1 y TrBANa, en tejidos de trébol blanco que contenían niveles altos y bajos de taninas condensadas, con respecto a la expresión de los genes expresados de manera ubicua, factor de elongación  $1\alpha$  (SAMS) y S-adenosil-metionina sintasa (SAMS). Este enfoque estaba dirigido a determinar si TrPAP1 y TrBANa están implicados en la producción de taninas condensadas, o en la producción de otros flavonoides, y por tanto podían seleccionarse como diana para la sobreexpresión o regulación por disminución mediante ingeniería metabólica de trébol blanco seguro en cuanto a la inflamación.

Se usaron las secuencias de ADNc de longitud completa de homólogos de TrPAP1, TrBANa, SAMS y EF- $1\alpha$  de trébol blanco como datos de entrada para el programa de diseño de cebadores Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.), usando las configuraciones por defecto, sin pinza GC en 3' y un tamaño de amplicón previsto de 50-150 pares de bases. Se prefirieron cebadores cerca de los extremos 3' de las secuencias de entrada, debido a la posibilidad de que un gran número de moléculas de ADNc derivadas de muestras de trébol estén incompletas en el extremo 5'. Las secuencias de los cebadores elegidos se muestran en la tabla 6.

Se confirmó la especificidad de los conjuntos de cebadores usando 1 ul de ADN de plásmido (0,01 ng/ul) del ADNc original clonado en pGEM-T Easy o agua purificada sometida a autoclave, 12,5 ul de mezcla maestra de SYBR Green 2x (Applied Biosystems), 0,5 ul de cada uno de los cebadores directo e inverso (10 uM) y 10,5 ul de agua purificada sometida a autoclave (Sartorius AG, Goettingen, Alemania). Se realizó la PCR en tiempo real en placas de PCR ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems) usando el ciclador MX3000P de Stratagene y los siguientes parámetros de ciclado: 95°C durante 10 min., 40 ciclos de 95°C durante 30 s y 60°C durante 1 min., seguido por 55°C durante 1 min. y 95°C durante 1 min. con un punto de corte de umbral de ciclo de 24 ciclos

Se mostró mediante tinción con DMACA que capullos de la mitad inferior de inflorescencias inmaduras de trébol blanco Mink están enriquecidos para taninas condensadas (figura 10). Por tanto se sometió a prueba la expresión de los genes de PAP1 y BAN de trébol en los capullos de trébol blanco (cv Mink), con respecto a la expresión de un gen de control de histona de trébol. Se extrajo el ARN total de las mitades superior e inferior de inflorescencias inmaduras así como inflorescencias inmaduras completas usando el kit RNeasy (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) y se digirió el ADN genómico contaminante en la columna usando la digestión opcional en columna con ADNasa según las instrucciones de los fabricantes. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 0,5 ug de ARN total usando el kit de transcriptasa inversa Quantitect (QIAGEN GmbH). Se configuraron reacciones de RT-PCR en tiempo real y se ejecutaron tal como se describió anteriormente usando 1 ul de ADNc, ADN de control de plásmido o agua purificada sometida a autoclave como molde. La expresión de homólogos de BAN y PAP1 de trébol se correlacionó bien con la producción de taninas condensadas en capullos maduros dentro de la mitad inferior de inflorescencias inmaduras de trébol blanco (figura 11).

TABLA 6

<b>Lista de cebadores diseñados para el análisis mediante RT-PCR en tiempo real de órganos ricos en taninas condensadas de trébol blanco, basándose en las secuencias de ADNc de genes de trébol blanco</b>			
<b>Nombre del gen</b>	<b>ID del clon</b>	<b>Cebador 1 (directo)</b>	<b>Cebador 2 (inverso)</b>
TrEF- $1\alpha$	14wc2PsG04	TCGAGAAGGAAGCTGCTGAAA (SEQ ID No: 18)	CCCAGGCATACTTGAATGACCT (SEQ ID No: 19)
TrSAMS	05wc3HsD02	AGAGGAGGTTGGTGCTGGTG (SEQ ID No: 20)	TCAGTGGCATAGCCAAACATGT (SEQ ID No: 21)
TrBANa	05wc2XsG02	TTGCTACACCTGTGAACCTTTGCTT (SEQ ID No: 22)	GCAATTGCTTTCAACACATTCAAC (SEQ ID No: 23)
TrPAP1	05wc1SsA01	ATCGAGTTCCTCTGTTGGCAG (SEQ ID No: 24)	GCCTACAACCTTTTCGGCATCT (SEQ ID No: 25)

También debe entenderse que el término “comprende” (o sus variantes gramaticales) tal como se usa en esta memoria descriptiva es equivalente al término “incluye” y no debe interpretarse como que excluye la presencia de otros elementos o características.

5 Los documentos mencionados en esta memoria descriptiva son únicamente para fines de referencia y su inclusión no es un reconocimiento de que forman parte del conocimiento general común en la técnica relevante.

Lista de secuencias

<110> Agriculture Victoria Services Pty Ltd

<120> Modificación de la biosíntesis de flavonoides en plantas

<130> 81117307

10 <150> 2005905942

<151> 26-10-2005

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 583

<212> ADN

<213> *Trifolium repens*

<400> 1

ataacacaat attatatata aaagaagatg ctggtgatgg cttgattatt atgagtgtga	60
aaagtgggtg tgtttgtaga gtctcataag atgggtgggtg ttgcatggac agaagaagaa	120
gatcatttgc ttaagaaatg catacaaaa tatggtgaag gaaagtggca tcgagttcct	180
ctgttggcag gtctaaacag atgccgaaag agttgtaggc taagatggtt gaactatctc	240
cgtcctaaca tcaagagagg aaattttgct gaggaggaag ttgaaatgat tgtcaaaacta	300
cacaaattat taggcaacag atgggtcccta attgcaggaa ggctaccagg aaggacagca	360
aatgatgtga aaaactattg gaattgtcat ctaagcaaaa gagtaaattgc tctagaagct	420
gaccaagatg gatcacaatt atccaaagat gttcaaatca ttatgccaca gccaaagaaac	480
aatggttcaa gctcaacaat gaagagaagg agccaaggag actcaccaac taatcaagtt	540
ctagttgaac aagagagtga catgacaaaa tttgatgctg atg	583

