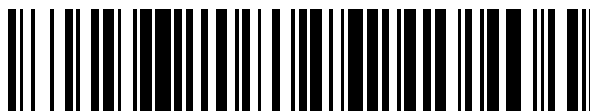


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 213**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A23L 1/217 (2006.01)

C12N 9/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2006 E 10004151 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2333076**

54 Título: **Alimentos de bajo contenido en acrilamida**

30 Prioridad:

20.09.2005 US 718335 P

28.07.2006 US 833788 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2015

73 Titular/es:

J.R. SIMPLOT COMPANY (100.0%)
Simplot Plant Sciences 5369 W. Irving Street
Boise, ID 83706, US

72 Inventor/es:

ROMMENS, CAIUS

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 538 213 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

Alimentos de bajo contenido en acrilamida

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a métodos genéticos para la regulación negativa y sobreexpresión de genes en una planta, por ejemplo en los órganos de almacenamiento ricos en almidón de estas plantas, para reducir el nivel de acrilamida que se acumula después del calentamiento asociado al procesamiento de estos órganos.

10

Antecedentes

15

El calentamiento de los alimentos que contienen tanto asparagina libre como azúcares reductores resulta en la producción de acrilamida. La acrilamida es un producto químico industrial usado en todo el mundo para sintetizar poliacrilamida. La exposición a este compuesto reactivo resulta en la absorción rápida y distribución uniforme entre los tejidos (Barber y otros, *Neurotoxicology* 2001, 22, 341-353). En los roedores, los efectos toxicológicos de las altas concentraciones de acrilamida (>2 mg/kg de peso corporal) incluyen síntomas neurológicos, disminución de la fertilidad, y cáncer (Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 4504-4526).

20

La exposición ocupacional a altos niveles de acrilamida se conoce también que eleva la incidencia de neurotoxicidad en humanos (LoPachin, *Neurotoxicology*, 2004, 25, 617-630) pero no existe ninguna evidencia documentada del efecto de la acrilamida en la reproducción o carcinogénesis humana. Tanto la acrilamida como su metabolito oxidado glicidamida reaccionan con la valina amino-terminal de la hemoglobina para formar aductos. El grado de formación del aducto es un buen marcador de los niveles de exposición e implica inhalaciones diarias de aproximadamente 100 µg (Tareke y otros, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 4998-5006). Aunque inicialmente se creía que el agua potable, los cosméticos y el tabaquismo representaban las únicas fuentes principales de exposición de fondo a la acrilamida (Bergmark, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, 10, 78-84), análisis recientes indican que el consumo de alimentos ricos en almidón fritos y horneados contribuyen aproximadamente 36% de la inhalación de acrilamida (Becker y Pearson, *Dietary habits and nutrient intake in Sweden 1997-98. Riksmaten 1997-98*, 1999).

30

La acrilamida dietética se deriva en gran medida de las reacciones inducidas por calor entre el grupo amino de los aminoácidos asparagina libres y el grupo carbonilo de los azúcares reductores (Mottram y otros, *Nature*, 2002, 419, 448-449; Stadler y otros, *Nature*, 2002, 419, 449-450). Los tubérculos de papa frescas contienen niveles muy altos de asparagina, pero concentraciones relativamente bajas de azúcares reductores de glucosa y fructosa. Sin embargo, los azúcares reductores se acumulan durante el almacenamiento en frío a través de la expresión de invertasas inducida por frío, que catalizan la conversión de sacarosa en glucosa y fructosa.

35

40

Los intentos anteriores de limitar la acumulación de acrilamida en los alimentos ricos en almidón no han resultado en aplicaciones prácticas y rentables. Un primer método de la industria anterior se basa en la modificación de los parámetros de procesamiento tales como relación superficie-volumen, temperatura, y tiempo de fritura. Aunque la aplicación de tales métodos puede ser parcialmente eficaz en la reducción de la acumulación de acrilamida, esto altera las características sensoriales del producto alimenticio final mediante la reducción de color, modificación de la forma, y alteración del sabor y textura. Tales alteraciones son indeseables.

45

Un segundo método se basa en la incubación de los productos alimenticios parcialmente elaborados con asparaginasa (EC 3.5.1.1) o gluminasa (EC 3.4.1.2), antes del calentamiento (ver solicitud de patente mundial 2004/030468 A3 y solicitud de patente mundial 2004/026042 A1). Este método es costoso y sólo fácilmente aplicable a materiales tal como la harina de trigo que puede mezclarse fácilmente con la enzima.

50

Un tercer método añade un competidor de asparagina tal como glicina al alimento parcialmente procesado (solicitud de patente mundial 2005/025330 A1 para tubérculos de la papa, solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0081724 A1 para los granos de café tostado, solicitud de patente mundial 2005/004620 A1 granos de cacao, solicitud de patente mundial 2005/004628 A1 para los alimentos a base de maíz). Este método sólo es parcialmente eficaz, requiere altas concentraciones del aditivo, y es demasiado costoso de aplicar en términos generales.

55

Un cuarto método añade una enzima que altera el azúcar reductor que comprende la aldosa reductasa al material alimenticio antes del calentamiento (ver patente de Estados Unidos 6989167). Este método no es muy eficaz y demasiado costoso de aplicar en términos generales.

60

Un quinto método cubre el alimento con un reactivo seleccionado del grupo que consiste de un compuesto que contiene aminoácidos, una sal de aminoácido, una amida de aminoácido, un éster de aminoácido, y mezclas de estos, antes del calentamiento (ver solicitud de patente mundial 2005/077203A3). Este método sólo es parcialmente eficaz y demasiado costoso aplicar en términos generales.

- Un sexto método se basa en la selección de germoplasma que contiene niveles inusualmente inferiores de azúcares reductores y asparagina. La disponibilidad de este tipo de germoplasma puede hacer posible que se incorporen los rasgos de "bajo contenido de azúcar" y "bajo contenido de asparagina" en variedades que son aceptables para el uso
- 5 amplio en la industria alimentaria. Sin embargo, no se han identificado aun plantas de cultivo de bajo contenido de asparagina. Incluso si tales germoplasma se pueden descubrir en el futuro, se necesitarían al menos 15 a 20 años para incorporar los rasgos deseados en las variedades comerciales.
- Un séptimo método modifica genéticamente el cultivo para reducir los niveles de azúcares reductores. Este método se
- 10 basa en la regulación negativa de la expresión de genes implicados en la degradación del almidón tales como los genes de L-fosforilasa y R1 asociados al almidón de la papa (ver, por ejemplo, solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0221213 A1). Aunque parcialmente eficaces, los alimentos elaborados derivados de los cultivos modificados todavía contienen aproximadamente un tercio de los niveles de acrilamida que son que se encuentran en los productos de control.
- 15 Así, existe una importante necesidad de métodos que reducen los niveles de acrilamida en los alimentos elaborados que se obtienen de cultivos ricos en almidón. Estos métodos deben ser rentables sin reducir las características sensoriales de los alimentos. La presente invención proporciona tales métodos.
- 20 Breve descripción de la invención
- En un primer aspecto de la invención, se proporciona un producto de tubérculo procesado con calor obtenido a partir de una planta de papa en la que el nivel de la biosíntesis de la asparagina se disminuye mediante la reducción de la expresión de un gen de la asparagina sintetasa I codificada por la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el producto del
- 25 tubérculo procesado con calor tiene al menos una concentración de acrilamida 70% inferior que un producto de tubérculo procesado con calor que se elabora a partir del tejido correspondiente de una planta de lo contrario idéntica no transgénica.
- Las modalidades preferidas de la invención en cualquiera de sus varios aspectos son como se describen más abajo o como se define en las reivindicaciones anexas.
- 30 En un aspecto, el nivel de la biosíntesis de la asparagina se disminuye mediante la reducción de la expresión de al menos un gen implicado en la biosíntesis de la asparagina.
- 35 En un aspecto, la expresión disminuida de un gen implicado en la biosíntesis de la asparagina se lleva a cabo mediante la introducción en una planta de un cassette de expresión que comprende, de 5' a 3', (i) un promotor, (ii) al menos una copia de una secuencia que comprende al menos un fragmento de al menos un gen implicado en el metabolismo de la asparagina, y opcionalmente, (iii) ya sea un segundo promotor o un terminador, por lo que el primero y segundo promotor opcional se colocan en la orientación convergente.
- 40 En un aspecto, el casete de expresión que se usa para disminuir la expresión de un gen implicado en la biosíntesis de la asparagina contiene dos copias de una secuencia que comprende al menos un fragmento del gen implicado en el metabolismo de la asparagina.
- 45 En un aspecto, los dos ejemplares se colocan como (i) repetición invertida, o (ii) repetición directa.
- En un aspecto, el gen implicado en la biosíntesis de la asparagina se aísla de la papa y codifica una asparagina sintetasa.
- 50 En un aspecto el gen de la asparagina sintetasa comprende una secuencia que comparte al menos 70% de identidad con al menos un fragmento de la secuencia mostrada en la sec. con núm. de ident.: 1.
- En un aspecto, el promotor es un promotor de (i) un gen de la sintasa de almidón unida al gránulo de papa, (ii) un gen de la ADP glucosa pirofosforilasa de la papa, (iii) un gen de la ubiquitina-7 de la papa, (iv) un gen de la patatina de la
- 55 papa, (v) un gen de la mono-oxigenasa flavonoide de la papa.
- En otro aspecto, el promotor es el promotor de un gen que se expresa en un tubérculo de un cultivo rico en almidón destinado a la elaboración de alimentos.
- 60 En otra modalidad, la invención proporciona un método para reducir los niveles de acrilamida en un alimento que se obtuvo por calentamiento de los tejidos de un cultivo reduciendo simultáneamente los niveles tanto de la asparagina como de azúcares reductores en los tejidos. En una modalidad, el tejido es un tejido rico en almidón del cultivo o de la planta.

En un aspecto, la reducción simultánea en los niveles de asparagina y azúcares reductores se obtiene ya sea por (i) regulación negativa de la expresión de un gen implicado en la biosíntesis de la asparagina o la sobreexpresión de un gen implicado en el metabolismo de la asparagina, y (ii) regulación negativa de la expresión de al menos un gen implicado en la degradación del almidón.

En un aspecto, la expresión de un gen implicado en la degradación del almidón se regula negativamente mediante la introducción en una planta de un cassette de expresión que comprende, de 5' a 3', (i) un promotor, (ii) al menos una copia de una secuencia que comprende al menos un fragmento de al menos un gen implicado en la degradación del almidón, y opcionalmente, (iii) ya sea un segundo promotor o un terminador, por lo que el primero y segundo promotor opcional se colocan en la orientación convergente.

En un aspecto, un gen implicado en la degradación del almidón se selecciona del grupo que consiste de en (i) un gen R1 asociado al almidón, y (ii) un gen fosforilasa-L asociado al almidón.

En una modalidad, el tubérculo transgénico es una papa. En una modalidad adicional, el producto es una papa a la francesa. En otra modalidad adicional, el producto es una papa frita.

En términos de partes por mil millones, la fritada al horno, papa frita, o fritura de papa producidas a partir de un tubérculo de la presente invención puede tener entre 1-20 ppb, 20-40 ppb, 40-60 ppb, 60-80 ppb, 80-100 ppb, 100-120 ppb, 120-140 ppb, 140-160 ppb, 160-180 ppb, o 180-200 ppb de acrilamida.

La aplicación de los métodos descritos en la presente invención disminuirá los niveles de acrilamida en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, 50%, en al menos aproximadamente 60%, en al menos aproximadamente 70%, en al menos aproximadamente 80%, en al menos aproximadamente 90% o por más de aproximadamente 90%.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema de (A) pSIM1148, (B) pSIM1151, y (C) pSIM658. LB = límite izquierdo de ADN-T, P:Agp = promotor Agp de la papa, 2a = copia antisentido de un fragmento del gen ast2, 1a = copia antisentido de un fragmento del gen ast1, 1b = copia sentido de un fragmento del gen ast1, 2b = copia sentido de un fragmento del gen ast2, P:Gbss = promotor Gbss de la papa, T:nos = terminador del gen nopalina sintasa del Agrobacterium, P:nos = promotor del gen nopalina sintasa del Agrobacterium, RB = límite derecho de ADN-T, P:Ubi7 = promotor del gen ubiquitina-7 de la papa.

Figura 2: Constructo de Russet Boise. PF = fragmento del promotor, GF = fragmento del gen

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Se describen en la presente secuencias de polinucleótidos y métodos para reducir los niveles de acrilamida.

La presente descripción utiliza términos y frases que son bien conocidos para los que practican el arte. A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, y química e hibridación del ácido nucleico descritos en la presente son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se usan técnicas estándar para los métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de polinucleótidos, cultivo microbiano, cultivo celular, cultivo de tejidos, transformación, transfección, transducción, química analítica, química orgánica sintética, síntesis química, análisis químico, y la formulación y administración farmacéutica. Generalmente, las reacciones enzimáticas y etapas de purificación y/o aislamiento se realizan de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con la metodología convencional (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ra edición, editado por Sambrook & Russel Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

Acrilamida: La acrilamida como un monómero se considera tóxico, que afecta directamente al sistema nervioso. Se puede considerar un carcinógeno. La acrilamida se absorbe fácilmente a través de la piel intacta a partir de soluciones acuosas. La fórmula molecular es C₃H₅NO; estructura CH₂=CH-CO-NH₂.

Agrobacterium o transformación bacteriana: como es bien conocido en el campo, las Agrobacteria que se usan para la transformación de las células vegetales son derivados desactivados y virulentos de, generalmente, Agrobacterium tumefaciens o Agrobacterium rhizogenes. Después de la infección de plantas, explantes, células o protoplastos, la

Agrobacterium transfiere un segmento de ADN de un vector plásmido al núcleo celular de la planta. El vector contiene típicamente un polinucleótido deseado que se sitúa entre los límites de un ADN-T o ADN-P. Sin embargo, las bacterias capaces de transformar una célula vegetal se pueden usar, como *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium Loti*.

Angiosperma: plantas vasculares que tienen las semillas encerradas en un ovario. Las angiospermas son plantas con semillas que producen las flores que portan frutos. Las angiospermas se dividen en planta dicotiledónea y monocotiledónea.

Biosíntesis de la asparagina: reacciones enzimáticamente catalizadas que ocurren en una planta que produce asparagina.

Metabolismo de la asparagina: reacciones enzimáticamente catalizadas que ocurren en una planta para convertir la asparagina en otros compuestos

Asparaginasa: Asparaginasa, que se encuentra en varias plantas, animales y células bacterianas, es una enzima implicada en el metabolismo de la asparagina. Cataliza la desaminación de la asparagina para producir ácido aspártico y un ion de amonio, dando como resultado una reducción de la asparagina libre en circulación.

Asparagina sintetasa: Esta enzima está implicada en la biosíntesis de la asparagina, y cataliza la síntesis de asparagina a partir del aspartato.

Resistencia a los antibióticos: capacidad de una célula para sobrevivir en presencia de un antibiótico, resistencia a los antibióticos, tal como se usa en la presente descripción, resulta de la expresión de un gen de resistencia a antibióticos en una célula huésped. Una célula puede tener una resistencia a cualquier antibiótico. Ejemplos de antibióticos comúnmente usados incluyen la kanamicina e higromicina.

Planta dicotiledónea (dicot): una planta con flores cuyos embriones tienen dos mitades de semilla o cotiledones, venas de las hojas ramificadas y partes de la flor en múltiplos de cuatro o cinco. Ejemplos de dicotiledóneas incluyen pero no se limitan a, papa, remolacha, brócoli, mandioca, batata, pimiento, poinsetia, frijol, alfalfa, frijol de soya y aguacate.

Endógeno: molécula de ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm, o ADNc que se aísla ya sea del genoma de una planta o especie de planta que se transforma o se aísla de una planta o especie que es sexualmente compatible o interfértil con la especie de planta que se transforma, es "nativo" para, es decir, indígena para, la especie de planta.

Casete de expresión: polinucleótido que comprende, de 5' a 3', (a) un primer promotor, (b) una secuencia que comprende (i) al menos una copia de un gen o fragmento de gen, o (ii) al menos una copia de un fragmento del promotor de un gen, y ya sea (c) un terminador o un segundo promotor que se posiciona en la orientación opuesta a la del primer promotor.

Foráneo: "foráneo", con respecto a un ácido nucleico, significa que ese ácido nucleico se deriva de los organismos no vegetales, o derivado de una planta que no es la misma especie que la planta que se transforma o no es derivado de una planta que no está interfértil con la planta que se debe transformar, no pertenece a la especie de la planta objetivo. Como consecuencia, el ADN o ARN foráneo representa los ácidos nucleicos de origen natural en la composición genética de los hongos, bacterias, virus, mamíferos, peces o aves, pero que no son de origen natural en la planta que se debe transformar. Así, un ácido nucleico foráneo es uno que codifica, por ejemplo, un polipéptido que no se produce naturalmente por la planta transformada. Un ácido nucleico foráneo no tiene que codificar un producto proteico.

Gen: Un gen es un segmento de una molécula de ADN que contiene toda la información necesaria para la síntesis de un producto, cadena de polipéptido o molécula de ARN que incluye tanto secuencias codificantes como no codificantes. Un gen también puede representar múltiples secuencias, cada una de las cuales se pueden expresar de forma independiente, y pueden codificar proteínas ligeramente diferentes que muestran la misma actividad funcional. Por ejemplo, los genes de la asparagina sintetasa 1 y 2 pueden, juntos, referirse como un gen.