20 <210> 2

<211> 164

<212> PRT

<213> *Trifolium repens*

<400> 2

ES 2 416 712 T3

Met Gly Gly Val Ala Trp Thr Glu Glu Glu Asp His Leu Leu Lys Lys  
 1 5 10 15

Cys Ile Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Lys Trp His Arg Val Pro Leu Leu  
 20 25 30

Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Leu Asn  
 35 40 45

Tyr Leu Arg Pro Asn Ile Lys Arg Gly Asn Phe Ala Glu Glu Glu Val  
 50 55 60

Glu Met Ile Val Lys Leu His Lys Leu Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu  
 65 70 75 80

Ile Ala Gly Arg Leu Pro Gly Arg Thr Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr  
 85 90 95

Trp Asn Cys His Leu Ser Lys Arg Val Asn Ala Leu Glu Ala Asp Gln  
 100 105 110

Asp Gly Ser Gln Leu Ser Lys Asp Val Gln Ile Ile Met Pro Gln Pro  
 115 120 125

Arg Asn Asn Gly Ser Ser Ser Thr Met Lys Arg Arg Ser Gln Gly Asp  
 130 135 140

Ser Pro Thr Asn Gln Val Leu Val Glu Gln Glu Ser Asp Met Thr Lys  
 145 150 155 160

Phe Asp Ala Asp

<210> 3

5 <211> 1161

<212> ADN

<213> *Trifolium repens*

<400> 3

ES 2 416 712 T3

aattcgatta agcagtggt acaacgcaga gtacgcgggg acatcttcaa gaaacatgtg	60
tgtgtgtcaa ttcacataac acaatattat atataaaaga agatgctggt gatggcttga	120
ttattatgag tgtgaaaagt ggtggtgttt gtagagtctc ataagatggg tgggtttgca	180
tggacagaag aagaagatca tttgcttaag aaatgcatac aacaatatgg tgaaggaaag	240
tggcatcgag ttcctctggt ggcaggtcta aacagatgcc gaaagagttg taggctaaga	300
tggttgaact atctccgtcc taacatcaag agaggaaatt ttgctgagga ggaagttgaa	360
atgattgtca aactacacaa attattaggc aacagatggt ccctaattgc aggaaggcta	420
ccaggaagga cagcaaatga tgtgaaaaac tattggaatt gtcatctaag caaaagagta	480
aatgctctag aagctgacca agatggatca caattatcca aagatgttca aatcattatg	540
ccacagccaa gaaacaatgg ttcaagctca acaatgaaga gaaggagcca aggagactca	600
ccaactaatc aagttctagt tgaacaagag agtgacatga caaaatttga tgctgatgga	660
aagaacaata tgattgaatc acaacaagac atgatgatgt attcatgctt agatcaacaa	720
ggtatgttta gtgagtttcc aatggacttt caattagaag gatttgaagc tatggtaagt	780
ggaggagaag gtagtagtag ccaatggaat tgggatgatt tgctcttaga tatggatatg	840
tataatgatt tttcttctta gattatcatc ccttgttatg tttctaatag ggaagacaat	900
ggtagtcttt ataccttgggt tgtgtattaa tatcaaagtt aaatgttttc caaggaaatg	960
catggtaact aaattggca tgtatthttgt aaattgaagt cattgctaataaaaataacc	1020
aataaagtcg gtcttgtaag gccgagttag tccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ataaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agtactctgc	1140
gttgttacca ctgcttaatc a	1161

<210> 4

<211> 231

5 <212> PRT

<213> *Trifolium repens*

<400> 4

ES 2 416 712 T3

Met Gly Gly Val Ala Trp Thr Glu Glu Glu Asp His Leu Leu Lys Lys  
 1 5 10 15

Cys Ile Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Lys Trp His Arg Val Pro Leu Leu  
 20 25 30

Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Leu Asn  
 35 40 45

Tyr Leu Arg Pro Asn Ile Lys Arg Gly Asn Phe Ala Glu Glu Glu Val  
 50 55 60

Glu Met Ile Val Lys Leu His Lys Leu Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu  
 65 70 75 80

Ile Ala Gly Arg Leu Pro Gly Arg Thr Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr  
 85 90 95

Trp Asn Cys His Leu Ser Lys Arg Val Asn Ala Leu Glu Ala Asp Gln  
 100 105 110

Asp Gly Ser Gln Leu Ser Lys Asp Val Gln Ile Ile Met Pro Gln Pro  
 115 120 125

Arg Asn Asn Gly Ser Ser Ser Thr Met Lys Arg Arg Ser Gln Gly Asp  
 130 135 140

Ser Pro Thr Asn Gln Val Leu Val Glu Gln Glu Ser Asp Met Thr Lys  
 145 150 155 160

Phe Asp Ala Asp Gly Lys Asn Asn Met Ile Glu Ser Gln Gln Asp Met  
 165 170 175

Met Met Tyr Ser Cys Leu Asp Gln Gln Gly Met Phe Ser Glu Phe Pro  
 180 185 190

Met Asp Phe Gln Leu Glu Gly Phe Glu Ala Met Val Ser Gly Gly Glu  
 195 200 205

Gly Ser Ser Ser Gln Trp Asn Trp Asp Asp Leu Leu Leu Asp Met Asp  
 210 215 220

Met Tyr Asn Asp Phe Ser Ser

225

230

<210> 5

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Sintético

## ES 2 416 712 T3

	<400> 5		
	caggaaggac agcaaatga	19	
	<210> 6		
	<211> 60		
5	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 6		
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt ctgagcact agtgtgtata agtttcttg	60	
	<210> 7		
10	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 7		
	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tagatcaaaa tctaattctt cagtgc	56	
15	<210> 8		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
	<400> 8		
20	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catgggtggt gttgcatgga c	51	
	<210> 9		
	<211> 57		
	<212> ADN		
	<213> Sintético		
25	<400> 9		
	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctaagaagaa aaatcattat acatatc	57	
	<210> 10		
	<211> 32		
	<212> ADN		
30	<213> Sintético		
	<400> 10		