Elemento genético: un "elemento genético" es cualquier secuencia de nucleótidos discreta tal como, pero no se limita a, un promotor, gen, terminador, intrón, potenciador, espaciador, región 5' no traducida, región 3' no traducida, o sitio de reconocimiento de la recombinasa.

Modificación genética: introducción estable de ADN en el genoma de ciertos organismos mediante la aplicación de métodos en la biología molecular y celular.

Gimnosperma: como se usa en la presente descripción, se refiere a una planta de semilla que porta semilla sin ovarios. Los ejemplos de gimnospermas son coníferas, cícadas, ginkgos y uvas marinas.

5 **Introducción:** como se usa en la presente descripción, se refiere a la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, por métodos que incluyen infección, transfección, transformación o transducción.

10 **Planta monocotiledónea (monocot):** una planta con flores que tiene embriones con un cotiledón u hoja de semilla, venas de las hojas paralelas, y partes de la flor en múltiplos de tres. Ejemplos de monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a maíz, arroz, avena, trigo, cebada y sorgo.

15 **Nativo:** cualquier molécula de ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm, o ADNc que se aísla ya sea del genoma de una planta o especie de planta que se transforma o se aísla de una planta o especie que es sexualmente compatible o interfértil con la especie de planta que se debe transformar, es "nativo" de, es decir, indígeno de, la especie de planta.

20 **ADN nativo:** cualquier molécula de ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm, o ADNc que se aísla ya sea del genoma de una planta o especie de planta que se transforma o se aísla de una planta o especie que es sexualmente compatible o interfértil con la especie de planta que se debe transformar, es "nativo" de, es decir, indígeno de, la especie de planta. En otras palabras, un elemento genético nativo representa todo el material genético que está accesible a los cultivadores de plantas para el mejoramiento de las plantas a través del cultivo vegetal clásico. Cualquiera de las variantes de un ácido nucleico nativo se considera también "nativo" de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, un ADN nativo puede comprender una mutación puntual ya que tales mutaciones puntuales se producen naturalmente. Además es posible enlazar dos ADN nativos diferentes mediante el empleo de los sitios de restricción debido a que tales sitios son omnipresentes en los genomas de plantas.

Constructo del ácido nucleico nativo: un polinucleótido que comprende al menos un ADN nativo.

30 **operativamente enlazado:** combinación de dos o más moléculas de tal modo que, en conjunto funcionan adecuadamente en una célula vegetal. Por ejemplo, un promotor está operativamente enlazado a un gen estructural cuando el promotor controla la transcripción del gen estructural.

Sobreexpresión: expresión de un gen a niveles que son superiores a los de las plantas que no son transgénicas.

35 **ADN-P:** una secuencia límite del ADN de transferencia derivado de la planta ("ADN-P") de la presente descripción no es idéntica en la secuencia de nucleótidos a cualquier secuencia límite del ADN-T derivada de la bacteria conocida, pero funciona esencialmente para el mismo propósito. Es decir, el ADN-P se puede utilizar para transferir e integrar un polinucleótido en otro. Un ADN-P se puede insertar en un plásmido que induce tumores, tal como un plásmido Ti del Agrobacterium en lugar de un ADN-T convencional, y mantener en una cepa bacteriana, al igual que los plásmidos de transformación convencionales. El ADN-P se puede manipular tal que contenga un polinucleótido deseado, que se destina para la integración dentro de un genoma de la planta a través de la transformación de la planta mediada por bacteria. Ver Rommens y otros en WO2003/069980, US-2003-0221213, US-2004-0107455, y WO2005/004585.

45 **Fenotipo:** fenotipo es un rasgo distintivo o característica de una planta, que se puede alterar mediante la integración de uno o más "polinucleótidos deseados" y/o marcadores detectables/seleccionables en el genoma de al menos una célula vegetal de una planta transformada. El(os) "polinucleótido(s) deseado(s)" y/o marcadores pueden conferir un cambio en el fenotipo de una planta transformada, mediante la modificación de cualquiera de una serie de características genéticas, moleculares, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas, o agronómicas o propiedades de la célula vegetal transformada o la planta en su conjunto. Así, la expresión de uno o más polinucleótido(s) deseado(s) establemente integrado(s) en un genoma de la planta que rinde el fenotipo de las concentraciones de acrilamida reducidas en los tejidos de la planta.

50 **Tejido de la planta:** una "planta" es cualquiera de los varios organismos fotosintéticos, eucariotas, multicelulares, del reino Plantae que producen embriones característicos, que contienen cloroplastos, y que tienen paredes celulares de celulosa. Una parte de una planta, es decir, un "tejido de la planta" se puede tratar para producir una planta transgénica. Muchos tejidos de la planta adecuados se pueden transformar, pero no se limitan a, embriones somáticos, polen, hojas, tallos, callos, estolones, microtubérculos y brotes. Así, se prevé la transformación de plantas angiospermas y gimnospermas tales como trigo, maíz, arroz, cebada, avena, remolacha, papa, tomate, alfalfa, mandioca, batata, y frijol de soya. De acuerdo con la presente descripción el "tejido de la planta" abarca también las células vegetales. Las células vegetales incluyen cultivos en suspensión, callos, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, semillas y microsporas. Los tejidos de la planta pueden estar en varias etapas de madurez y se pueden crecer en cultivo líquido o sólido, o en el suelo o medio adecuado en macetas, invernaderos o campos. Un tejido de la planta también se refiere a cualquier clon de una planta, semilla, progenie,

propágulo de ese tipo ya sea generado sexual o asexualmente, y descendientes de cualquiera de ellos, tales como esquejes o semillas. De particular interés son la papa, el maíz y el trigo.

Transformación de la planta y cultivo celular: se refiere ampliamente al proceso por el cual las células vegetales son genéticamente modificadas y se transfieren a un medio de cultivo vegetal apropiado para el mantenimiento, crecimiento adicional, y/o más aun desarrollo. Tales métodos son bien conocidos para el técnico con experiencia.

Elaboración: el proceso de elaboración de un alimento a partir de (1) la semilla de, por ejemplo, trigo, maíz, planta de café, o árbol de cacao, (2) el tubérculo de, por ejemplo, papa, o (3) la raíz de, por ejemplo, la batata y el ñame que comprende calentar en al menos 120°C. Ejemplos de alimentos elaborados incluyen pan, cereales para el desayuno, pasteles, torta, tostadas, bizcocho, galletas dulces, pizza, galletas saladas, tortilla, papas fritas a la francesa, fritadas al horno, papas fritas, frituras de papa, café tostado y cacao.

Progenie: una "progenie", tal como la progenie de una planta transgénica, es aquella que es nacida de, engendrada por, o derivada de una planta o planta transgénica. Así una planta "progenie", es decir, una planta de generación "F1" es una cría o un descendiente de la planta transgénica.

Una progenie de una planta transgénica puede contener en al menos uno, algunos, o todos sus genomas celulares, el polinucleótido deseado que se integró en una célula de la planta transgénica parental mediante los métodos descritos en la presente. Así, el polinucleótido deseado se "transmite" o "hereda" por la planta de la progenie. El polinucleótido deseado que es el heredado en la planta de la progenie puede residir dentro de un constructo de ADN-T o ADN-P, que se hereda también por la planta de la progenie a partir de su parental. El término "progenie" como se usa en la presente descripción, puede considerarse también que son las crías o descendientes de un grupo de plantas.

Promotor: promotor se entiende que significa un ácido nucleico, preferentemente ADN que une la ARN polimerasa y/o otros elementos reguladores de la transcripción. Como con cualquier promotor, los promotores descritos en la presente facilitarán o controlarán la transcripción del ADN o ARN para generar una molécula de ARNm a partir de una molécula de ácido nucleico que está enlazada operativamente al promotor. Como se dijo anteriormente, el ARN generado puede codificar para una proteína o un polipéptido o puede codificar para un ARN de interferencia, o molécula antisentido.

Un promotor es una secuencia de ácido nucleico que permite que un gen con el que está asociado se transcriba. En procariotas, típicamente un promotor se compone de dos secuencias cortas en la posición -10 y -35 corriente arriba del gen, es decir, antes del gen en la dirección de la transcripción. La secuencia en la posición -10 se denomina la caja de Pribnow y generalmente consiste en seis nucleótidos TATAAT. La caja de Pribnow es esencial para iniciar la transcripción en procariotas. La otra secuencia en -35 generalmente consiste en seis nucleótidos TTGACA, la presencia de los cuales facilita la velocidad de la transcripción.

Los promotores eucarióticos son más diversos y por lo tanto más difícil de caracterizar, sin embargo, hay ciertas características fundamentales. Por ejemplo, típicamente los promotores eucariotas se encuentran corriente arriba del gen a los que se asocian más inmediatamente. Los promotores pueden tener elementos reguladores situados varios kilobases de distancia de su lugar de inicio de la transcripción, aunque ciertas formaciones estructurales terciarias por el complejo transcripcional pueden causar que el ADN se pliegue, lo que reúne los elementos reguladores más cercanos al sitio real de la transcripción. Muchos promotores eucariotas contienen una secuencia de "caja TATA", típicamente denotado por la secuencia de nucleótidos TATAAA. Este elemento se une a una proteína de unión a TATA, que ayuda a la formación del complejo transcripcional de la ARN polimerasa. La caja TATA típicamente se encuentra dentro de 50 bases del sitio de inicio transcripcional.

Los promotores eucarióticos también se caracterizan por la presencia de ciertas secuencias reguladoras que se unen a factores de la transcripción implicados en la formación del complejo transcripcional. Un ejemplo es la caja E indicada por la secuencia CACGTG, que se une a factores de la transcripción en la familia básica hélice -giro-hélice. También hay regiones que tienen un alto contenido de nucleótidos GC.

Por lo tanto, una secuencia parcial, o un "fragmento" promotor específico de un promotor, por ejemplo del gen de la sintetasa de asparagina, que se puede usar en el diseño de un polinucleótido deseado puede o no comprender uno o más de estos elementos o ninguno de estos elementos. Una secuencia del fragmento de promotor puede no ser funcional y puede no contener una caja TATA.

Otra característica del constructo de la presente descripción es que promueve la transcripción convergente de una o más copias del polinucleótido que está o no directamente operativamente enlazado a un terminador, a través de dos promotores opuestos. Debido a la ausencia de una señal de terminación, la longitud de la mezcla de moléculas de ARN que se transcribe a partir de los promotores primero y segundo puede ser de varias longitudes.

Ocasionalmente, por ejemplo, la maquinaria transcripcional puede continuar a transcribir pasado el último nucleótido que significa el "extremo" de la secuencia del polinucleótido deseado. Por consiguiente, en este arreglo particular, la

terminación de la transcripción puede ocurrir ya sea a través de la acción débil y no intencionada de las secuencias corriente abajo que, por ejemplo, promueven la formación de la horquilla o por medio de la acción de terminadores de la transcripción no intencionada situados en el ADN de la planta que flanquean el sitio de integración del ADN de transferencia.

El polinucleótido deseado puede enlazarse en dos orientaciones diferentes al promotor. En una orientación, por ejemplo, "sentido", al menos la parte 5' del transcrito de ARN resultante compartirá una identidad de secuencia con al menos parte de al menos un transcrito objetivo. En la otra orientación designada como "antisentido", al menos la parte 5' del transcrito previsto será idéntica u homóloga a al menos parte del complemento inverso de al menos un transcrito objetivo.

Un promotor de la planta es un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales si su origen es o no una célula vegetal. Los promotores ilustrativos de las plantas incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se obtienen de las plantas, virus y bacterias de las plantas, tales como *Agrobacterium* o *Rhizobium* que comprenden los genes expresados en las células vegetales. Ejemplos de los promotores bajo el control de desarrollo incluyen promotores que inician la transcripción preferentemente en ciertos tejidos, tales como xilema, hojas, raíces, o semillas. Tales promotores se denominan como promotores preferidos del tejido. Los promotores que inician la transcripción sólo en ciertos tejidos se conocen como promotores específicos de tejido. Un promotor celular de tipo específico impulsa principalmente la expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor inducible o reprimible es un promotor que está bajo el control ambiental. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar a la transcripción por los promotores inducibles incluyen las condiciones anaeróbicas o la presencia de luz. Promotores específicos de tejido, preferidos del tejido, celulares tipo específico, e inducibles constituyen la clase de promotores no constitutivos. Un promotor constitutivo es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales, y en la mayoría de las partes de la planta.

Polinucleótido es una secuencia de nucleótidos, que comprende una secuencia codificante de genes o un fragmento de esta, (que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos, preferentemente al menos 30 nucleótidos consecutivos, y con mayor preferencia al menos 50 nucleótidos consecutivos), un promotor, un intrón, una región potenciadora, un sitio de poliadenilación, un sitio de iniciación de la traducción, regiones 5' o 3' no traducidas, un gen reportero, un marcador seleccionable o similares. El polinucleótido puede comprender ADN o ARN monocatenario o bicatenario. El polinucleótido puede comprender bases modificadas o una cadena principal modificada. El polinucleótido puede ser genómico, un transcrito de ARN (tal como un ARNm) o una secuencia de nucleótidos procesada (tal como un ADNc). El polinucleótido puede comprender una secuencia en orientaciones ya sea sentido o antisentido.

Un polinucleótido aislado es una secuencia de polinucleótido que no está en su estado nativo, por ejemplo, el polinucleótido está compuesto de una secuencia de nucleótidos que no se encuentra en la naturaleza o el polinucleótido está separado de las secuencias de nucleótidos con las que típicamente está próximo o está próximo a secuencias de nucleótidos con las que típicamente no está próximo.

Semilla: una "semilla" puede ser considerada como un óvulo maduro de la planta que contiene un embrión, y una parte de propagación de una planta, como un tubérculo o espora. La semilla se puede incubar antes de la transformación mediada por *Agrobacterium* en la oscuridad, por ejemplo, para facilitar la germinación. La semilla puede también esterilizarse antes de la incubación, tal como mediante tratamiento breve con decolorante. La plántula resultante puede después exponerse a una cepa de *Agrobacterium* deseada.

Marcador seleccionable/detectable: un gen que, si se expresa en plantas o tejidos de la planta, hace posible distinguirlos de otras plantas o tejidos de plantas que no expresan ese gen. Los procedimientos de tamizaje pueden requerir ensayos para la expresión de proteínas codificadas por el gen marcador detectable. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen el gen de la neomicina fosfotransferasa (NptII) que codifica la resistencia a la kanamicina y geneticina, el gen de la higromicina fosfotransferasa (HptII) que codifica la resistencia a la higromicina, u otros genes similares conocidos en la técnica.

Características sensoriales: paneles de individuos profesionalmente entrenados pueden calificar productos alimenticios para las características sensoriales tales como aspecto, sabor, aroma y textura. Una calificación de papas fritas a la francesa que se obtiene de tubérculos que se regulan negativamente en los niveles de expresión génica R1 y fosforilasa-L se describe en el Ejemplo 4. Papas fritas a la francesa a partir de tubérculos descritos en el Ejemplo 5 mostrarán las características sensoriales mejoradas. Así, la presente descripción contempla la mejora de las características sensoriales de un producto vegetal obtenido a partir de una planta que tiene ha modificado para manipular sus asparagina biosíntesis y el metabolismo de las vías.

Identidad de secuencia: como se usa en la presente descripción, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos incluye la referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean por correspondencia máxima en una región especificada. Cuando se usa el porcentaje de

identidad de secuencia como referencia para las proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren frecuentemente en las sustituciones de aminoácidos conservadores, donde se sustituyen los residuos de los aminoácidos de otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Las secuencias que difieren en tales sustituciones conservadoras se dice que tienen similitud de secuencia o similitud." Instrumentos para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, esto implica la puntuación de una sustitución conservativa como una falta de coincidencia parcial en lugar de una completa, lo que aumenta el porcentaje de identidad de la secuencia. Así, por ejemplo, donde se le da a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y una sustitución no conservadora se le da una puntuación de cero, una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo, de acuerdo con el algoritmo de Meyers y Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4: 11 17 (1988) por ejemplo, como se aplica en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, Estados Unidos).

Como se usa en la presente descripción, el porcentaje de identidad de secuencia significa el valor determinado por la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácido o de base de ácido nucleico idéntico ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

"Identidad de secuencia" tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular usando las técnicas publicadas. Ver COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, ed. (Oxford University Press, 1988), BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, ed. (Academic Press, 1993), COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, parte I, Griffin & Griffin, eds., (Humana Press, 1994), SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, Von Heinje ed., Academic Press (1987), SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov & Devereux, eds. (Macmillan Stockton Press, 1991), y Carillo & Lipton, *SIAM J. Applied Math.* 48: 1073 (1988). Los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a los descritos en GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Bishop, ed., (Academic Press, 1994) y Carillo & Lipton, supra. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en los programas informáticos. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete del programa GCG (Devereux y otros, *Nucleic Acids Research* 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul y otros, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (1990)), y FASTDB (Brutlag y otros, *Comp. App. Biosci.* 6: 237 (1990)).

Silenciamiento: La transcripción unidireccional e imperturbable de cualquiera de los genes o fragmentos de genes de promotor a terminador puede desencadenar silenciamiento post-transcripcional de genes objetivo. Casetes de expresión inicial para el silenciamiento post-transcripcional de genes en plantas incluyen un único fragmento de gen colocado ya sea en la orientación antisentido (McCormick y otros, patente de Estados Unidos 6617496; Shewmaker y otros, patente de Estados Unidos 5107065) o sentido (van der Krol y otros, *Plant Cell* 2:291-299, 1990) entre secuencias de regulación para la iniciación y terminación del transcrito. En Arabidopsis, el reconocimiento de los transcritos resultantes por la ARN polimerasa dependiente de ARN conduce a la producción de ARN bicatenario (ds). La escisión de este ARNbc mediante proteínas de tipo Dicer (Dcl), tales como Dcl4 rinde ARNs de interferencia (siARNs) pequeños de 21 nucleótidos (nt). Estos siRNAs se acomplejan con las proteínas, incluyendo miembros de la familia Argonauta (Ago) para producir complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISCs). Los RISCs se dirigen después a los ARN homólogos para la escisión endonucleolítica.