# ES 2 416 712 T3

	ataataaccg gtgcccgggg atctccttg cc	32
	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> ADN	
5	<213> Sintético	
	<400> 11	
	ataatagcgg ccgcatgcat gttgtcaatc aattgg	36
	<210> 12	
	<211> 38	
10	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 12	
	ataataggcg cgctgatca tgagcggaga attaaggg	38
	<210> 13	
15	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 13	
	ataataggcg cgctagtaa catagatgac accgcg	36
20	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 14	
25	ggctatgact gggcacaaca	20
	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
30	<400> 15	
	accggacagg tcggtctg	19

# ES 2 416 712 T3

	<210> 16	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
5	<400> 16	
	tcaagtatgg gcatcattcg cac	23
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Sintético	
	<400> 17	
	tgctcaaacc gggcagaacg	20
	<210> 18	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 18	
	tcgagaagga agctgctgaa a	21
	<210> 19	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 19	
	cccaggcata ctggaatgac ct	22
25	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 20	
30	agaggaggtt ggtgctggtg	20
	<210> 21	



<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Sintético  
 <400> 21

5 tcagtgcat agccaaacat gt 22  
 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Sintético

10 <400> 22  
 ttgctacacc tgtgaactt gctt 24  
 <210> 23  
 <211> 24  
 <212> ADN

15 <213> Sintético  
 <400> 23  
 gcaattgctt tcaacacatt caac 24  
 <210> 24  
 <211> 21

20 <212> ADN  
 <213> Sintético  
 <400> 24  
 atcgagtcc tctgttgca g 21  
 <210> 25

25 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Sintético  
 <400> 25  
 gcctacaact ctttcggcat ct 22

30 Bibliografía

Frohman *et al.* (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-

specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998

Gish y States (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. Nature Genetics 3:266-272

5 Goderis, I. J. W.M., De Bolle, M. F.C., Francois, I. E.J. A., Wouters, P. F. J., Broekaert, W. F. y Cammue, B. P. A. (2002). A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. Plant Mol. Biol. 50:17-27.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. (1994). The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol. Biol. 25:989-994.

10 Loh, E.Y., Elliott, J.F., Cwirla, S., Lanier, L.L., Davis, M.M. (1989). Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T-cell receptor delta chain. Science 243:217-220

Ohara, O., Dorit, R.L., Gilbert, W. (1989). One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5673-5677

15 Paolucci, F., Bovone, T. Tosti, N., Arcioni, S. y Damiani, F. (2005). Light and an exogenous transcription factor qualitatively and quantitatively affect the biosynthetic pathway of condensed tannins in Lotus corniculatus leaves. J. Exp. Bot. 56: 1093-1103

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico purificado o aislado que codifica para una proteína de pigmento de antocianina púrpura 1 (PAP1), o un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico que codifica para una secuencia que es complementaria o antisentido con respecto a una secuencia que codifica para una proteína PAP1, incluyendo dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) secuencias mostradas en las figuras 1 y 4 en el presente documento (ID de secuencia n.<sup>os</sup>: 1 y 3, respectivamente);
- (b) complementos de las secuencias mencionadas en (a);
- 10 (c) fragmentos funcionalmente activos de las secuencias mencionadas en (a) y (b), que pueden modificar la biosíntesis de flavonoides en una planta y que tienen un tamaño de al menos 60 nucleótidos;
- (d) variantes funcionalmente activas de las secuencias mencionadas en (a) y (b) que pueden modificar la biosíntesis de flavonoides en una planta y que tienen al menos el 90% de identidad con la secuencia mencionada en (a) o (b).
- 15 2. Ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que dichas variantes funcionalmente activas tienen al menos el 95% de identidad con la secuencia mencionada en (a) o (b).
3. Ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 1, incluyendo dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en (a) secuencias mostradas en las figuras 1 y 4 en el presente documento (ID de secuencia n.<sup>os</sup>: 1 y 3, respectivamente) y (b) complementos de las secuencias mencionadas en (a).
- 20 4. Ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según la reivindicación 1, incluyendo dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias mostradas en las figuras 1 y 4 en el presente documento (ID de secuencia n.<sup>os</sup>: 1 y 3, respectivamente).
5. Constructo que incluye un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 6. Vector que incluye un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Vector según la reivindicación 6, que incluye además un promotor y un terminador, estando dicho promotor, ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico y terminador operativamente unidos.
- 30 8. Vector según la reivindicación 6 ó 7, que incluye además un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico que codifica para ANR (*banyuls*).
9. Célula vegetal, planta, semilla de planta u otra parte de planta, que incluye un constructo según la reivindicación 5 o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
10. Planta, semilla de planta u otra parte de planta derivada de una célula vegetal o planta según la reivindicación 9 y que incluye un constructo según la reivindicación 5 o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
- 35 11. Método de modificación de
- (a) la biosíntesis de flavonoides en una planta,
- (b) la quelación de metales, antioxidación y/o absorción de luz UV en una planta,
- (c) la producción de pigmentos en una planta,
- (d) la defensa de la planta frente a un estrés biótico, o
- 40 (e) la calidad del forraje de una planta,
- incluyendo dicho método introducir en dicha planta una cantidad eficaz de un ácido nucleico o fragmento de ácido

nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un constructo según la reivindicación 5 o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho estrés biótico se selecciona del grupo que consiste en virus, microorganismos, insectos y patógenos fúngicos.