Los constructos de silenciamiento más eficaces contienen tanto un componente sentido como antisentido, que producen moléculas de ARN que se repliegan en estructuras de horquilla (Waterhouse y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13959-13964, 1998). Los altos niveles de ARNbc producidos por la expresión de los transgenes de repetición invertidos se supusieron para promover la actividad de múltiples Dcls. Los análisis de combinatoria de knockouts de Dcl en Arabidopsis apoyaron esta idea, e identificaron también a Dcl4 como una de las proteínas implicadas en la escisión del ARN.

Un componente de los constructos convencionales de silenciamiento de génico basado en ARN sentido, antisentido, y bicatenario (ds) es el terminador de la transcripción. WO 2006/036739 muestra que este elemento regulador se convierte en obsoleto cuando fragmentos de genes se colocan entre dos promotores funcionalmente activos y orientados de forma opuesta. La transcripción convergente resultante desencadena el silenciamiento génico que es al menos tan eficaz como la transcripción unidireccional 'promotor-a-terminador'. Adicionalmente a los ARN corto de tamaño variable y no poliadenilado, el casete libre del terminador produce raros transcritos más largos que alcanzan en

el promotor que flanquean. La sustitución de fragmentos de genes por secuencias derivadas del promotor aumenta más aun el grado de silenciamiento génico.

En una modalidad preferida de la presente invención, el polinucleótido deseado comprende una secuencia parcial de un promotor del gen objetivo o una secuencia parcial que comparte identidad de secuencia con una porción de un promotor del gen objetivo. Por lo tanto, un polinucleótido deseado contiene un fragmento específico de un promotor del gen objetivo de interés particular.

El polinucleótido deseado puede estar operativamente enlazado a uno o más promotores funcionales. Varios constructos contemplados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a (1) un constructo donde el polinucleótido deseado comprende una o más secuencias del fragmento promotor y está operativamente enlazado a ambos extremos de los promotores funcionales "impulsor". Esos dos promotores funcionales están dispuestos en una orientación convergente de modo cada hebra del polinucleótido deseado se transcribe; (2) un constructo donde el polinucleótido deseado está operativamente enlazado a un promotor funcional, ya sea en su extremo 5' o su extremo 3', y el polinucleótido deseado está operativamente enlazado también en su extremo no promotor por una secuencia terminadora funcional; (3) un constructo donde el polinucleótido deseado está operativamente enlazado a un promotor funcional, ya sea en su extremo 5' o su extremo 3', pero donde el polinucleótido deseado no está operativamente enlazado a un terminador; o (4) un casete, donde el polinucleótido deseado comprende una o más secuencias del fragmento promotor pero no está operativamente enlazado a cualquiera de los promotores o terminadores funcionales.

Por lo tanto, un constructo puede comprender dos o más promotores "impulsor" que flanquean uno o más polinucleótidos deseados o que flanquea copias de un polinucleótido deseado, tal que ambas cadenas del polinucleótido deseado se transcriben. Es decir, un promotor se puede orientar a iniciar la transcripción del extremo 5' de un polinucleótido deseado, mientras que un segundo promotor puede estar operativamente orientado para iniciar la transcripción del extremo 3' del mismo polinucleótido deseado. Los promotores orientados opuestamente pueden flanquear múltiples copias del polinucleótido deseado. Por lo tanto, el "número de copia" puede variar de manera que un constructo puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, o más de 100 copias, o cualquier número entero en el medio, de un polinucleótido deseado, que puede estar flanqueado por los promotores "impulsor" que se orientan para inducir la transcripción convergente.

Si ningún casete comprende una secuencia del terminador, después, un constructo de este tipo, en virtud del arreglo de la transcripción convergente, puede producir transcritos de ARN que son de diferentes longitudes.

En esta situación, por lo tanto, pueden existir subpoblaciones de transcritos de ARN que se transcriben parcialmente o totalmente que comprenden secuencias parciales o de longitud completa del polinucleótido transcrito deseado del casete respectivo. Alternativamente, en ausencia de un terminador funcional, la maquinaria de transcripción puede proceder más allá del final de un polinucleótido deseado para producir un transcrito que es más largo que la longitud del polinucleótido deseado.

En un constructo que comprende dos copias de un polinucleótido deseado, por lo tanto, donde uno de los polinucleótidos puede o no estar orientado en la dirección inversa complementaria a la otra, y donde los polinucleótidos se enlazan operativamente a los promotores para inducir la transcripción convergente, y no hay terminador funcional en el constructo, la maquinaria de transcripción que se inicia a partir de un polinucleótido deseado puede proceder a transcribir la otra copia del polinucleótido deseado y viceversa. Las múltiples copias del polinucleótido deseado se pueden orientar en diversas permutaciones: en el caso en que dos copias del polinucleótido deseado están presentes en el constructo, las copias pueden, por ejemplo, tanto orientarse en la misma dirección, en la orientación inversa entre sí, como en la orientación del complemento inverso entre sí, por ejemplo.

En un arreglo donde uno de los polinucleótidos deseados se orienta en la orientación complementaria inversa al otro polinucleótido, un transcrito de ARN puede producirse que comprende no sólo la secuencia "sentido" del primer polinucleótido sino también la secuencia "antisentido" del segundo polinucleótido. Si el primero y segundo polinucleótidos comprenden la misma o sustancialmente las mismas secuencias de ADN, entonces el único transcrito de ARN puede comprender dos regiones que son complementarias entre sí y que pueden, por lo tanto, aparearse. Por lo tanto, el único transcrito de ARN que se transcribe, puede formar una estructura parcial o completa de horquilla híbrida.

Por otro lado, si se produjeron dos copias de un transcrito largo de este tipo, uno de cada promotor, después existirán dos moléculas de ARN, cada una de las cuales puede compartir regiones de complementariedad de secuencia con la otra. Por lo tanto, la región "sentido" región del primer transcrito de ARN se puede aparear con la "región antisentido" del segundo transcrito de ARN, y viceversa. En este arreglo, por lo tanto, se puede formar otro ARN bicatenario que constará de dos transcritos de ARN separados, en oposición a una horquilla híbrida que se forma de un único transcrito de ARN auto-complementario.

Alternativamente, dos copias del polinucleótido deseado pueden orientarse en la misma dirección tal que, en el caso de

- la transcripción a través de la lectura, el transcrito de ARN largo que se produce a partir de un promotor puede comprender, por ejemplo, la secuencia sentido de la primera copia del polinucleótido deseado y también la secuencia sentido de la segunda copia del polinucleótido deseado. El transcrito de ARN que se produce del otro promotor orientado convergentemente, por lo tanto, puede comprender la secuencia antisentido de la segunda copia del polinucleótido deseado y también la secuencia antisentido del primer polinucleótido. En consecuencia, es probable que ni el transcrito de ARN puede contener regiones de complementariedad exacta y, por lo tanto, es probable que ni el transcrito de ARN pueda plegarse sobre sí mismo para producir una estructura de horquilla. Por otro lado los dos transcritos de ARN individuales pueden hibridarse y aparearse entre sí para formar un ARN bicatenario.
- Por lo tanto, la presente descripción proporciona un constructo que carece de un terminador o carece de un terminador que está precedido por la región de ADN que codifica el autoempalme de ribozima, pero que comprende un primer promotor que está operativamente enlazado a los polinucleótidos deseados.
- Tejido: cualquier parte de una planta que se usa para producir un alimento. Un tejido puede ser un tubérculo de una papa, una raíz de una papa dulce, o una semilla de una planta de maíz.
- Terminadores transcripcionales: La expresión de constructos de ADN de la presente descripción tienen típicamente una región terminal de la transcripción en el extremo opuesto de la región reguladora de iniciación de la transcripción. La región de terminación de la transcripción se puede seleccionar, para la estabilidad del ARNm que mejora la expresión y/o para la adición de colas de poliadenilación añadidas al producto de la transcripción de genes. La traducción de un polipéptido naciente se somete a terminación cuando cualquiera de los tres codones de terminación de la cadena entra al sitio A en el ribosoma. Los codones de terminación de la traducción son UAA, UAG, y UGA.
- Los terminadores de la transcripción se derivan ya sea de un gen o, más preferentemente, de una secuencia que no representa un gen sino el ADN intergénico. Por ejemplo, la secuencia terminador del gen de la ubiquitina de la papa se puede usar y se representa en la sec. con núm. de ident.: 5.
- ADN de transferencia (ADN-T): un ADN de transferencia es un segmento de ADN delimitado ya sea por los límites de ADN-T o por los límites de ADN-P para crear un ADN-T o ADN-P, respectivamente. Un ADN-T es un elemento genético que es bien conocido como un elemento capaz de integrar en otro genoma una secuencia de nucleótidos contenida dentro de sus límites. En este respecto, se flanquea un ADN-T, típicamente, por dos secuencias "límites". Un polinucleótido deseado y un marcador seleccionable se pueden ubicar entre la secuencia de tipo límite izquierdo y la secuencia de tipo límite derecho de un ADN-T. El polinucleótido deseado y un marcador seleccionable contenido en el ADN-T se puede enlazar operativamente a una variedad de ácidos nucleicos, diferentes (es decir, nativo), específicos de la planta o foráneos, como elementos reguladores promotor y terminador que facilitan su expresión, es decir, transcripción y/o traducción de la secuencia de ADN codificada por el polinucleótido deseado o marcador seleccionable.
- Transformación de células vegetales: Un proceso por el cual un ácido nucleico se inserta de forma estable en el genoma de una célula vegetal. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico en una célula huésped procariota o eucariota, incluyendo los protocolos de transformación mediada por *Agrobacterium*, tales como "transformación refinada" o "mejoramiento preciso", infección viral, triquitas, electroporación, microinyección, tratamiento con polietilenglicol, choque térmico, lipofección y el bombardeo de partículas.
- Planta transgénica: una planta transgénica es una que comprende al menos un genoma de la célula en la que un ácido nucleico exógeno se integró de forma estable. En consecuencia, una planta transgénica es una planta que comprenden sólo una célula genéticamente modificada y genoma celular, o es una planta que comprende algunas células modificadas genéticamente, o es una planta en la que todas las células se modifican genéticamente. Una planta transgénica puede ser una que comprende la expresión del polinucleótido deseado, es decir, el ácido nucleico exógeno, sólo en ciertas partes de la planta. Así, una planta transgénica puede contener sólo células genéticamente modificadas en ciertas partes de su estructura.
- Variante: una "variante", como se usa en la presente descripción, se entiende que significa una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que se desvía del estándar, o secuencia de nucleótidos o aminoácidos dados de un gen o proteína en particular. Los términos, "isoforma", "isotipo", y "análogo" también se refieren a formas "variantes" de un nucleótido o una secuencia de aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos que se altera mediante la adición, eliminación o sustitución de uno o más, aminoácidos, o un cambio en la secuencia de nucleótidos, puede ser considerado una secuencia "variante". La variante puede tener cambios "conservadores", en donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, el reemplazo de leucina con isoleucina. Una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, el reemplazo de una glicina con un triptófano. Variaciones menores análogas también pueden incluir delecciones o inserciones de aminoácidos, o ambos. La guía para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar, o eliminar puede encontrarse usando programas

informáticos bien conocidos en la técnica tales como el programa Vector NTI Suite (InforMax, MD). "variante" también puede referirse a un "gen barajado" tal como los descritos en las patentes asignadas-Maxygen.

Secuencias de polinucleótidos

Sec. con núms. de ident.: 2-35 no forman parte de la invención y sólo son para propósitos ilustrativos.

La presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos de sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25. La descripción proporciona además fragmentos funcionales de las secuencias de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25. La descripción proporciona además ácidos nucleicos complementarios, o fragmentos de estos, en cualquiera de las secuencias de polinucleótidos de sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25, así como un ácido nucleico, que comprende al menos 15 bases contiguas, que se hibrida con cualquiera de las secuencias de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25.

Por molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) "aislado(s)" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su ambiente nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un constructo de ADN se consideran aisladas para los propósitos de la presente descripción. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen las moléculas de ADN recombinante mantenidas en las células huésped heterólogas o moléculas de ADN en solución (parcial o sustancialmente) purificadas, las moléculas de ADN aisladas incluyen transcritos de ARN in vitro de las moléculas de ADN de la presente descripción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, de acuerdo con la presente descripción, incluyen además moléculas de este tipo producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción pueden estar en forma de ARN, tal como ARN, o en forma de ADN, incluyendo por ejemplo, ADN y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente. El ADN o ARN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, conocida también como cadena anti-sentido.

A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de nucleótidos determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en la presente descripción se determinaron usando una secuenciación de ADN automatizada (tal como el Modelo 373 de Applied Biosystems, Inc.). Por lo tanto, como es conocido en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada por este enfoque automatizado, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente descripción puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas por automatización son típicamente al menos aproximadamente 95% idénticas, más típicamente al menos aproximadamente 96% hasta al menos aproximadamente 99.9% idéntica a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse más precisamente por otros enfoques, incluyendo métodos manuales de secuenciación de ADN bien conocidos en la técnica. Como se conoce en la técnica, también una única inserción o delección en una secuencia de nucleótidos determinada en comparación con la secuencia real causará un cambio de marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos tal que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia de nucleótidos determinada puede ser completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de una inserción o delección.

Cada "secuencia de nucleótidos" que se expone en la presente descripción se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (A, G, C y T abreviados). Sin embargo, por "secuencia de nucleótidos" de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido, para una molécula de ADN o polinucleótido, una secuencia de desoxirribonucleótidos, y para una molécula de ARN o polinucleótido, se pretende la correspondiente secuencia de ribonucleótidos (A, G, C y U) donde en la secuencia de desoxinucleótido especificada cada desoxinucleótido de timidina (T) se sustituye por el ribonucleótido uridina (U).

La presente descripción se refiere además a los fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente. Preferentemente, los fragmentos de ADN comprenden al menos 15 nucleótidos, y con mayor preferencia al menos 20 nucleótidos, aún con mayor preferencia al menos 30 nucleótidos de longitud, que son útiles como sondas e iniciadores de diagnóstico. Por supuesto que fragmentos de ácido nucleico más grandes de hasta la longitud completa de las moléculas de ácido nucleico son útiles también como sondas de diagnóstico, de acuerdo con las técnicas de hibridación convencionales, o como iniciadores para la amplificación de una secuencia objetivo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ra. edición, editado por Sambrook & Russel., (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Mediante un fragmento de al menos 20 nucleótidos de longitud, por ejemplo, se pretende que se incluyan fragmentos de 20 o más bases contiguas de la secuencia de nucleótidos de sec. con núms. de ident.: 1, 2, 17, 20, 21. Los ácidos nucleicos que contienen las secuencias de nucleótidos enumeradas en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 17, 20, 21 se pueden generar usando métodos convencionales de síntesis de ADN que serán de rutina para el experto en la técnica. Por ejemplo, la escisión de endonucleasa de restricción o cizallamiento por sonicación pueden usarse fácilmente para generar fragmentos de

diversos tamaños. Alternativamente, los fragmentos de ADN se pueden generar sintéticamente de acuerdo con las técnicas conocidas.

La descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una porción del polinucleótido en una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente. Por un polinucleótido que se hibrida con unas "porciones" de un polinucleótido se entiende un polinucleótido (ya sea ADN o ARN) que hibrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, y aún más preferentemente al menos aproximadamente 30 nucleótidos, e incluso más preferentemente más de 30 nucleótidos del polinucleótido de referencia. Estos fragmentos que se hibridan a los fragmentos de referencia son útiles como sondas e iniciadores de diagnóstico. Una sonda, como se usa en la presente descripción se define como al menos aproximadamente 100 bases contiguas de una de las secuencias de ácidos nucleicos que se expone en las sec. con núms. de ident.: 1-230. Para el propósito de la descripción, dos secuencias se hibridan cuando forman un complejo bicatenario en una solución de hibridación de SSC 6X, 0.5% SDS, solución de Denhardt 5X y 100µg de ADN vehículo no-específico. Ver Ausubel y otros, sección 2.9, suplemento 27 (1994). Las secuencias pueden hibridarse en "rigurosidad moderada", que se define como una temperatura de 60 °C en una solución de hibridación de SSC 6X, 0.5% SDS, solución de Denhardt 5X y 100µg de ADN vehículo no-específico. Para la hibridación de "alta rigurosidad", la temperatura se aumenta a 68 °C. Después de la reacción de hibridación de rigurosidad moderada, los nucleótidos se lavan en una solución de SSC 2X más 0.05% de SDS durante cinco veces a temperatura ambiente, con lavados posteriores con SSC 0.1X más 0.1% de SDS a 60 °C durante 1h. Para alta rigurosidad, la temperatura de lavado se aumentó a 68 °C. Para el propósito de la descripción, los nucleótidos hibridados son los que se detectan usando 1 ng de una sonda radiomarcada que tiene una radiactividad específica de 10.000 cpm/ng, donde los nucleótidos hibridados son claramente visibles después de la exposición a película de rayos X a 70 °C durante no más de 72 horas.