5 13. Uso de un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y/o información de secuencia de nucleótidos del mismo, y/o polimorfismos de un único nucleótido del mismo como marcador genético molecular.

14. Polipéptido de PAP1 purificado o aislado que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

10 (a) secuencias mostradas en las figuras 2 y 5 en el presente documento (ID de secuencia n.<sup>os</sup>: 2 y 4, respectivamente); y

(b) variantes funcionalmente activas de las secuencias mencionadas en (a) que tienen una o más de las propiedades biológicas de PAP1 y que tienen al menos el 90% de identidad con ID de secuencia n.<sup>o</sup>: 2 o ID de secuencia n.<sup>o</sup>: 4.

15 15. Polipéptido según la reivindicación 14, incluyendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID de secuencia n.<sup>o</sup>: 2 e ID de secuencia n.<sup>o</sup>: 4.

16. Polipéptido purificado o aislado codificado por un ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

20 17. Método de potenciación de la calidad del herbaje y/o seguridad en cuanto a la inflamación en una planta, incluyendo el método sobreexpresar PAP1 y ANR (*banyuls*) en dicha planta de una manera secuencial, simultánea o combinada, e incluyendo el método introducir en dicha planta uno o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y uno o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico que codifican para ANR (*banyuls*).

18. Método según la reivindicación 17, en el que dicha planta es una planta de pasto.

25

# ES 2 416 712 T3

TrPAP1 : ATAACACAATATTATATATAAAAAGAAGATGCTGGTGATGGCTTGATTATTATGAGTGTGA : 60  
\* 20 \* 40 \* 60

TrPAP1 : AAAGTGGTGGTGTGTTGTAGAGTCTCATAAGATGGGTGGTGTTCATGGACAGAAGAAGAA : 120  
\* 80 \* 100 \* 120

TrPAP1 : GATCATTTGCTTAAGAAATGCATACAACAATATGGTGAAGGAAAGTGGCATCGAGTTCCT : 180  
\* 140 \* 160 \* 180

TrPAP1 : CTGTTGGCAGGTCTAAACAGATGCCGAAAGAGTTGTAGGCTAAGATGGTTGAACTATCTC : 240  
\* 200 \* 220 \* 240

TrPAP1 : CGTCCTAACATCAAGAGAGGAAATTTGCTGAGGAGGAAGTTGAAATGATTGTCAAACCTA : 300  
\* 260 \* 280 \* 300

TrPAP1 : CACAAATATTAGGCAACAGATGGTCCCTAATTGCAGGAAGGCTACCAGGAAGGACAGCA : 360  
\* 320 \* 340 \* 360

TrPAP1 : AATGATGTGAAAACTATTGGAATTGTCATCTAAGCAAAAGAGTAAATGCTCTAGAAGCT : 420  
\* 380 \* 400 \* 420

TrPAP1 : GACCAAGATGGATCACAATTATCCAAAGATGTTCAAATCATTATGCCACAGCCAAGAAAC : 480  
\* 440 \* 460 \* 480

TrPAP1 : AATGGTTCAAGCTCAACAATGAAGAGAAGGAGCCAAGGAGACTCACCAACTAATCAAGTT : 540  
\* 500 \* 520 \* 540

TrPAP1 : CTAGTTGAACAAGAGAGTGACATGACAAAATTTGATGCTGATG : 583  
\* 560 \* 580

## Figura 1

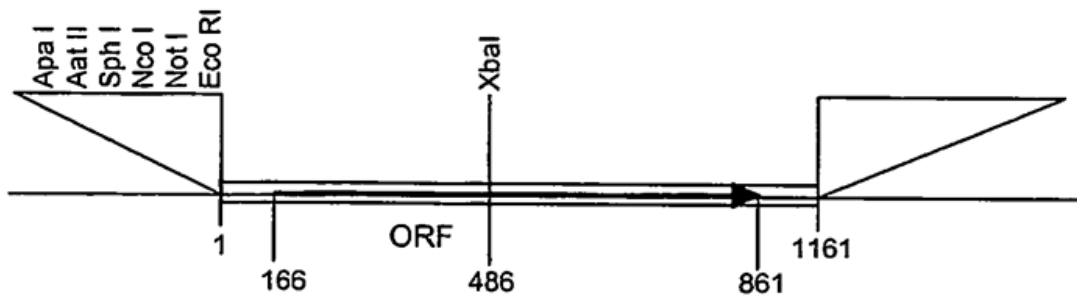
# ES 2 416 712 T3

```
      *      20      *      40      *      60
TrPAP1 : MGGVAWTEEDHLLKKCIQQYGEKWHRVPLLAGLNRCRKSCRLRWLNLYLRPNIKRGNFA : 60

      *      80      *      100     *      120
TrPAP1 : EEEVEMIVKLHKLLGNRWSLIAGRLPGRRTANDVKNYWNCHLSKRVNALEADQDGSQLSKD : 120

      *      140     *      160
TrPAP1 : VQIIMPQPRNNGSSSTMKRRSQGDSPTNQVLVEQESDMTKFDAD : 164
```