La presente descripción se dirige a moléculas de ácido nucleico de este tipo que son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a una secuencia de ácido nucleico descrita en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 17, 20, 21. Sin embargo, se prefieren las moléculas de ácido nucleico que son al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la secuencia de ácido nucleico mostrada en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 17, 20, 21. Las diferencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como una cuestión práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico en particular es al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia se refiere a una comparación hecha entre dos moléculas usando algoritmos estándar bien conocidos en la técnica y se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos disponibles públicamente tales como el algoritmo BLASTN. Ver Altschul y otros, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997).

40 Análisis de secuencia

Los métodos para el alineamiento de secuencias de comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981); por el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970); por la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444 (1988); mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos, incluyendo, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California; en el paquete informático GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, Estados Unidos; el programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp, Gene 73:237-244 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5: 151-153 (1989); Corpet, y otros, Nucleic Acids Research 16: 10881-90 (1988); Huang, y otros, Computer Applications in the Biosciences 8:155-65 (1992), y Pearson, y otros, Methods in Molecular Biology 24: 307-331 (1994).

La familia de programas BLAST que se puede usar para las búsquedas de similitud en las bases de datos incluye: BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de proteínas; BLASTP para las secuencias de consulta de proteína contra secuencias de base de datos de proteínas; TBLASTN para secuencias de consulta de proteína contra secuencias base de datos de nucleótidos; y TBLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de nucleótidos. Ver, Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 19, Ausubel, y otros, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1995); Altschul y otros, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); y, Altschul y otros, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997).

El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente, por ejemplo, a través del Centro Nacional de

Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye primero identificar los pares de secuencia con puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coincide o satisface algunas puntuaciones T umbrales de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de la palabra vecina. Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Las coincidencias de palabras se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, hasta alcanzar un punto en el cual la puntuación de alineamiento acumulado no aumente más. Los registros acumulativos se calculan por medio del uso de, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular el registro acumulativo. Las extensiones de los aciertos de las palabras vecinas en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en una cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de la secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de la suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede producir por casualidad.

El alineamiento múltiple de las secuencias se puede realizar usando el método de alineamiento CLUSTAL (Higgins y Sharp (1989) CABIOS. 5:151-153) con los parámetros por defecto (penalización de interrupción= 10, penalización de longitud de interrupción=10). Los parámetros por defecto de los alineamientos de dos secuencias usando el método CLUSTAL son KTUPLE 1, Penalización de interrupción = 3, VENTANA = 5 y Diagonales Salvadas = 5.

Los siguientes parámetros de ejecución se prefieren para la determinación de alineamientos y similitudes usando BLASTN que contribuyen a los valores de E y porcentaje de identidad de secuencias de polinucleótidos: comando que ejecuta Unix : blastall -p blastn -d embldb -e 10 -G0 -E0 -r 1 -v 30 -b 30 -i queryseq -o resultados; los parámetros son: -p Nombre del Programa [Cadena]; -d Base de datos [Cadena]; -e Valor de Expectativa (E) [Real]; -G Costo para abrir una interrupción (cero invoca el comportamiento por defecto) [Entero]; -E Costo para extender una interrupción (cero invoca el comportamiento por defecto) [Entero]; -r Recompensa para una coincidencia de nucleótidos ((blastn solamente) [Entero]; -v Número de descripciones en línea (V) [Entero]; -b Número de alineamientos para mostrar (B) [Entero]; archivo de consulta -i [Archivo En]; y -o archivo para salida de informe BLAST [Archivo Salida] Opcional.

Los "aciertos" con una o más secuencias de la base de datos de una secuencia consultada producida por BLASTN, FASTA, BLASTP o un algoritmo similar, alinean e identifican porciones similares de secuencias. Los aciertos se disponen en orden del grado de similitud y la longitud de superposición de la secuencia. Los aciertos con una secuencia de base de datos generalmente, representan una superposición sobre sólo una fracción de la longitud de la secuencia de la secuencia de consulta.

Los algoritmos BLASTN, FASTA y BLASTP también producen valores "Expectativa" para los alineamientos. El valor Expectativa (E) indica el número de aciertos que uno puede "esperar" ver por encima de un cierto número de secuencias contiguas por casualidad cuando se busca una base de datos de un cierto tamaño. El valor Expectativa se usa como umbral de significación para determinar si el acierto a una base de datos, tal como la base de datos EMBL preferida, indica similitud válida. Por ejemplo, un valor de E de 0.1 asignado a un acierto de polinucleótido se interpreta como que significa que en una base de datos del tamaño de la base de datos EMBL, uno puede esperar ver 0.1 coincidencias sobre la porción alineada de la secuencia con una puntuación similar simplemente por casualidad. Por este criterio, las porciones alineadas y coincidentes de las secuencias de polinucleótidos después, tienen una probabilidad de 90% de ser las mismas. Para las secuencias que tienen un valor E de 0.01 o menos sobre las porciones alineadas y coincidentes, la probabilidad de encontrar una coincidencia por casualidad en la base de datos EMBL es 1% o menos usando el algoritmo BLASTN o FASTA.

Como consecuencia, los polinucleótidos "variante" comprenden preferentemente secuencias que tienen el mismo número o menos ácidos nucleicos que cada uno de los polinucleótidos de la presente descripción y que producen un valor de E de 0.01 o menos cuando se compara con el polinucleótido de la presente descripción. Es decir, un polinucleótido variante es cualquier secuencia que tiene al menos 99% de probabilidad de ser la misma que el

polinucleótido de la presente descripción, medida como que tiene un valor E de 0.01 o menos usando los algoritmos BLASTN, FASTA, o BLASTP fijados en los parámetros descritos anteriormente.

Alternativamente, los polinucleótidos variantes de la presente descripción se hibridan a las secuencias de polinucleótidos enumeradas en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25 o complementos, secuencias inversas, o complementos inversos de esas secuencias, bajo condiciones estrictas.

La presente descripción también se relaciona con polinucleótidos que difieren de las secuencias descritas pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que es el mismo que el codificado por un polinucleótido de la presente descripción. Así, los polinucleótidos que comprenden secuencias que difieren de las secuencias de polinucleótidos enumeradas en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25; o complementos, secuencias inversas, o complementos inversos de estas, como resultado de sustituciones conservadoras se contemplan por y abarcan dentro de la presente descripción. Además, los polinucleótidos que comprenden secuencias que difieren de las secuencias de polinucleótidos enumeradas en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25, o complementos, complementos inversos o secuencias inversas de estas, como resultado de delecciones y/o inserciones por un total de menos de 10% de la longitud total de la secuencia también se contemplan por y abarcan dentro de la presente descripción

Además de tener un porcentaje de identidad específico, los polinucleótidos variantes tienen preferentemente estructura adicional y/o características funcionales en común con el polinucleótido descrito. Además de compartir un alto grado de similitud en su estructura primaria, los polinucleótidos que tienen un grado especificado de identidad a, o capaces de hibridarse a un polinucleótido descrito tienen preferentemente al menos una de las siguientes características: (i) contienen un marco de lectura abierto o marco de lectura parcial abierto que codifica un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales que el polipéptido codificado por el polinucleótido descrito; o (ii) tienen dominios comunes.

Fuente de elementos y secuencias de ADN

Cualquiera o todos los elementos y secuencias de ADN que se describen en la presente descripción pueden ser endógenos a uno o más genomas de planta. Como consecuencia, todos los elementos y secuencias de ADN, que se seleccionan para el casete de transferencia final son endógenos a, o nativos a, el genoma de la planta que debe ser transformada. Por ejemplo, todas las secuencias pueden provenir de un genoma de la papa. Alternativamente, uno o más de los elementos o secuencias de ADN pueden ser endógenos a un genoma de planta que no es el mismo que la especie de la planta que se transforma, pero que en cualquier caso funciona en la célula de la planta huésped. Tales plantas incluyen papa, tomate, y plantas de alfalfa. Se describe también el uso de uno o más elementos genéticos de una planta que es interfértil con la planta que debe ser transformada.

En este sentido, una "planta" incluye, pero no se limita a papa, tomate, aguacate, alfalfa, remolacha, mandioca, boniato, frijol de soya, chícharo, judía, maíz, trigo, arroz, cebada y sorgo. Así, una planta puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. "Planta" y "material vegetal", también abarca células de la planta, semilla, progenie de la planta, propágulos ya sea generado sexual o asexualmente, y descendientes de cualquiera de éstos, tales como esquejes o semilla. "Material vegetal" puede referirse a las células de la planta, cultivos celulares en suspensión; callos, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, semillas, plántulas en germinación y microsporas. Las plantas pueden estar en diferentes etapas de madurez y se puede crecer en cultivo líquido o sólido, o en el suelo o los medios adecuados, en macetas, invernaderos o campos. La expresión de un líder introducido, secuencias de remolque o de genes en las plantas puede ser transitoria o permanente.

En este sentido, una secuencia borde de ADN de transferencia derivado de planta ("ADN-P") no es idéntico en secuencia de nucleótidos a cualquier secuencia conocida borde de ADN-T derivado de bacteria, pero funciona esencialmente para el mismo propósito. Es decir, el ADN-P se puede usar para transferir e integrar un polinucleótido en otro. Un ADN-P se puede insertar en un plásmido inductor de tumor, tal como un plásmido-Ti de *Agrobacterium* en lugar de un ADN-T convencional, y se mantiene en una cepa de bacteria, al igual que los plásmidos de transformación convencional. El ADN-P se puede manipular para que contenga un polinucleótido deseado, que se destina para la integración en un genoma de la planta a través de la transformación de plantas mediada por bacteria. Ver Rommens y otros en WO2003/069980, US-2003-0221213, US-2004-0107455, y WO2005/004585.

Así, una secuencia borde de ADN-P es diferente por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleótidos de una secuencia borde conocida de ADN-T de una especie de *Agrobacterium*, tales como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*.

Una secuencia borde de ADN-P no es mayor que 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%,

66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% o 50% similar en secuencia de nucleótidos a una secuencia borde de ADN-T de *Agrobacterium*.

Se desarrollaron métodos para identificar y aislar ADN de transferencia a partir de las plantas, particularmente papa y trigo, e hicieron uso del motivo borde consenso descrito en US-2004-0107455.

En este sentido, un ADN derivado de planta de la presente descripción, tal como cualquiera de las secuencias, sitios de escisión, regiones, o elementos descritos en la presente descripción es funcional si promueve la transferencia e integración de un polinucleótido al que se enlaza en otra molécula de ácido nucleico, tal como en un cromosoma de la planta, a una frecuencia de transformación de aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 97%, aproximadamente 96%, aproximadamente 95%, aproximadamente 94%, aproximadamente 93%, aproximadamente 92%, aproximadamente 91%, aproximadamente 90%, aproximadamente 89%, aproximadamente 88%, aproximadamente 87%, aproximadamente 86%, aproximadamente 85%, aproximadamente 84%, aproximadamente 83%; aproximadamente 82%, aproximadamente 81%, aproximadamente 80%, aproximadamente 79%, aproximadamente 78%, aproximadamente 77%, aproximadamente 76%, aproximadamente 75%, aproximadamente 74%, aproximadamente 73%, aproximadamente 72%, aproximadamente 71 %, aproximadamente 70%, aproximadamente 69%, aproximadamente 68%, aproximadamente 67%, aproximadamente 66%, aproximadamente 65%, aproximadamente 64%, aproximadamente 63%, aproximadamente 62%, aproximadamente 61%, aproximadamente 60%, aproximadamente 59%, aproximadamente 58%, aproximadamente 57%, aproximadamente 56%, aproximadamente 55%, aproximadamente 54%, aproximadamente 53%, aproximadamente 52%, aproximadamente 51 %, aproximadamente 50%, aproximadamente 49%, aproximadamente 48%, aproximadamente 47%, aproximadamente 46%, aproximadamente 45%, aproximadamente 44%, aproximadamente 43%, aproximadamente 42%, aproximadamente 41%, aproximadamente 40%, aproximadamente 39%, aproximadamente 38%, aproximadamente 37%, aproximadamente 36%, aproximadamente 35%, aproximadamente 34%, aproximadamente 33%, aproximadamente 32%, aproximadamente 31%, aproximadamente 30%, aproximadamente 29%, aproximadamente 28%, aproximadamente 27%, aproximadamente 26%, aproximadamente 25%, aproximadamente 24%, aproximadamente 23%, aproximadamente 22%, aproximadamente 21%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, o aproximadamente 5% o al menos aproximadamente 1%.

Cualquiera de tales secuencias y elementos relacionados con la transformación se pueden modificar o mutar para cambiar la eficiencia de transformación. Otras secuencias de polinucleótidos se pueden añadir a una secuencia de transformación de la presente descripción. Por ejemplo, se puede modificar para poseer sitios de clonación múltiples 5' y 3', o sitios de restricción adicionales. La secuencia de un sitio de escisión como se describe en la presente descripción, por ejemplo, se puede modificar para aumentar la probabilidad de que la cadena principal de ADN a partir del vector de acompañamiento no se integre en un genoma de la planta.

Cualquier polinucleótido deseado se puede insertar entre cualesquiera secuencias de escisión o borde descritos en la presente descripción. Por ejemplo, un polinucleótido deseado puede ser un gen silvestre o modificado que es nativo a una especie de planta, o puede no ser un gen de un genoma de planta. Por ejemplo, al transformar una planta de papa, un casete de expresión se puede elaborar que comprenda un promotor específico de papa que se enlaza operativamente a un gen de papa deseado o fragmento de esta y un terminador específico de papa. El casete de expresión puede contener elementos genéticos adicionales de la papa tal como una secuencia de péptido señal fusionado en marco al extremo 5' del gen, y un potenciador transcripcional de papa. La presente descripción no se limita a un arreglo de ese tipo y un casete de transformación se puede construir tal que el polinucleótido deseado, mientras se enlaza operativamente a un promotor, no se enlaza operativamente a una secuencia de terminador.

Cuando una secuencia o elemento relacionado con la transformación, tales como los descritos en la presente descripción, se identifican y aíslan de una planta, y si esa secuencia o elemento se usa posteriormente para transformar una planta de la misma especie, esa secuencia o elemento pueden ser descritos como "nativo" al genoma de la planta.

Así, un elemento genético "nativo" se refiere a un ácido nucleico que existe de forma natural en, se origina a partir de, o pertenece al genoma de una planta que debe ser transformado. En el mismo sentido, el término "endógeno" también se puede usar para identificar un ácido nucleico particular, por ejemplo, ADN o ARN, o una proteína como "nativo" para una planta. Endógeno significa un elemento que se origina dentro del organismo. Así, cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm, o molécula de ADNc que se aísla ya sea a partir del genoma de una especie de planta o planta que debe ser transformada o se aísla de una planta o especie que es sexualmente compatible o interfértil con la especie de planta que debe ser transformada, es "nativo" para, es decir, endógeno a, las especies de la planta. En otras palabras, un elemento genético nativo representa todo el material genético que es accesible a los fitomejoradores para el mejoramiento de las plantas a través de fitomejoramiento clásico. Cualquier variante de un ácido nucleico nativo también se considera "nativo" de acuerdo con la presente invención. En este sentido, un ácido nucleico "nativo" también se puede aislar a partir de una planta o especies sexualmente compatibles, de esta y modificar o mutar de forma que la variante resultante es mayor que o igual a 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%,

68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, o 60% similar en secuencia de nucleótidos con el ácido nucleico no modificado, nativo aislado de una planta. Una variante de ácido nucleico nativo también puede ser menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 55%, o menos de aproximadamente 50% similar en la secuencia de nucleótidos.

Un ácido nucleico "nativo" aislado a partir de una planta también puede codificar una variante del producto de proteína de origen natural transcrito y traducido a partir de ese ácido nucleico. Así, un ácido nucleico nativo puede codificar una proteína que es mayor que o igual a 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, o 60% similar en secuencia de aminoácidos a la proteína no modificada, nativa expresada en la planta de la que se aisló el ácido nucleico.

Promotores

El polinucleótido descrito en la presente descripción se puede usar para dirigir específicamente la expresión de polipéptidos o proteínas en los tejidos de las plantas. El ácido nucleico descrito en la presente descripción también se puede usar para dirigir específicamente la expresión de ARN antisentido, o ARN implicados en la interferencia por ARN (iARN), tales como ARN interferente pequeño (ARNip), en los tejidos de las plantas, que pueden ser útiles para inhibir o bloquear completamente la expresión de genes específicos. Como se usa en la presente descripción, "producto codificante" pretende significar el producto final del ácido nucleico que se enlaza operativamente a los promotores. Por ejemplo, una proteína o polipéptido es un producto codificante, así como ARN antisentido o ARNip que es el producto final del ácido nucleico que codifica para el ARN antisentido. El producto codificante también puede ser ARNm no traducido. Los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, el promotor pretende significar un ácido nucleico, preferentemente ADN que se une al ARN polimerasa y/u otros elementos reguladores de transcripción. Como con cualquier promotor, los promotores descritos en la presente descripción facilitarán o controlarán la transcripción de ADN o ARN para generar una molécula de ARNm a partir de una molécula de ácido nucleico que se enlaza operativamente al promotor. El ARN puede codificar para una proteína o un polipéptido o puede codificar para un ARN de interferencia, o molécula antisentido. Como se usa en la presente descripción, "enlazado operativamente" significa que se refiere a la fusión química, ligación, o síntesis de ADN tal que una combinación de secuencia de ácido nucleico-promotor se forma en una orientación adecuada para la secuencia de ácido nucleico que se transcribe en un segmento de ARN. Los promotores también pueden contener todos o algunos de la región 5' no traducida (5' UTR) del transcrito ARNm resultante. Por otro lado, los promotores no necesariamente requieren poseer cualquiera de 5' UTR.

Un promotor, como se usa en el presente descripción, también puede incluir elementos reguladores. A la inversa, un elemento regulador puede también ser separado de un promotor. Los elementos reguladores confieren una serie de características importantes sobre una región promotor. Algunos elementos unen factores de transcripción que mejoran la velocidad de transcripción del ácido nucleico operativamente enlazado. Otros elementos unen represores que inhiben la actividad de transcripción. El efecto de la transcripción, factores sobre la actividad del promotor puede determinar si la actividad del promotor es alta o baja, es decir, si el promotor es "fuerte" o "débil".

Alternativamente, un promotor constitutivo se puede usar para expresar las secuencias de polinucleótidos de la invención.

Una variedad de promotores inducibles génicos de la planta se puede usar para expresar las secuencias de polinucleótidos de la invención. Los promotores inducibles regulan la expresión génica en respuesta a señales ambientales, hormonales, o químicas. Ejemplos de promotores inducibles de hormona incluyen promotores inducibles de auxina (Baumann y otros Plant Cell 11:323-334(1999)), promotor inducible de citoquinina (Guevara-Garcia Plant Mol. Biol. 38:743-753(1998)), y promotores sensibles a gibberelina (Shi y otros Plant Mol. Biol. 38:1053-1060(1998)). Además, los promotores sensibles al calor, luz, lesiones, resistencia a patógenos y sustancias químicas tales como el jasmonato de metilo o ácido salicílico, se puede usar para expresar las secuencias de polinucleótidos de la invención.

El promotor puede ser un promotor sintasa de almidón unida a gránulo, un promotor del gen ADP-glucosa pirofosforilasa de la papa, o un promotor del gen flavinoide 3'-monooxigenasa. El promotor puede ser un promotor específico de semilla.

Se describen también polinucleótidos que difieren de las secuencias descritas pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que es el mismo que el codificado por un polinucleótido de la presente invención. Así, los polinucleótidos que comprenden secuencias que difieren de las secuencias de polinucleótidos enumeradas en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25; o complementos, secuencias inversas, o complementos inversos de estas, como resultado de sustituciones conservadoras se contemplan por y abarcan dentro de la presente descripción. Además, los polinucleótidos que comprenden secuencias que difieren de las secuencias de polinucleótidos enumeradas en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 15, 23, 24, o 25

o complementos, complementos inversos o secuencias inversas de estas, como resultado de delecciones y/o inserciones por un total de menos de 10% de la longitud total de la secuencia también se contemplan por y abarcan dentro de la presente descripción.

- 5 Además de tener un porcentaje de identidad específico con una secuencia de polinucleótido descrita, los polinucleótidos variantes preferentemente tienen en común estructura adicional y/o características funcionales. Además de compartir un alto grado de similitud en su estructura primaria con los polinucleótidos descritos en la presente descripción, los polinucleótidos que tienen un grado especificado de identidad a, o capaces de hibridarse a un polinucleótido descrito tienen preferentemente al menos una de las siguientes características: (i) contienen un marco de lectura abierto o marco de lectura parcial abierto que codifica un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales que el polipéptido codificado por el polinucleótido descrito; o (ii) tienen dominios comunes.

Fuente de elementos y secuencias de ADN

- 15 Cualquiera o todos los elementos y secuencias de ADN que se describen en la presente descripción pueden ser endógenos a uno o más genomas de plantas. Como consecuencia, todos los elementos y secuencias de ADN, que se seleccionan para el casete de transferencia final pueden ser endógenos a, o nativos a, el genoma de la planta que debe ser transformado. Por ejemplo, todas las secuencias puede provenir de un genoma de la papa. Alternativamente, uno o más de los elementos o secuencias de ADN pueden ser endógenos a un genoma de planta que no es el mismo que la especie de la planta que se transforma, pero que en cualquier caso funciona en la célula de la planta huésped.

Tales plantas incluyen papa, tomate, y plantas de alfalfa. Se puede usar uno o más elementos genéticos de una planta que es interfértil con la planta que debe ser transformada.

- 25 En este sentido, una "planta" incluye, pero no se limita a papa, tomate, alfalfa, remolacha, mandioca, boniato, frijol de soya, chícharo, judía, maíz, trigo, arroz, cebada y sorgo. "Planta" y "material vegetal", también abarca células de plantas, semillas, progenie de la planta, propágulo si se genera sexual o asexualmente, y descendientes de cualquiera de estos, tales como esquejes o semilla. El "Material vegetal" puede referirse a las células de planta, cultivos celulares en suspensión, callos, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, semillas, plántulas en germinación y microsporas. Las plantas pueden estar en diferentes etapas de madurez y se puede crecer en cultivo líquido o sólido, o en el suelo o medios adecuados, en macetas, invernaderos o campos. La expresión de un líder introducido, secuencias de remolque o de genes en las plantas puede ser transitoria o permanente.

- 35 Constructos de Ácido nucleico

La presente descripción se refiere a constructos que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas y secuencias de polipéptidos descritas en la presente descripción. Los constructos de ADN pueden ser plásmidos Ti derivados de *A. tumefaciens*

- 40 Al desarrollar los constructos de ácidos nucleicos, los diversos componentes del constructo o fragmentos de estos normalmente se pueden insertar en un vector de clonación conveniente, por ejemplo, un plásmido que es capaz de la replicación en un huésped bacteriano, por ejemplo, *E. coli*. Existen numerosos vectores que se han descrito en la literatura, muchos de los que están disponibles comercialmente. Después de cada clonación, el vector de clonación con el inserto deseado se puede aislar y someter a manipulación adicional, tales como la digestión por restricción, inserción de nuevos fragmentos o nucleótidos, ligación, delección, mutación, resección, etc., para adaptar los componentes de la secuencia deseada. Una vez que el constructo se ha completado, entonces se puede transferir a un vector adecuado para la manipulación adicional de acuerdo con la manera de transformación de la célula huésped.

- 50 Una molécula de ADN recombinante puede incluir típicamente un marcador seleccionable de manera que las células transformadas pueden ser fácilmente identificadas y seleccionadas a partir de células no transformadas. Ejemplos de tales marcadores incluyen, pero sin limitarse a, un gen de la neomicina fosfotransferasa (nptII) (Potrykus y otros, Mol. Gen. Genet. 199:183-188 (1985)), que confiere resistencia a la kanamicina. Las células que expresan el gen nptII se pueden seleccionar usando un antibiótico adecuado, tal como la kanamicina o G418. Otros marcadores de selección usados comúnmente incluyen el gen bar, que confiere resistencia a la bialafos; un gen mutante EPSP sintasa (Hinchee y otros, Bio/Technology 6:915-922 (1988)), que confiere resistencia al glifosato; y un gen mutante de acetolactato sintasa (ALS), que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea (Solicitud de Patente Europea 154,204, 1985).

- 60 Además, los vectores pueden incluir un origen de replicación (replicones) para una célula huésped particular. Varios replicones procariotas son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, y funcionan para dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de una molécula recombinante en una célula huésped procariota.

Se proporcionan también células huésped que comprenden constructos de ADN. Como se usa en la presente

descripción, una célula huésped se refiere a la célula en la que el producto codificante se expresa en última instancia. Como consecuencia, una célula huésped puede ser una célula individual, un cultivo celular o células como parte de un organismo. La célula huésped también puede ser una parte de una célula de embrión, endosperma, esperma o huevo, o un óvulo fertilizado.

Se proporcionan también plantas o células de plantas, que comprenden los constructos de ADN. Preferentemente, las plantas son angiospermas o gimnospermas. El constructo de expresión se puede usar para transformar una variedad de plantas, tanto monocotiledóneas (por ejemplo, trigo, césped, maíz, arroz, avena, trigo, cebada, sorgo, orquídea, iris, lirio, cebolla, plátano, caña de azúcar, y palma), dicotiledóneas (por ejemplo, Arabidopsis, papa, tabaco, tomate, aguacate, pimienta, remolacha, brócoli, mandioca, boniato, algodón, flor de pascua, legumbres, alfalfa, frijol de soya, chícharo, judía, pepino, uva, brassica, zanahoria, fresa, lechuga, roble, arce, nuez de Castilla, rosa, menta, calabacín, margarita, y cactus, robles, eucaliptos, arce) y Gimnospermas (por ejemplo, Pino albar, ver Aronen, Finnish Forest Res. Papers, Viol. 595, 1996), abeto blanco (Ellis y otros., Biotechnology 11:84-89, 1993), y alerce (Huang y otros., In Vitro Cell 27:201-207, 1991).

Transformación y Regeneración de Planta

Los polinucleótidos y polipéptidos presentes se pueden introducir en una célula de planta huésped mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica para introducir secuencias recombinantes en una célula huésped objetivo. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitarse a, transfección, infección, transformación, absorción natural, electroporación, biolística y Agrobacterium. Los métodos para introducir genes foráneos en las plantas son conocidos en la técnica y se pueden usar para insertar un constructo en una planta huésped, que incluyen, protocolos de transformación de plantas biológicos y físicos. Ver, por ejemplo, Miki y otros, 1993, "Procedure for Introducing Foreign DNA into Plants", In: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick y Thompson, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, páginas 67-88. Los métodos elegidos varían con la planta huésped, e incluyen métodos de transfección químicos tales como fosfato de calcio, transferencia de genes mediada por microorganismos tales como Agrobacterium (Horsch y otros, Science 227:1229-31, 1985), electroporación, micro-inyección, y bombardeo biolístico. Los métodos de transformación preferidos incluyen reproducción precisa (ver: solicitudes de patente de los Estados Unidos 2003/0221213 A1, 2004/0107455 A1, y 2005/0229267 A1) y la transformación refinada (ver la solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0034188 A1).

Se proporcionan también plantas o células de plantas, que comprenden los polinucleótidos o polipéptidos. Las plantas pueden ser angiospermas o gimnospermas. Más allá del significado ordinario de la planta, el término "plantas" también pretende significar la fruta, semillas, flor cono etc, de la planta. La planta puede ser un transfectante directo, lo que significa que el vector se introdujo directamente en la planta, tales como a través de Agrobacterium, o la planta puede ser la progenie de una planta transfectada- La progenie se puede obtener también por reproducción asexual de una planta transfectada. La segunda o posterior generación de la planta se puede o no se puede producir por reproducción sexual, es decir, fertilización. Además, la planta puede ser un gametofito (etapa haploide) o un esporofito (etapa diploide).

En este sentido, la presente descripción contempla la transformación de una planta con uno o más elementos de transformación que se originan genéticamente a partir de una planta.

Un enfoque de "todo-nativo" para la transformación, se describe, por el cual sólo los elementos de transformación que son nativos a las plantas se integran en última instancia, en una planta deseada a través de la transformación. En este sentido, se describe la transformación de una especie de planta particular con sólo los elementos de transformación genética que son nativos a esa especie de planta. El enfoque nativo también puede significar que un elemento de transformación particular se aísla de la misma planta que debe ser transformada, la misma especie de planta o a partir de una planta que es sexualmente interfértil con la planta que se transforma.

Por otro lado, la planta que debe ser transformada, puede ser transformada con un casete de transformación que contiene uno o más elementos genéticos y secuencias que se originan a partir de una planta de una especie diferente. Puede ser deseable usar, por ejemplo, un sitio de escisión, que es nativo de un genoma de papa en un casete de transformación o plásmido para transformar una planta de tomate o pimienta.

La presente descripción no se limita, sin embargo, a enfoque nativo o todo nativo. Un casete de transformación o plásmido de la presente invención puede comprender además secuencias y elementos de otros organismos, tales como a partir de una especie bacteriana.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Expresión de genes de asparagina sintetasa regulada negativamente

Este ejemplo demuestra que la expresión regulada negativamente de un gen implicado en la biosíntesis de asparagina en los tejidos ricos en almidón de un cultivo disminuye la cantidad de asparagina en estos tejidos ricos en almidón y, por consiguiente, disminuye la cantidad de acrilamida en un alimento obtenido del calentamiento de estos tejidos ricos en almidón.

La secuencia del gen de la asparagina sintetasa-1 (AST1) de papa se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1. La secuencia parcial del gen de la asparagina sintetasa-2 (Ast2) de papa se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2.

Los fragmentos de estos genes, que se muestran en la sec. con núm. de ident.: 3 y 4, se enlazaron para crear la sec. con núm. de ident.: 5. Se insertaron dos copias del segmento de ADN resultante, como repetición invertida y separados por el espaciador que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 6, entre los promotores orientados de forma convergente de los genes de ADP-glucosa pirofosforilasa (Agp) y sintasa de almidón unida a gránulo (Gbss) (sec. con núm. de ident.: 7 y 8, respectivamente).

Se insertó el constructo de silenciamiento resultante entre los bordes de un ADN-T que ya contenía un casete de expresión para el gen marcador seleccionable neomicina fosfotransferasa (nptII).

Un vector binario que porta este ADN-T, designado pSIM1148 (Figura 1A), se introdujo en *Agrobacterium* LBA4404 como sigue. Las células competentes LB4404 (50 µL) se incuban durante 5 min en hielo en presencia de 1 µg de ADN vector, congelado durante aproximadamente 15 s en nitrógeno líquido, y se incuban a 37 °C durante 5 min. Después de añadir 1 mL de caldo líquido, las células tratadas se cultivan durante 3 horas a 28 °C y se siembran en caldo líquido/agar que contiene estreptomicina (100 mg/L) y kanamicina (100 mg/L). Los ADN vector se aíslan después a partir de cultivos de toda la noche de colonias LBA4404 individuales y se examinan mediante análisis de restricción para confirmar la presencia de ADN de plásmido intacto.

Diluciones de diez veces de cultivos de *Agrobacterium* que crecieron durante toda la noche se cultivaron durante 5-6 horas, precipitaron durante 15 minutos a 2,800 RPM, se lavaron con medio MS líquido (Phytotechnology) suplementado con sacarosa (3%, pH 5.7), y se resuspendieron en el mismo medio a 0.2 OD/600 nm. Las células resuspendidas se mezclaron y usaron para infectar 0.4-0.6 mm segmentos internodales de la variedad de papa. "Ranger Russet".

Los tallos infectados se incubaron durante dos días en medio de co-cultivo (sales MS 1/10, 3% sacarosa, pH 5.7) que contiene 6 g/L de agar a 22 °C en una cámara de crecimiento Percival (luz 16 hrs) y posteriormente se transfirieron a medio de inducción de callo (medio CIM, MS suplementado con 3% sacarosa 3, 2.5 mg/L de ribósido de zeatina, 0.1 mg/L de ácido acético naftaleno, y 6 g/L de agar) que contiene timentin (150 mg/L) y kanamicina (100 mg/L). Después de un mes de cultivo en CIM, los explantos se transfirieron al medio de inducción del brote (medio SIM, MS suplementado con 3% sacarosa, 2.5 mg/L de zeatina ribósido, 0.3 mg/L de ácido giberélico GA3, y 6 g/L de agar) que contiene timentin y kanamicina (150 y 100 mg/L respectivamente) hasta que surgieron los brotes. Los brotes que surgen al final del período de regeneración se transfirieron a medio MS con 3% sacarosa, 6 g/L de agar y timentin (150 mg/L). Las plantas transgénicas se transfirieron al suelo y colocaron en un invernadero.

Después de tres meses, los tubérculos se cosecharon y analizaron los niveles de asparagina de acuerdo con el Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2002), 17ma Edición, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA Official Method 982.30. Este análisis demostró que 17 de 26 plantas pSIM1148 contuvieron sólo aproximadamente de 25% a 50% de la asparagina que estaba presente en las plantas de control (Tabla 1)

Los tubérculos de algunas de las plantas con bajo contenido de asparagina se cortaron, escaldaron, frieron a la par, y frieron hasta el acabado para producir papas fritas a la francesa. Estas papas fritas a la francesa se molieron hasta un polvo fino en nitrógeno líquido que se suministró en hielo seco a los laboratorios Covance. En Covance, los niveles de acrilamida se determinaron mediante la realización de cromatografía líquida/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC/MS/MS) (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada Oficina de Planta & Dairy Foods and Beverages, "Detection and Quantitation of Acrylamide in Foods", 2002). La Tabla 2 muestra que las papas fritas de las plantas pSIM48 con bajo contenido de asparagina acumulan menos de aproximadamente un tercio de la acrilamida que se produce en las papas fritas de control.

Como una alternativa al uso de los promotores de Agp y Gbss como elementos reguladores, también es posible emplear dos promotores de Gbss. Un constructo que contiene la repetición invertida que comprende los fragmentos de genes de Ast1 y Ast2 insertados entre dos promotores de Gbss se introdujo entre bordes de ADN-T para producir el vector binario pSM1151 (Figura 1B). Este vector se usó para producir líneas transgénicas de papa de una manera similar a la descrita para pSIM1148. Además, las secuencias derivadas de los genes de Ast se pueden insertar entre un promotor y un terminador.

Para cualquier gen de *Ast*, puede haber otras secuencias que tienen un alto grado de similitud de secuencia. Es posible usar tales secuencias homólogas para producir constructos de silenciamiento. Por ejemplo, los fragmentos de un gen de *Ast* de tomate se pueden usar para silenciar el gen de *Ast* homólogo en la papa.