## Figura 2



**Figura 3**

ES 2 416 712 T3

```
      *      20      *      40      *      60
: AATTCGATTAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGACATCTTCAAGAAACATGTG : 60

      *      80      *      100     *      120
: TGTGTGTCAATTCACATAACACAATATTATATATAAAAAGAAGATGCTGGTGATGGCTTGA : 120

      *      140     *      160     *      180
: TTATTATGAGTGTGAAAAGTGGTGGTGTGTTGTAGAGTCTCATAAGATGGGTGGTGTGCA : 180

      *      200     *      220     *      240
: TGGACAGAAGAAGAAGATCATTTGCTTAAGAAATGCATACAACAATATGGTGAAGGAAAAG : 240

      *      260     *      280     *      300
: TGGCATCGAGTTCCTCTGTTGGCAGGTCTAAACAGATGCCGAAAGAGTTGTAGGCTAAGA : 300

      *      320     *      340     *      360
: TGGTTGAACTATCTCCGTCCCTAACATCAAGAGAGGAAATTTGCTGAGGAGGAAGTTGAA : 360

      *      380     *      400     *      420
: ATGATTGTCAAACACACAAATTATTAGGCAACAGATGGTCCCTAATTGCAGGAAGGCTA : 420

      *      440     *      460     *      480
: CCAGGAAGGACAGCAAATGATGTGAAAAACTATTGGAATTGTCATCTAAGCAAAAGAGTA : 480

      *      500     *      520     *      540
: AATGCTCTAGAAGCTGACCAAGATGGATCACAATTATCCAAAGATGTTCAAATCATTATG : 540

      *      560     *      580     *      600
: CCACAGCCAAGAAACAATGGTTCAAGCTCAACAATGAAGAGAAGGAGCCAAGGAGACTCA : 600

      *      620     *      640     *      660
: CCAACTAATCAAGTTC TAGTTGAACAAGAGAGTGACATGACAAAATTTGATGCTGATGGA : 660

      *      680     *      700     *      720
: AAGAACAATATGATTGAATCACAACAAGACATGATGATGTATTGATGCTTAGATCAACAA : 720

      *      740     *      760     *      780
: GGTATGTTTAGTGAGTTTCCAATGGACTTTCAATTAGAAGGATTTGAAGCTATGGTAAGT : 780
```

Figura 4



ES 2 416 712 T3

```
      *      800      *      820      *      840
: GGAGGAGAAGGTAGTAGTAGCCAATGGAATTGGGATGATTTGCTCTTAGATATGGATATG : 840

      *      860      *      880      *      900
: TATAATGATTTTTCTTCTTAGATTATCATCCCTTGTTATGTTTCTAATAGGGAAGACAAT : 900

      *      920      *      940      *      960
: GGTAGTCTTTATACCTTGGTTGTGTATTAATATCAAAGTTAAATGTTTTCCAAGGAAATG : 960

      *      980      *     1000      *     1020
: CATGGTAACTAAATTGGTCATGTATTTGTAAATTGAAGTCATTGCTAATAAAATTAACC : 1020

      *     1040      *     1060      *     1080
: AATAAAGTCGGTCTTGTAAGGCCGAGTTAGTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 1080

      *     1100      *     1120      *     1140
: AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGC : 1140

      *     1160
: GTTGTACCCTGCTTAATCA : 1161
```

**Figura 4 (cont)**

ES 2 416 712 T3

\*            20            \*            40            \*            60  
: MGGVAWTEEEDHLLKKCIQQYGEGKWHRVPLLAGLNRCRKSCRLRWLNLYLRPNIKRGNFA : 60

\*            80            \*            100            \*            120  
: EEEVEMIVKLLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNCHLSKRVNALEADQDGSQLSKD : 120

\*            140            \*            160            \*            180  
: VQIIMPQPRNNGSSSTMKRRSQGDSPTNQVLVEQESDMTKFDADGKNNMIESQDMMYS : 180

\*            200            \*            220            \*  
: CLDQQGMFSEFPMDFQLEGFEAMVSGGEGSSSQWNWDDLLLDMDMYNDFSS : 231

**Figura 5**

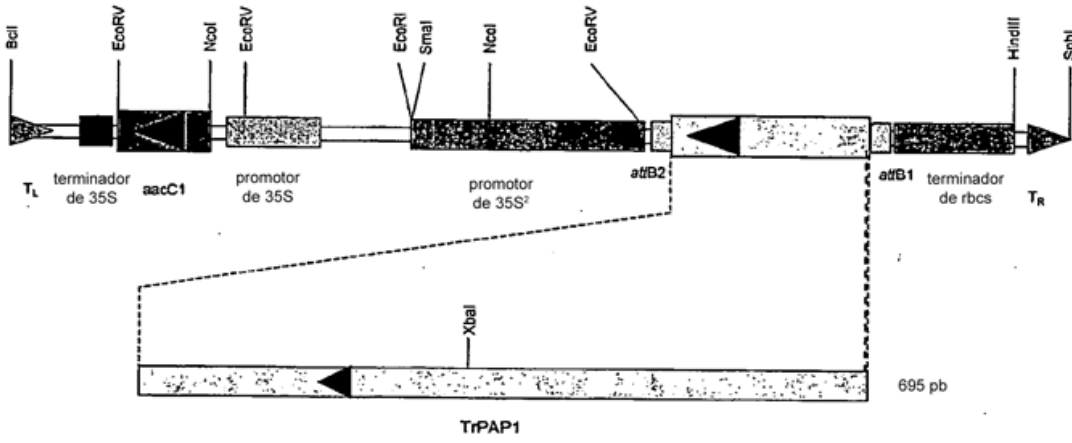
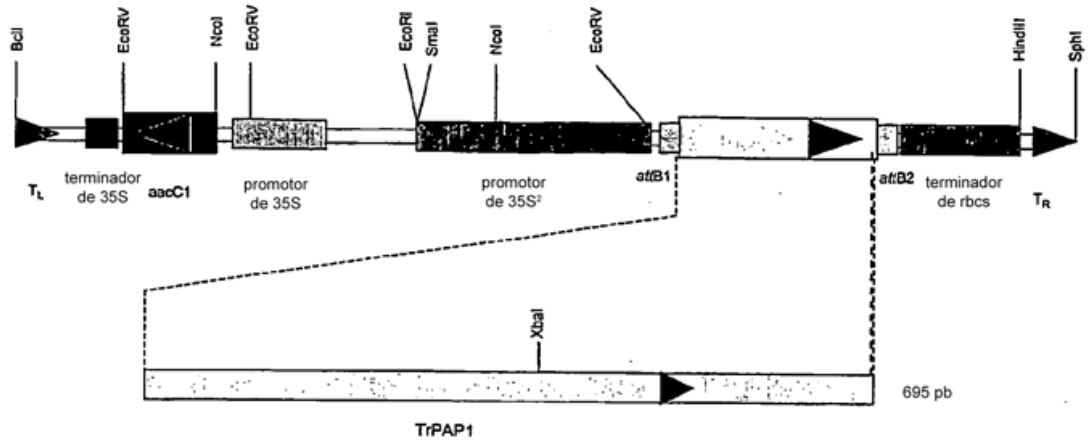