A continuación de la identificación de un gen de *Ast* derivado de planta, los iniciadores específicos de gen se diseñan para la amplificación del gen por PCR. La amplificación por PCR se realiza de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y después la PCR amplifica el gen de asparaginasa que se clona en un vector de clonación,

Los genes de *Ast* se pueden identificar ya sea mediante búsquedas en bases de datos o aislar de ADN de la planta. Un ejemplo de genes de *AST* de un cultivo que no sea de papa es los genes de *Ast* de trigo que se muestra en las sec. con núm. de ident.: 34 y 35. El silenciamiento simultáneo de estos genes en el grano de trigo hará posible reducir los niveles de asparagina en la harina y, por consiguiente, los niveles de acrilamida en, por ejemplo, pan, bizcocho, galletas dulces, o galletas saladas.

En lugar de usar fragmentos de genes de *Ast* para la producción de un constructo de silenciamiento, también es posible emplear fragmentos obtenidos a partir de los promotores de los genes de *Ast*. Tales promotores se pueden aislar por métodos que aplican tales como PCR inversa, y dos copias de fragmentos de promotor específicos de 150-600 pares de bases se pueden insertar después como repetición invertida entre ya sea un promotor y terminador o dos promotores orientados de forma convergente (ver: Rommens y otros., Solicitud de Patente Mundial 2006/036739 A2, que se incorpora en la presente como referencia).

EJEMPLO 2

Sobreexpresión de los genes de la asparaginasa

Este ejemplo demuestra que la sobreexpresión de un gen implicado en el metabolismo de la asparagina en los tejidos ricos en almidón de un cultivo disminuye la cantidad de asparagina en estos tejidos ricos en almidón y, por consiguiente, disminuye la cantidad de acrilamida en un alimento obtenido del calentamiento de estos tejidos ricos en almidón.

La secuencia del gen de asparaginasa de papa (*Asg1*) a partir de la variedad de papa Ranger Russet se muestra en la sec. con núm. de ident.: 9. El marco de lectura abierto correspondiente y la secuencia de aminoácidos predicha se muestra en las sec. con núms. de ident.: 10 y 11, respectivamente. Un vector binario que contiene el gen de *Asg1* insertado entre el promotor *Agp* y terminador *Ubi3* (sec. con núm. de ident.: 12) se designa pSIM658 (Figura 1C).

Los niveles de expresión del gen *Asg1* en los tubérculos se determinaron mediante la aplicación del PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa. La Tabla 3 muestra que los tubérculos de 18 de las 25 plantas pSIM658 sobreexpresan el gen de *Arg1* aproximadamente de 2 a 20 veces. Estos tubérculos se usaron para producir papas fritas a la francesa. El análisis químico demostró que las papas fritas de dos de las líneas transgénicas contuvieron niveles reducidos de acrilamida (Tabla 4).

Es posible también emplear otros promotores específicos de tubérculo para dirigir la expresión del gen de *Asg1*. El plásmido pSIM757 contiene el promotor de *Gbss* enlazado operativamente al gen de *Asg1*. La transformación de la papa con el ADN de transferencia de este plásmido produce plantas resistentes a la kanamicina que sobreexpresan el gen de *Asg1*. Otros promotores que se pueden usar para conducir la expresión de asparaginasa en tubérculos de papa se pueden seleccionar del grupo que consiste de los promotores de patatina, promotores inducibles por frío, y promotores flavonoide-3'-mono-oxigenasa (*Fmo*). Un promotor *Fmo* se muestra en la sec. con núm. de ident.: 13. Este promotor es activo en tubérculos semi-maduros y maduros pero no en mini-tubérculos.

En lugar de usar *Asg1*, también es posible explotar otros genes de la asparaginasa. La sec. con núm. de ident.: 14 muestra la secuencia de ADNc del gen alternativo *Asg2* de la asparaginasa de la papa. Otros ejemplos de genes de la asparaginasa incluyen el gen de asparaginasa de *E. coli* (número de acceso Z1051m; sec. con núm. de ident.: 31), *Agrobacterium* (acceso Atu3044; sec. con núm. de ident.: 32), cebada (acceso AF308474; sec. con núm. de ident.: 33), y cualquier gen que codifica una proteína con el motivo pfam01 112.12 (Marchler-Bauer y otros, Nucleic Acids Res 33, D192-6, 2005).

La secuencia del gen de asparaginasa de trigo se muestra en la sec. con núm. de ident.: 15. La secuencia de aminoácidos predicha se representa en la sec. con núm. de ident.: 16.

Para cualquier gen de asparaginasa, puede haber otras secuencias de asparaginasa que tienen un alto grado de similitud de secuencia. Por ejemplo, un gen de asparaginasa derivado de plantas se puede identificar mediante la búsqueda en bases de datos tales como las mantenidas por NCBI.

A continuación de la identificación de un gen de asparaginasa derivado de planta, los iniciadores específicos del gen se diseñan para la amplificación por PCR del gen de asparaginasa. La amplificación por PCR se realiza de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y después la PCR amplifica el gen de asparaginasa que se clona en un vector de clonación.

La asparaginasa se enlaza operativamente a un promotor específico de semilla tal como el promotor del gen puroindolina de trigo representado en la sec. con núm. de ident.: 17. Un ADN de transferencia que comprende el casete de expresión resultante se introduce usando métodos de transformación convencionales para la producción de trigo de bajo contenido de asparagina. La harina derivada de la semilla de trigo acumulará menos acrilamida durante el calentamiento.

EJEMPLO 3

Sobreexpresión de una glutamina sintetasa

La sobreexpresión de un gen de glutamina sintetasa resultará en niveles reducidos de asparagina. Cualquier secuencia que codifica una proteína con actividad de glutamina sintetasa se puede enlazar operativamente a un promotor que se expresa en un órgano de la planta deseada, tal como un tubérculo de papa. La papa contiene tres genes relacionados de glutamina sintetasa, que se muestran en las sec. con núms. de ident.: 28-30. Un segmento de ADN que comprende un fragmento de cada uno de estos genes se puede usar para efectivamente regular negativamente la actividad de la glutamina sintetasa. Para este propósito, al menos una copia del segmento se puede insertar entre cualquiera de dos promotores convergentes o un promotor y terminador. El casete de expresión resultante se puede introducir en la planta de interés mediante el empleo de cualquier método de transformación, las plantas transgénicas que producen órganos de la planta con bajo contenido de asparagina se pueden seleccionar. El tratamiento térmico de estos órganos de la planta proporcionará productos que contienen menos acrilamida que los productos obtenidos a partir del correspondiente. Por ejemplo, un tubérculo transgénico procesado rendirá papas fritas a la francesa que contienen niveles inferiores de acrilamida que las papas fritas a la francesa obtenidas de tubérculos no transformados. El resultado de la sobreexpresión de la glutamina sintetasa en los niveles de asparagina se ha descrito en por Harrison y colaboradores (Plant Physiology 133: 252-262, 2003). Sin embargo, estos autores no podían haber previsto las consecuencias inesperadas de los niveles reducidos de asparagina en una disminución fuerte de la acumulación inducida por el calor de la acrilamida.

Del mismo modo, es posible regular negativamente la expresión de un gen endógeno que presenta actividad nitrato reductasa. Para este propósito, se puede expresar al menos una copia de parte del gen o promotor de un gen de la nitrato reductasa. Las plantas transgénicas se pueden tamizar para los niveles de expresión de los genes de nitrato reductasa, y las líneas que muestran niveles reducidos posteriormente se pueden tamizar para los niveles reducidos de asparagina. Es posible también silenciar un gen de la hexosa quinasa y aumentar los niveles de ácido aspártico, mientras que reduce los niveles de asparagina. Una correlación entre la sobreexpresión de genes, ya sea de nitrato reductasa y hexoquinasa con los niveles de asparagina aumentados se han descrito previamente (Roland y otros, Annu Rev Plant Biol 57: 675-709, 2006; Szopa, Biochem Soc Trans 30: 405-410, 2002). Sin embargo, los autores no anticiparon el enfoque opuesto para reducir eventualmente los niveles de acrilamida en los alimentos.

Obviamente, existen otras estrategias para modificar los niveles de asparagina en las plantas mediante la alteración de la expresión de genes que están directa o indirectamente involucrados en la síntesis o el metabolismo de la asparagina. Nuestros resultados implican que cualquiera de estos métodos se pueden usar para producir alimentos con bajo contenido de acrilamida.

EJEMPLO 4

Expresión simultánea regulada negativamente de genes de degradación del almidón y biosíntesis de asparagina

Este ejemplo demuestra que la expresión regulada negativamente de los genes implicados en la degradación del almidón y la biosíntesis de asparagina, respectivamente, en tejidos ricos en almidón de un cultivo puede reducir la acumulación de acrilamida en un alimento obtenido a partir del calentamiento de estos tejidos ricos en almidón.

Las plantas transgénicas que producen tubérculos con bajos niveles de azúcares reductores y asparagina se generaron en dos etapas. En primer lugar, las plantas se transformaron con ADN-P del vector binario pSIM371. Este ADN-P contiene dos copias de un polinucleótido que comprende fragmentos del gen de PPO (sec. con núm. de ident.: 18), R1 (sec. con núm. de ident.: 19), y pH (sec. con núm. de ident.: 20) insertados como repetición invertida entre el promotor de Gbss y terminador Ubi3.

Una cepa de Agrobacterium que porta tanto pSIM371 como el vector pSIM368 LifeSupport, que contiene casetes de

expresión tanto para los genes nptII como codA insertados entre los bordes de ADN-T, se usó para infectar los 21,900 explantos de tallo de papa. Después de un período de co-cultivo de dos días, los explantos infectados se sometieron durante cinco días a la kanamicina para seleccionar la expresión transitoria del gen nptII. Para prevenir la proliferación de células que contienen de manera estable ADN-T integrado, los explantos se transfirieron posteriormente a medios que contienen 5-fluorocitosina (5FC). Este producto químico se convierte en 5-fluorouracilo (5FU) tóxico mediante el producto del gen codA (Perera y otros, 1993). Un total de 3,822 brotes que sobrevivieron a la selección doble se genotiparon para la presencia de la ADN-P y la ausencia de cualquier ADN foráneo, ya sea de ADN-T o cadena principal del plásmido. Este análisis identificó 256 brotes con ADN todos nativos (intragénico) que se les permitió enraizar, plantar en el suelo, y crecer durante seis semanas en cámaras de crecimiento. Para el tamizaje de la actividad de PPO, una solución de catecol se pipeteó sobre las superficies de corte de mini-tubérculos cosechados de ~2-cM. Cuarenta y ocho líneas que se inhibieron al oscurecimiento del tubérculo inducido con catecol se crecieron en invernaderos durante tres meses para producir tubérculos semi-maduros que se evaluaron bioquímicamente para los niveles residuales de actividad de PPO. Este análisis demostró que el empleo del constructo de silenciamiento del gen de PPO disminuyó la actividad de PPO por aproximadamente 90%. Tanto las 48 líneas intragénicas como las plantas de control no transformadas Ranger Russet y Russet Burbank se propagaron posteriormente y crecieron en el campo en Idaho, Aberdeen.

Se analizaron los tubérculos maduros de todas las líneas intragénicas y control para los niveles de glucosa después de tres y seis meses de almacenamiento en frío. La mayoría de las líneas (43) mostraron una mayor reducción en el endulzamiento inducido por el frío (~ 60%) que el obtenido con líneas de control que habían sido silenciadas sólo por uno de los genes asociados al almidón. Las papas fritas a la francesa derivadas de los tubérculos silenciados de las plantas 371-28 y 371-38 contuvieron menos de un tercio de la neurotoxina acrilamida que se acumuló en las papas fritas de control (Tabla 4). Una reducción de acrilamida de ese tipo se anticipó porque la acrilamida se deriva en gran medida de las reacciones inducidas por el calor entre el grupo carbonilo de los azúcares reductores y asparagina (Mottram y otros, 2002; Stadler y otros, 2002).

Las características sensoriales de las papas fritas a la francesa modificadas se evaluaron por un panel de ocho personas capacitadas profesionalmente. Las papas fritas a la francesa derivadas de tubérculos de Ranger Russet modificado muestran un mejor aspecto visual que las papas de cualquiera de Ranger Russet o Russet Burbank. Además, las papas fritas intragénicas mostraron un aroma total significativamente mejor que se detectó por el epitelio olfatorio que se encuentra en el techo de la cavidad nasal. Se observó una tendencia similar para los tubérculos que se habían almacenado durante diez semanas a 4°C. De hecho, las líneas intragénicas almacenadas en frío 371-28, 30, 38, y 68 todavía cumplieron o excedieron los atributos sensoriales de variedades no transformadas frescas.

Una de las líneas de papa de bajo contenido de azúcar se retransformó con pSIM1148. En comparación con las papas fritas a la francesa de las plantas originales pS1M1148, las papas fritas de transformantes dobles resistentes a la kanamicina generalmente mostrarán niveles más reducidos de acrilamida. Así, los transformantes dobles producen tubérculos que se pueden usar para obtener papas fritas que (i) contienen niveles reducidos de acrilamida y (ii) muestran características sensoriales reducidas mejoradas.

EJEMPLO 5

Métodos de transformación de ADN todo nativo para reducir tanto los niveles de asparagina como el endulzamiento inducido por el frío en tubérculos de papa.

En este ejemplo se describe el empleo de los métodos de transformación de ADN todo nativo para reducir tanto los niveles de asparagina como el endulzamiento inducido por el frío en tubérculos de papa. Los alimentos procesados obtenidos de estos tubérculos contendrán niveles reducidos de acrilamida.

El ADN de transferencia usado para la transformación contiene dos casetes de expresión insertados entre las regiones borde derivadas de papa, que se muestra en la sec. con núm. de ident.; 23 (Figura 2). El primer casete comprende dos copias de un segmento de ADN que comprende fragmentos de promotor del gen de Ppo (sec. con núm. de ident.: 24), PhL (sec. con núm. de ident.: 25), y R1. (sec. con núm. de ident.: 26), insertado como repetición invertida entre un promotor funcionalmente activo del gen de Agp y el terminador del gen de la ubiquitina-3. El segundo casete comprende dos copias de un segmento de ADN que comprenden fragmentos de los genes de Ast1, Ast2, y Ppo (sec. con núm. de ident.: 27) insertados como repetición invertida entre dos promotores funcionalmente activos y orientados de forma convergente del gen de Gbss.

Un plásmido que contiene tanto el ADN de transferencia como un casete de expresión para el gen isopentenil transferasa (ipt) de Agrobacterium se introduce en Agrobacterium LBA4404, y la cepa resultante se usa para transformar variedades de papa, tales como Ranger Russet y Atlantic mediante el empleo de métodos de transformación libre de marcador (ver; Craig Richael, "Generation of marker-free and backbone-free transgenic plants using a single binary approach, Solicitud de Patente Provisional 60/765,177, que se incorpora en la presente como

referencia). Las plantas transformadas que no muestran un fenotipo de citocina, que se caracterizan por retraso en el crecimiento e incapacidad para enraizar, se les permite producir tubérculos. Los tubérculos de algunas de las líneas mostrarán bajos niveles de actividad de la enzima PPO, que se pueden probar pipeteando 0.5 mL de 50 mM de catecol sobre las superficies de tubérculos recién cortados. Los niveles de actividad de la enzima Ppo se pueden determinar con mayor precisión mezclando tubérculos pulverizados (1 gramo) durante 1 hora en tampón 50 mM de ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico a pH 6.5 (5 mL). Después de la precipitación de la fracción sólida, el cambio de OD410 se puede determinar con el tiempo. Las líneas de tubérculos que contienen menos de 25% de actividades de la enzima Ppo se ensayarán además incubando los tubérculos en aproximadamente 4 °C. Después de al menos un mes, los niveles de glucosa se pueden determinar por, por ejemplo, usando el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (Megazyme, Treland). Las líneas de tubérculos que muestran tanto > 75% de niveles reducidos de actividad de ppo como > 50% de endulzamiento reducido inducido por el frío se pueden analizar para los niveles de asparagina libres. Si los niveles de asparagina libre se reducen por aproximadamente >50%, los tubérculos se pueden procesar y analizar para los niveles de acrilamida. Las líneas transformadas que contienen niveles bajos de asparagina, además de la Ppo baja y endulzamiento inducido por el frío bajo, se pueden considerar para la producción a granel y comercial. Las papas fritas a la francesa derivadas de tubérculos de las líneas preferidas contienen menos azúcares reductores, posibilitando así reducir el tiempo de escaldar y preservar el sabor original de la papa. Además, su atractivo visual se mejora por la ausencia de extremos de azúcar y magulladura de punto negro Las papas fritas a la francesa también tienen un mejor aroma y acumulan niveles reducidos de acrilamida, como se puede determinar por, paneles sensoriales entrenados para evaluar las papas fritas para las características sensoriales.

EJEMPLO 6

Tilling

Los genes implicados en la biosíntesis de asparagina, tal como asparagina sintetasa, también se pueden regular negativamente en su expresión mediante la mutación de ellos. Un método para llevar a cabo este objetivo se designa como "Lesiones Locales Inducidas por el Objetivo en los Genomas' (TILLING). Este método combina la eficiencia de la mutagénesis inducida con etil metanosulfonato (EMS) con la capacidad de la cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC) para detectar cambios de pares de bases por análisis de heterodúplex. El método genera una amplia variedad de alelos mutantes, es rápido y automatizable, y es aplicable a cualquier organismo que se puede mutagenizar químicamente. En el método básico TILLING, las semillas se mutagenizan mediante el tratamiento con EMS. Las plantas M1 resultantes se auto-fertilizan, y la generación M2 de los individuos se usa para preparar muestras de ADN para el tamizaje de mutaciones, mientras que sus semillas son inventariadas. Las muestras de ADN se mezclan, y las mezclas se colocan en placas de microtitulación y someten a PCR de genes específico (McCallum y otros, Nat Biotechnol 18:455-457).

Existen varias alternativas para TILLING. Por ejemplo, es posible emplear diferentes tipos de mutágeno tales como neutrones rápidos o diepoxibutano (DEB). Todos estos métodos se pueden enlazar a plataformas genéticas inversas que permiten el tamizaje y aislamiento de mutantes de genes preseleccionados. Los métodos se han descrito en detalle en, por ejemplo Wang y otros, Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Volume I, 2006, Global Science Brooks.

Además, es posible tamizar simplemente germoplasma disponible de un fenotipo de bajo contenido de asparagina. Así, el fitomejoramiento molecular, mejoramiento por mutación y selección de la línea todos proporcionan métodos que hacen posible obtener variedades de 'bajo contenido de asparagina'.

EJEMPLO 7

Niveles reductores de asparagina

Los niveles de asparagina también se pueden reducir mediante la modificación de las prácticas de cultivo. Por ejemplo, el gen de asparagina sintetasa se suprime por carbono (Koch KE. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:5 09-540, 1996). Es posible también reducir la acumulación de asparagina mediante la reducción de la relación nitrógeno/azufre en el suelo. Los niveles relativamente bajos de nitrógeno resultaran en concentraciones reducidas de compuestos ricos en N y un aumento en los metabolitos que contienen S tales como cisteína, glutatión, y S-adenosilmetionina. Así, los suelos que contienen relativamente alto contenido de C, alto contenido de S y bajo contenido de N se pueden usar para producir alimentos con relativamente bajo contenido de asparagina.

TABLAS

Tabla 1 Niveles de asparagina en tubérculos de líneas de papa de tres meses de edad cultivadas en invernaderos.

Línea	Nivel de asparagina (mg/100 g)
Ranger Russet - 1 no transformada	150
Ranger Russet - 2 no transformada	130
Ranger Russet - 3 no transformada	100
Russet Burbank - 1 no transformada	230
Russet Burbank - 2 no transformada	210
Control transgénico resistente a la kanamicina -1	200
Control transgénico resistente a la kanamicina -2	220
Control transgénico resistente a la kanamicina -3	110
Control transgénico resistente a la kanamicina -4	200
Control transgénico resistente a la kanamicina -5	130
Línea transgénica 1148-1	160
Línea transgénica 1148-3	90
Línea transgénica 1148-4	70
Línea transgénica 1148-5	150
Línea transgénica 1148-6	80
Línea transgénica 1148-7	70
Línea transgénica 1148-8	80
Línea transgénica 1148-10	110
Línea transgénica 1148-11	160
Línea transgénica 1148-13	80
Línea transgénica 1148-14	210
Línea transgénica 1148-15	110
Línea transgénica 1148-17	50
Línea transgénica 1148-18	90
Línea transgénica 1148-19	80
Línea transgénica 1148-21	60
Línea transgénica 1148-22	170
Línea transgénica 1148-23	80
Línea transgénica 1148-24	80
Línea transgénica 1148-25	90
Línea transgénica 1148-26	80
Línea transgénica 1148-28	310

Tabla 2 Niveles de acrilamida en las papas fritas a la francesa obtenidos a partir de tubérculos de líneas de papa de tres meses de edad cultivadas en invernaderos. Los niveles se determinaron de acuerdo a la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada Oficina de Planta & Dairy Foods and Beverages, "Detection and Quantitation of Acrylamide in Foods" (2002).

Línea	Nivel de acrilamida (partes por billón)
Ranger Russet no transformada -2	126
Control transgénico resistente a la kanamicina -1	127
Línea transgénica 1148-7	46.6
Línea transgénica 1148-17	< 20.0
Línea transgénica 1148-19	< 20.0
Línea transgénica 1148-21	38.6
Línea transgénica 1148-24	23.1

Tabla 3. Niveles de expresión del gen Asparaginasa-1 en tubérculos de papa de líneas de papa de seis semanas de edad que crecieron en cámara de cultivo como se determinó mediante el RT-PCR en tiempo real cuantitativa.

Línea	Expresión relativa	Error Estándar
Control transgénico resistente a la kanamicina -1	22.4	8.8
Control transgénico resistente a la kanamicina -2	8.9	4.2
Control transgénico resistente a la kanamicina -3	23.7	4.2
Control transgénico resistente a la kanamicina -4	27.5	3.4
Ranger Russet no transformada - 1	22.4	8.8
Línea transgénica 658-1	101.6	13.4
Línea transgénica 658-2	58.8	8.1
Línea transgénica 658-3	912.9	57
Línea transgénica 658-4	165.9	52.1
Línea transgénica 658-5	75.8	6.3
Línea transgénica 658-7	101.2	10.7
Línea transgénica 658-8	289.3	59.6
Línea transgénica 658-9	99.0	9.8
Línea transgénica 658-11	92.1	8.2
Línea transgénica 658-12	85.9	29.2
Línea transgénica 658-14	390.2	5.0
Línea transgénica 658-15	57.9	8.0
Línea transgénica 658-16	8.4	1.7
Línea transgénica 658-17	64.7	4.2
Línea transgénica 658-18	112.1	21.8
Línea transgénica 658-19	196.7	46.6
Línea transgénica 658-20	101.9	31.2
Línea transgénica 658-21	58.3	3.7

Línea transgénica 658-22	81.4	20.5
Línea transgénica 658-23	85.7	17.8
Línea transgénica 658-24	281.0	63.7
Línea transgénica 658-25	229.0	67.1
Línea transgénica 658-26	110.7	16.2
Línea transgénica 658-27	220.3	66.9
Línea transgénica 658-28	151.1	17.5

Tabla 4. Niveles de acrilamida en las papas fritas a la francesa obtenidos a partir de tubérculos de líneas de papa de tres meses de edad cultivadas en invernaderos.

Línea	Nivel de acrilamida (partes por billón)
Ranger Russet no transformada -1	1150
Ranger Russet no transformada - 2	1200
Russet Burbank no transformada - 1	958
Russet Burbank no transformada -2	1230
Línea Intragénica 371-28-1	211
Línea Intragénica 371-28-2	281
Línea Intragénica 371-38-1	152
Línea Intragénica 371-38-2	184

Modalidades adicionales de la invención

La invención también proporciona lo siguiente

1. Un producto procesado con calor que se obtiene de los tejidos de una planta transgénica que comprende un primer polinucleótido que comprende la secuencia completa o parcial de un gen que se implica en la biosíntesis de asparagina o el metabolismo de asparagina, en donde el producto tiene una concentración inferior de acrilamida que un producto procesado con calor que se elabora a partir de los tejidos correspondientes de una planta de lo contrario idéntica no transgénica.
2. El producto procesado con calor del punto 1, en donde las células de la planta transgénica comprenden además un segundo polinucleótido que comprende al menos uno de (i) unas secuencias sentido y/o antisentido que corresponden a un gen o fragmento de gen R1 y (ii) unas secuencias sentido y/o antisentido que corresponden a un gen o fragmento de gen de fosforilasa L.

SECUENCIAS

sec. con núm. de ident.: 1 (asparagina sintetasa 1)

5 ATGTGTGGAATTTTGGCTTTGTTGGGTTGTTCCGATGATTCTCAGGCTAAAAGGGTTCGAGTTCTTGAG
 CTTTCTCGCAGGTTGAAGCATCGTGGACCGGATTGGAGTGGAAATATTTCAATATGGTGATTTTTACTTG
 GCACATCAACGTCTAGCAATTATCGACCCTGCTTCTGGTGATCAACCTCTGTTTAATGAAGACAAAAAG
 10 ATTGTTGTTACTGTTAATGGAGAGATCTACAATCATGAAAACTTCGAAAACCTTATGCCTAATCACAAG
 TTTAGGACTGGAAGTGATTGTGATGTTATTGCTCATCTTTATGAAGAATATGGAGAAAATTTTGTGAC
 ATGCTGGATGGAGTGTTCTCTTTTGTATTATTGGATACTCGCGATAATAGCTTTCTTGCTGCTCGTGAT
 15 GCCATCGGAATTACACCCCTCTATATTGGTTGGGGACTTGATGGCTCTGTGTGGATATCATCTGAGCTG
 AAGGGCTTGAATGATGATTGTGAACATTTTGAAGTTTTCCCTCCGGGGCACTTGTA CTCTAGCAAGAAC
 GGAGGGCTTAGGAGATGGTACAATCCCGCTTGGTTCTCTGAAGCAATTCCTTCCACTCCTTATGACACT
 20 TTGGTTCTGAGGCGTGCTTCGAAAATGCTGTTATCAAACGGTTGATGACTGATGTCCCCTTTGGCGTT
 CTGCTCTCGGGGGGACTTGATTGCTCTTTGGTTGCTTCTGTCACTGACTCGATACTTGGCTGGAACAAA
 AGCTGCAAGCAATGGGGAGCACAACTTCATTCTCTGTGTTGGTCTCGAGGGCTCACCAGATCTCAAG
 GCTGCAAAAGAAGTTGCTGACTTTT TAGGAACCGTTACCATGAGTTTCACTTTACTGTTT CAGGACGGT
 25 ATTGATGCTATTGAAGATGTTATATATCATATCGAGACGTATGATGTAACAACAATAAGAGCCAGCACT
 CCTATGTTCCCTTATGTCGCGTAAGATTAAATCACTAGGAGTGAAGATGGTCATATCAGGGGAAGGCGCT
 GACGAAATTTTGGTGTTACTTGTACTTCCACAAGGCTCCCAACAAGGAAGAGTTCCACACGGAAACA
 30 TGTGCAAGATAAAAGCGCTTCACCAGTATGACTGTTTAAAGAGCAAACAAGGCTACATCCGCGTGGGGC
 TTAGAAGCTAGAGTACCATTTCTGGATAAAGAGTTCATCGATGTTGCCATGAGTATCGATCCCGAATGG
 AAGATGATTAAGCATGATCAAGGAAGGATTGAGAAGTGGGTTCTTAGGAAGGCGTTTGATGATGAGGAG
 35 CAACCGTACCTTCAAAGCATATTCTGTACAGACAGAAAGAACAATTCAGCGATGGCGTAGGCTATAGT
 TGGATCGATGGCCTCAAAGCACATGCTGAACAACATGTGACTGATAGGATGATGCTTAATGCTGCTCAT
 ATCTTCCACATAACACTCCGACTACAAAGGAAGGATACTATTACAGAATGATTTTCGAGAGGTTCTTC
 40 CCACAGAACTCAGCAAGCCTGACCGTTCTGGAGGACCGAGTATAGCTTG CAGCACGGCAAAGCAATT
 GAGTGGGATGCTTCTTGGTCGAACAACCTTGATCCTTCCGGTAGGGCTGCTATCGGTGTACATAACTCT
 GCTTATGACAATCATCTATCTAGTGTGCTAATGGGAATTTGGACACCCCGATCATCAATAATGTGCCA
 45 AAGATGGTAGGCGTGGGCGTGGCTGCAGAGCTCACAATAAGGAGCTAA

Sec. con núm. de ident.: 2 (asparagina sintetasa 2)

CACTTTTCTCCATTTTCAGAAGAAGCGAGAAAAAAGTTGCGAGCAATGTGTGGAATACTTGCAATTTTCG
 GTTGCACTGATAATTCTCATGCCAAGCGTTCAAGAATCATCGAACTATCAAGAAGGTTGCGCCATAGAG
 GACCTGATTGGAGTGGATTGCATAGCCATGAGGACTGTTATCTTGCTCATCAACGATTGGCAATAGTAG
 ACCCAACTTCAGGAGATCAGCCGCTGTATAATGAGGACAAGACCATTGTTGTTGCGGTAAATGGAGAGA
 TCTACAACCATAAGGAATTACGGGAGAACTGAAGTCTCATCAGTTTCGAACTGAAAGTGATTGTGAAG
 TTATTGCCCATCTTTATGAAGAATATGGAGAAAACCTTCATTGACATGTTGGATGGGATGTTCTCTTTTG
 TTCTTCTTGATACCCGGGATAAAAGTTTCATCGCTGCTCGGGATGCCATTGGCATTACACCCCTTTATA
 TGGGGTGGGGTCTTGATGGCTCCATATGGTTTTCTCAGAGATGAAAGCCTTAAGTGATGATTGTGAAC
 GATTTGTTAGCTTCCTTCCCGGTATATTTATTCAAGCAAAAATGGAGGACTTAGAAGATGGTACAACC
 CACCATGGTTTTTCGAAACCATTCCTTCTACACCATATGATCCCCTTGCTTACGGAAGGCTTTTGAGA
 AGGCTGTAGTTAAGAGACTCATGACGGATGTACCATTTGGTGTGCTTCTCTCAGGCGGACTGGATTCTT
 CACTTGTGCTGCAGTGGCTAACCCTTATTTGGCTGATACAGAAGCCGGTCGACAATGGGGATCACAGT
 TGCATACATTTTGCCTAGGCTTGAAGGGTTCTCTGATCTGAAAGCTGCCAGAGAGGT

Sec. con núm. de ident.: 3 (fragmento de Ast1)

TCACAAGTTTAGGACTGGAAGTGATTGTGATGTTATTGCTCATCTTATGAAGAATATGGAGAAAATTT
 TGTGACATGCTGGATGGAGTGTCTCTTTTGTATTATTGGATACTCGCGATAATAGCTTTCTTGCTGC
 TCGTGATGCCATCGGAATTACACCCCTCTATATTGGTTGGGGACTTGATGGCTCTGTGTGGATATCATC
 TGAGCTGAAGGGCTTGAATGATGATTGTGAACATTTTGAAGTTTTCCCTCCGGGGCACTTGTACTCTAG
 CAAGAACGGAGGGCTTAGGAGATGGTACAATCCCGCTTGGTTCTCTGAAGCAATTCCTTCCACTCCTTA
 TGA

Sec. con núm. de ident.: 4 (fragmento de Ast2)

TCATCAGTTTCGAACTGAAAGTGATTGTGAAGTTATTGCCCATCTTTATGAAGAATATGGAGAAAACCTT
 CATGACATGTTGGATGGGATGTTCTCTTTGTCTCTTGATACCCGGGATAAAAGTTTCATCGCTGC
 TCGGGATGCCATTGGCATTACACCCCTTTATATGGGGTGGGGTCTTGATGGCTCCATATGGTTTTCTC
 AGAGATGAAAGCCTTAAGTGATGATTGTGAACGATTGTTAGCTTCCTTCCCGGTATATTTATTCAAG
 CAAAAATGGAGGACTTAGAAGATGGTACAACCCACCATGGTTTTTCGGAACCATTCCTTCTACACCATA
 TGA

Sec. con núm. ident.: 5

5 TCATATGGTGTAGAAGGAATGGTTTCCGAAAACCATGGTGGGTGTACCATCTTCTAAGTCCTCCATTT
 TTGCTTGAATAAATATGACCGGGAAGGAAGCTAACAAATCGTTCACAATCATCACTTAAGGCTTTCATC
 TCTGAGGAAAACCATATGGAGCCATCAAGACCCACCCCATATAAAGGGGTGTAATGCCAATGGCATCC
 CGAGCAGCGATGAAACTTTTATCCCGGTATCAAGAAGAACAAAAGAGAACATCCCATCCAACATGTCA
 10 ATGAAGTTTTCTCCATATTCTTCATAAAGATGGGCAATAACTTCACAATCACTTTCAGTTCGAAACTGA
 TGAGAAITCGAACTCTTTATCCAGAAATGGTACTCTAGCTTCTAAGCCCCACGCGGATGTAGCCTTGTT
 TGCTCTTAAACAGTCATACTGGTGAAGCGCTTTTATCTTGCGACATGTTTCCGTGTGGAACCTTTCCTT
 GTTTGGAGCCTTGTTGGAAGTACAAGTAGCCACCAAAAATTTTCGTACGACCTTCCCCTGATATGACCAT
 15 CTTCACTCCTAGTGATTTAATCTTACGTGACATAAGGAACATAGGAGTGCTGGCTCTTATTGTTGTTAC
 ATCATACGTCTCGATATGATATATAACATCTTCAATAGCATCAATCCCGTCTGAACAGTAAAGTGAAA
 CTCGTGGTGAACGGTTCTTAAAAAGTCAGCAACTTCTTTTGCAGCCTTGAGATCTGGTGAGCCCTCGAG
 20 A

Sec. con núm. ident.: 6

25 CTGCAGGTGTATGGGTGATCCTTCTCTTATTATACCGACTAAAGACATTGGTATTAAGGATATCTTATC
 TTTTGAGGAGATTCCCGTTCAGATTCTGGAGCGTCAGGTTGCAAGTTGAGAACCAATGAGGTAACATC
 30 AGTCAAGGTCTTATGGAGGAATCAGCCGCGG

Sec. con núm. de ident.: 7 (P:Agp)