Figura 6

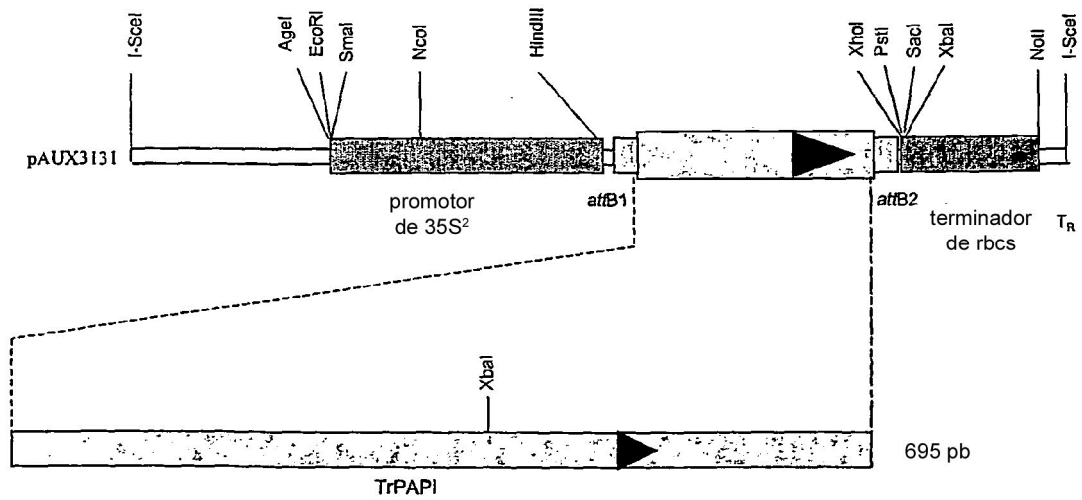
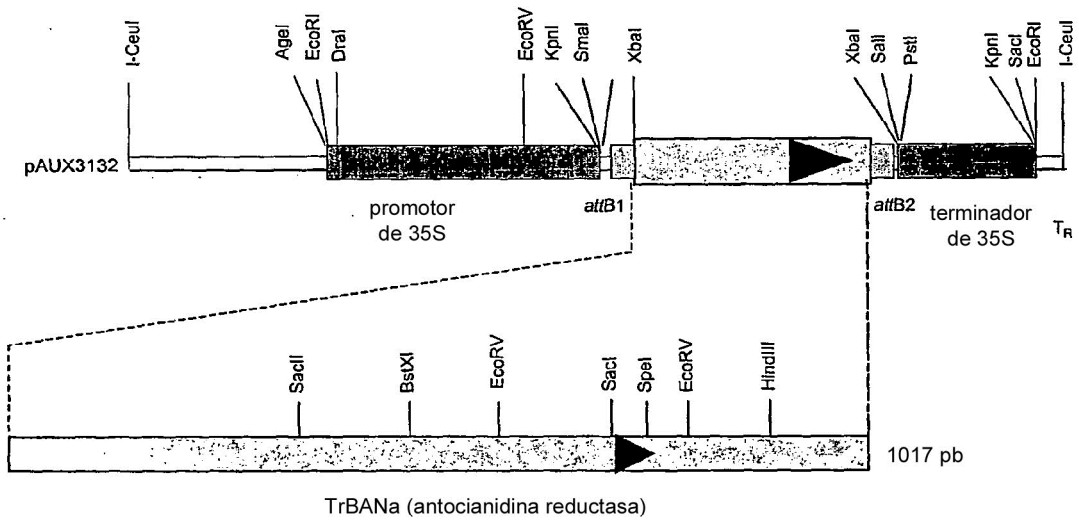
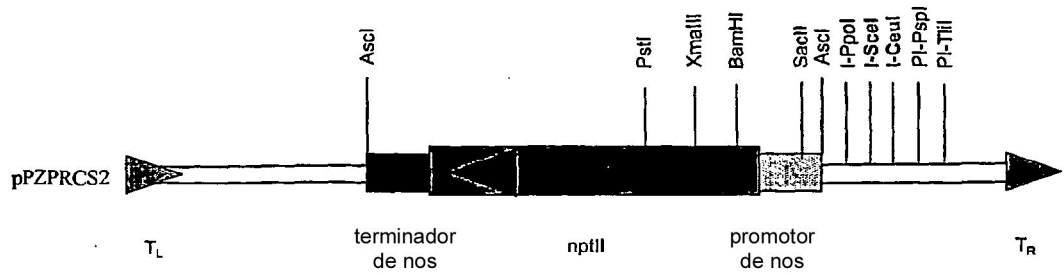


Figura 7

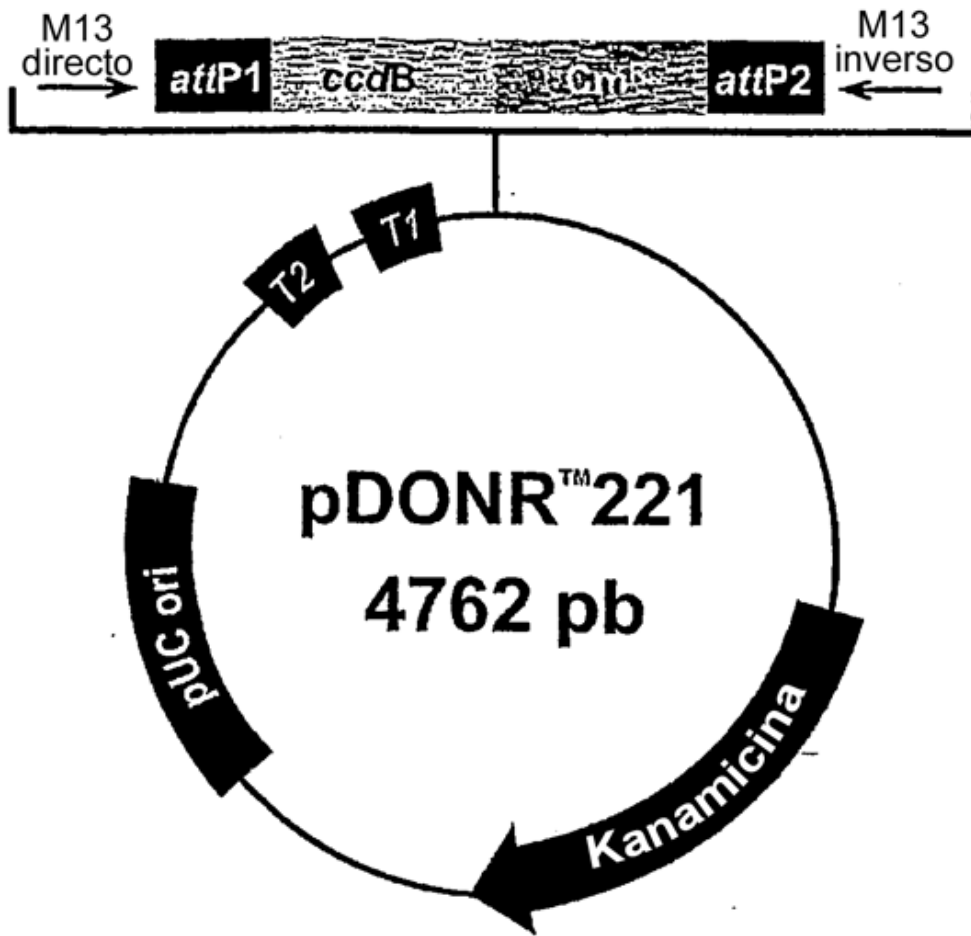
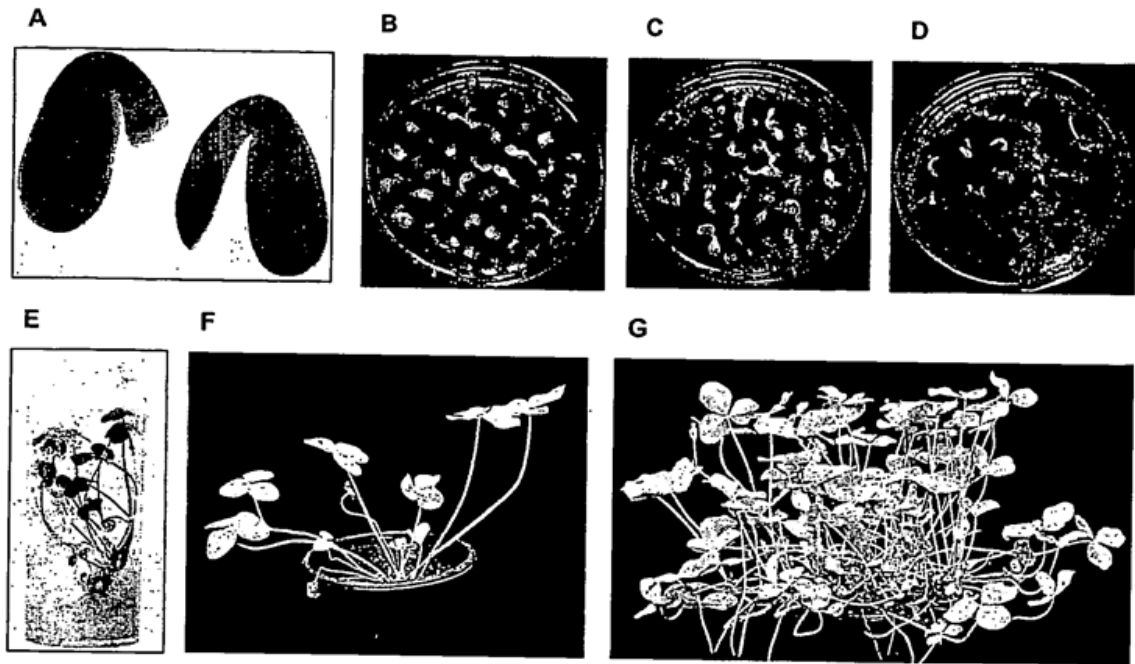
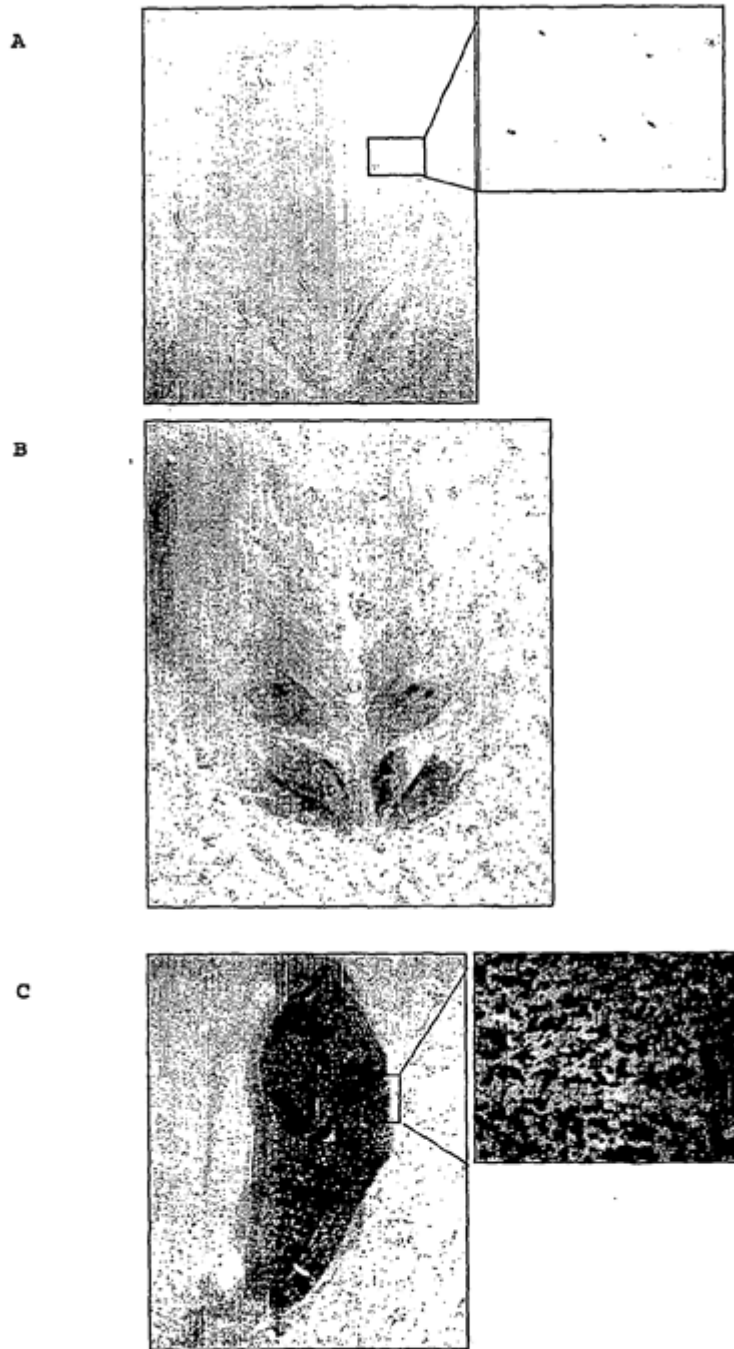


Figura 8



**Figura 9**



**Figura 10**

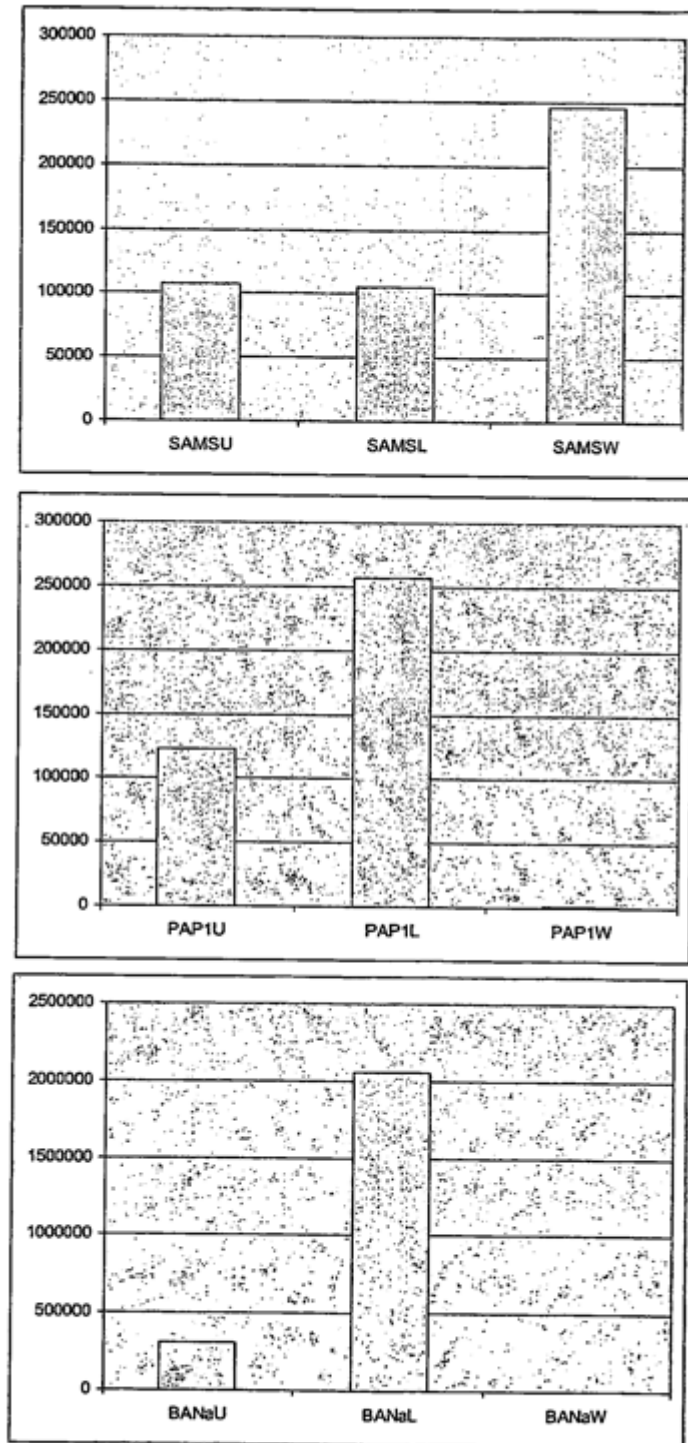


Figura 11