CAAGTGTCTGAGACAACCAAACTGAAAGTGGGAAACCAAACTCTAAGTCAAAGACTTTATATACAAAA
 5 TGGTATAAATATAATTATTTAATTTACTATCGGGTTATCGATTAAACCCGTTAAGAAAAAAGTTCAAACC
 GTTAAGAACCGATAACCCGATAACAAAAAAATCTAAATCGTTATCAAAACCGCTAAACTAATAACCCA
 ATATTGATAAACCAATAACTTTTTTTTATTCGGGTTATCGGTTTCAGTTCTGTTTGGAAACAATCCTAGTG
 10 TCCTAATTTATTGTTTTGAGAACCAAGAAAAACAAAACTTACGTGCAAAATATTTTCAGTAAATACTTGTA
 TATCTCAGTGATAATTGATTTCCAACATGTATAATTATCATTACGTAATAATAGATGGTTTCCGAAAC
 TTACGCTTCCCTTTTTTCTTTTGCACTCGTATGGAATAAAAGTTGGATATGGAGGCATTCCCGGGCCTT
 CAGGTGGAAGAGACGGAGCTGCTTCACAAGGAGGGGGTGTGTGACTTGAAAATGGGCATTATTGTTTC
 15 GCAAACCTATCATGTTCTATGTTGTTTTATTTGTAGTTTGGTGTCTTAATATCGAGTGTCTTTAGT
 TTGTTCTCTTTAATGAAAGGATAATATCTGTGCAAAATAAGTAAATTCGGTACATAAAGACATTTTTT
 TTTGCATTTTCTGTTTATGGAGTTGTCAAATGTGAATTTATTTTCATAGCATGTGAGTTTCTCTCCTTT
 TTCATGTGCCCTTGGGCCTTGCACTGTTCTTGACCGCAGTGTGCCAGGGCTGTCCGCAGATGGACATA
 20 AATGGCACACCGCTCGGCTCGTGAAAGAGTATGGTCAGTTTCATTGATAAGTATTTACTCGTATTTCGG
 TGTTTACATCAAGTTAATATGTTCAAACACATGTGATATCATACATCCATTAGTTAAGTATAAATGCCA
 ACTTTTTACTTGAATCGCCGAATAAATTTACTTACGTCCAATATTTAGTTTTGTGTGTCAAACATATCA
 25 TGCCTATTGATTAAAGATAAATAAAGATGTGTAATTTGAAAAACCAATTAGAAAAGAAGTATGACGG
 GATTGATGTTCTGTGAAATCACTGGTAAATGGACGGACGATGAAATTTGATCGTCCATTAAAGCATAG
 CAACATGGGTCTTTAGTCATCATCATTATGTTATAATTATTTCTTGAAACTTGATACACCAACTTTCA
 TTGGGAAAGTGACAGCATAGTATAAACTATAATATCAATTCGGCAATTTGCAATTAATCCAAATCTCT
 30 TTTGTCAATTCATTTCTCTCCCTATGTCTGCAAGTACCAATTATTTAAGTACAAAAATCTTGATTAAA
 CAATTTATTTCTCACTAATAATCACATTTAATCATCAACGGTTCATACACGTCTGTCACTCTTTTTTT
 ATTCTCTCAAGCGCATGTGATCATACCAATTATTTAAATACAAAAATCTTGATTAAACAATTCAGTTT
 35 CTCCTAATAATCACATTTAATCATCAACGGTTCATACACATCCGTCACTCTTTTTTTTATTCTCTCAAG
 CGCATGTGATCATACCAATTATTTAAATACAAAAATCTTGATTAAACAATTCATTTTCTCACTAATAA
 TCACATTTAATCATCAACGGTTTATACACGTCCGCCACTCTTTTTTTTATTCTCTCAAGCGTATGTGATC
 ATATCTAACTCTCGTGCAACAAGTGAATGACGTTCACTAATAAATAATCTTTTGAATACTTTGTTC
 40 GTTTAATTTATTTAATTTGATAAGAATTTTTTTATTATTTGAATTTTTATTGTTTTAAATTAATAAAG
 TTAAATATATCAAAATATCTTTTAAATTTATTTTGAATAATAACGTAGTTCAAACAAATTAATAATTGA
 GTAACGTGTTTTTCGAAAAATAATGATTCTAATAGTATATTCTTTTTCATCATTAGATATTTTTTTTAAAG
 45 CTAAGTACAAAAGTCATATTTCAATCCCCAAATAGCCTCAATCACAAGAAATGCTTAAATCCCCAAAA
 TACCCTCAATCACAAGACGTGTGTACCAATCATACCTATGGTCCCTCTCGTAAATTCGACAAAAATCAGG
 TCTATAAAGTTACCTTGATATCAGTATTATAAACTAAAAATCTCAGCTGTAATTCAGTGCAATCAC
 ACTCTACCACACACTCTCTAGTAGAGAGATCAGTTGATAACAAGCTTGTTAACG

sec. con núm. de ident.: 8 (P:Gbss)

5 CGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAATGCAACAAAATTCTAGTGGAGGGACCAGTACCAGTA
 CATTAGATATTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAAGTGGT
 AGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAAACCGGAGGGGGCCATTGCAAGG
 CCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGGCCATAATACTGTGCGATGAGCATTTCCTTA
 10 TAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGTCACTG
 AAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATTTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAACAAGTG
 GTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTATGAATC
 15 GTGTTATGGTGATAAACGTTGTTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTCTTGCCCTACT
 GAATTTGACCCCTACTGTAATCGGTGATAAATGTAATGCTTCTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATC
 AATTTCTGTTTTGTTTTGTTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCTTTTTGTAGACCACACATCACG

20 sec. con núm. de ident.: 9 (asparaginasa-1)

25 ATGGGTTGGGCTATAGCGTTGCACGGTGGAGCTGGTGACATACCCAAGGATCTGCCGCCGGAGCTTCGT
 GAGCCCAGAGAAGCCTCTCTTCGCTATTGCTTACAGATTGGCGTCGATGCTATCAAGGCCCAAAAATCC
 CCTTTGGACGTTGTTGAACTCGTGGTATACTACTTACCAACTTTACCTATCATATCTTAAAGTATAGAA
 30 TGTAGGATTTTGCTTGCATCTGTTCAATTTCTCATCAAGACTCGCGATGGATATCACTTGTTACCATG
 ATTAGAGGAAAAATATGGGTTTGACTCATTTTCTCTCTCTCTCGTCAGGTTGTTTGGGGAGGGATCT
 TTGTTTACTTGTTTTTCTATTAGTACTATGTTAGGATGACTAGTGTGTTGATTCTTATGATGAATAGCTT
 TTTATCTATGGCTTATGAAATAATTGACTTACTGGATGTCTAGTAATTTTCATGGATCTACATGACATCA
 35 ACTATAAAGCTTCTGCAAGTTGGAGTTCCTGATTTAAAGCTTCAAAAAGATTATAGAAACATGATCTC
 TCTATTTGATCCTCTGAGATTGAGTTGGAGTTTTCACCTCAATATTCAATAACATTCTCTTGATGATGC
 TCCCTAAGTTGTCACCTCTCGCTAGCATGCAGGATGATACTATTGTTAATTTTGTAAACCGTGCTCTTG
 CTCCCTGCTTTAGTTTTTCTTACAAACACATACTTCCACTACTTCAATTCGTGCAAGGGAAAGTGTCTAT
 40 TCCATATATGTGCGTAGAAACGCTCCTGAAAACTTGGGTTCTCCGGGAGCCTCCGTATAATGAGTTT
 TTTTTATTTTACCTTTTACTGATATTGTGATAGCTTTTAACTGTCTTGATCAAGCAGGTGCGGGAAC
 TAGAAAATAACCCATACTTCAATGCTGGTAGAGGGTCTGTCTTAACCAGCAATGGCACAGTAGAAATGG
 AAGCATGCATCATGGATGGGAATACGAAAACTGTGGAGCTGTTCTGGCCTAACCCTGTTGTCAATG
 45 CTATATCTCTGGCTAGGCTGGTTCATGGAAAAACTCCACATATATATCTTGCAATTTGAGGGAGCGGAAG
 CATTTGCGAGGGAGCAGGTCGTAAAAATTTCTAATTGTCTTCTCTTATGGACATGCCTGAAGAAA
 ACGTTAAGAAAGTTATTGAAGTACTCAATGCTGATGAATGATATCTTGATCCGGAACTGGATGATGC
 AAAGACTTGACGGATTATTCTCTCTGTAAATACTGTTTAATTACAGTTCTAATTTCTGATGGTCTGTTT
 50 ATGGACTTCAAGCAGCTACCAGTTTCTCTAAGTTTTCTGGTTAATTAATGTGACCTTTCTGGCATAGG
 TGACTAATTCATTTTAACTTACTATTAGTTAACTTCTCTGATAATATAACTCCCTAGTTGTATGATT
 GTATTATGTTCATTTTTCTAATCCTTTTTTACATAGAATCTATTTGATGAACATGATGGTTCTGTTGT
 55 CAAGGGGGTTGAAACACGGACTCAAGCCATTTTATCACGCCAAGAAATATCGAGAGACTAAAACAAGC
 AAAAGAAGCAAAACAAAGTCCAGGTATATAACCTTATCTCTTCATTGTTATATCTTTGTTGCAAGATAGC
 ATATTCAATGCTTTTGGCCTTGATATTGATAGAAAGTCCACTGTTTTCTTATTGTACTTGTTTTTATCTGA

60

CCTTTTGATTGTGAATTTTAAGAGCTTTGGTGTPTTGTPTTTTGGAAAGCATCAACAAAAATATTATCCA
 TTTGTACTTGGGTCTTCCCTCTGTGGCCTTCAAGTGAGTTTGGTTATGGCGTCGGCCTCAATAGCTTAA
 ATGTAGTCATGTGGCTATGTCTGTAAACAGAGCTTTTAGTTCTATTCCCTTCTTGGCAACTCAGTCTCG
 TGATTCAAGGCTCAATTCTTCTGTAAATCTTAACATCGAGATGCTTTCTGCTTTGGTATTTTGGTTAA
 CATGTCTGCTACCAATTTGCAGGTTGATTATAATACACGGCCTATACCAAAGATGACAAAACACCAGC
 TCCAAGTGGAGATAGTCAGCTTGGAAACGGTTGGATGTGTAGCTGTTGACAGCTTTGGACATTTAGCTGC
 TGCTACATCTACTGGAGGACTAGTAAACAAGATGGTTGGAAGGATAGGAGATACTCCCATTATTGGTGC
 AGGTACATATGCAAACAACTATGTGCAGTCTCTGCTACAGGCCAAGGTGAAGCTATAATCCGTGCGAC
 TGTAGCAAGAGATGTGGCTGCTCTAATGGAGTATAAAGGGCTTTCTCTCAAGGAAGCAGCAGACTACGT
 TATAGAGGAATCTGCGCCAAAGGAACCACTGGCCTGATTGCTGTATCGGCCACTGGGGAAGTTAGCAT
 GCCATTTAATACAACCGGAATGTTTAGAGCTTGTGCAACTGAAGATGGTCACACAGAATTAGCAATTTG
 GTAACCTTTTCATTAGAATAGATTAG

sec. con núm. de ident.: 10 (ADNc de asparaginasa-1)

ATGGGTTGGGCTATAGCGTTGCACGGTGGAGCTGGTGACATACCCAAGGATCTGCCGCCGGAGCTTCGT
 GAGCCCAGAGAAGCCTCTCTTCGCTATTGCTTACAGATTGGCGTCGATGCTATCAAGGCCCAAAAATCC
 CCTTTGGACGTTGTTGAACTCGTGGTGGGGAAGTAGAAAATAACCCATACTTCAATGCTGGTAGAGGG
 TCTGTCTTAACAGCAATGGCACAGTAGAAATGGAAGCATGCATCATGGATGGGAATACGAAAAACTGT
 GGAGCTGTTTTCTGGCCTAACCCTGTTGTCAATGCTATATCTCTGGCTAGGCTGGTCATGGAAAAACT
 CCACATATATATCTTGCATTTGAGGGAGCGGAAGCATTTGCGAGGGAGCAGGGGGTTGAAACCACGGAC
 TCAAGCCATTTTATCACGCCAAGAAATATCGAGAGACTAAAAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGTCCAG
 GTTGATTATAATACACGGCCTATACCAAAGATGACAAAACACCAGCTCCAAGTGGAGATAGTCAGCTT
 GGAACGGTTGGATGTGTAGCTGTTGACAGCTTTGGACATTTAGCTGCTGCTACATCTACTGGAGGACTA
 GTAAACAAGATGGTTGGAAGGATAGGAGATACTCCCATTATTGGTGCAGGTACATATGCAAACAACTA
 TGTGCAGTCTCTGCTACAGGCCAAGGTGAAGCTATAATCCGTGCGACTGTAGCAAGAGATGTGGCTGCT
 CTAATGGAGTATAAAGGGCTTTCTCTCAAGGAAGCAGCAGACTACGTTATAGAGGAATCTGCGCCAAA
 GGAACCACTGGCCTGATTGCTGTATCGGCCACTGGGGAAGTTAGCATGCCATTTAATACAACCGGAATG
 TTTAGAGCTTGTGCAACTGAAGATGGTCACACAGAATTAGCAATTTGGTAACTTTTCATTAGAATAGAT
 TAG

sec. con núm. de ident.: 11 (proteína asparaginasa-1)

MGWAIALHGGAGDIPKDLPPPELREPRESLRYCLQIGVDAIKAQKSPLDVVVELVVRELENNPYFNAGRG
 SVLTSNGTVEMERACIMDGNITKNCGAVSGLTTVVNAISLARLVMEKTPHIYLA FEGAEAFAREQGVETTD
 SSHFITPRNIBRLKQAKEANKVQVDYNTTRPIPKDDKTPAPSGDSQLGTVGCVAVDSFGHLAAATSTGGL
 VNKMVGRIGDTPIIAGTYANKLCAVSATGQGEALIRATVARDVAALMEYKGLSLKEAADYVIESAPK
 GTTGLIAVSATGEVSMFPNTTGMFRACATEDGHTELAIW

sec. con núm. de ident.: 12 (ubiT)

5
 TTGATTTTAATGTTTAGCAAATGTCCTATCAGTTTTCTCTTTTTGTCGAACGGTAATTTAGAGTTTTTT
 TTGCTATATGGATTTTCGTTTTTGATGTATGTGACAACCCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAACTAA
 10 GAGTTTTTGCTTATTGTTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTTCTAGTTCTCTA
 CGTGTTAAATGTTCAACACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACATCAAGTCTGTGG
 GATCGATAAATATGCTTCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTGGGTTGAGTATAATA
 TAGTAAAAAATAGG

sec. con núm. de ident.: 13 (P:Fmo)

20
 CCTTAATTCTATACACTATTATTTCTCTTTTATTCTACATTTCAATTCTTAGCTTATTTTTTCGTAAAC
 GTTACCCAGTGCCACTACCACCCGGTCCAAAACCATGGCCAATAATCGGAAACATAGTCCAATTAGGTC
 25 CGAAGCCGCACCAGTCCACTGCATCAATGGCCCGAACTTACGGGCCACTCATGCACCTTCGCATGGGGT
 TCGTGGACGTGGTGGTTGCGGCCCTCAGCTTCGGTGGCGGCTCAATTTTGAAAAATCATGACGCTAACT
 TCTCGAGCCGCCACCAGACTCTGGGGCGAAACACATGGCTTATAATTACCATGACCTTGTGTTTGAC
 30 CTTACGGACCACGGTGGCGTATGCTAAGGAAAATTTGTTCTGTTTCATCTCTTTTCGGCTAAAGCTTTAG
 ATGACTTCCGCCATGTCCGACAGGAAGAAGTCAGAACCTTACGCGCGCCTTAGCAAATGCTGGCCAAA
 AGCCAATCAAATTAGGGCAGCTGTGTAACGTGTGCACCACGAATGCACCTTGCCTGTGATGCTCGGGA
 AGCGGGTATTCGCCGACGGTACTAACGGTATCGATCCACAAGCGGAGGAGTTCAAGTTAATGGTGGTGG
 35 AGATGATGGTGCTCGCCGGCGTTTTACATCGGCGATTTTATTCCGGCGCTTGATTGGATGGACATTCA
 AGGCGTAGCAGGAAAAATGAAGAACTCCACGCGCGTTTCGACGCGTTCTTAACCACGATCCTCGAAGA
 ACACAAGGGAAAGCGAGTTGGAGAATCGAAGGAGCAGGGGGATTTGTTGAATACGTTGATCTCTCTGAA
 AAATGAAGAAGACGATAATGGAGGAAAGCTTACTGATACAGAAATTAAAGCTTTACTTTGGGTACGCCT
 40 CTTACAATTATCTCTTTATTTCAAATTGGACAAGTAAAAACAAATATGGATTTTATGATATCTAACA
 GTAAAAAGGAATAGAGGTAATAAATATGAACTATGCCATTTTCTTTGACGGACTAAAAATGGAAGTA
 TGCTAATGTCCTAATTTATATGATAATGTTTGGCTTGAACAATGTTGTTTAAGAAGTTAATTTTTATT
 45 CGTCTGCAATTTAATGGTATGAGTTTGAATTTTCAAGATATAGTTTGATCAATTGTTCTTATACAAAT
 TCACTCTAATATTACAACTTACAAATTTGAAGTTTAAAGATTTATCAGTTCAAATTTTATGATTTTTTC
 ACCTTTTCAAAGCCTTAAACTCGAATTATACAAGTGTGGGAGTTATT

sec. con núm. de ident.: 14 (asparaginasa-2 de papa)

ATGGGTGGTTGGGCTATAGCGGTGCACGGTGGCGCTGGTGTGGACCCAAATCTCCAGCTGAACGTCAG
 5 AAACAAGCTAAAGAACTCCTTACTCGTTGCCTTAACATTTGAATCTCCGCTCTTCGCTCTTCTCTACCT
 GCCATTGATGTTGTTGAACTCGTTGTGAGAGAACTGGAAAGTGATCCTCTATTCAATTCGGGTCGTGGA
 TCTGCATTAACTGCAAAATGGAACAGTGGAAATGGAGGCGAGCATTATGGACGGCGACGGTAGACGATGC
 10 GGCGCCGTTTCTGGTATCTCCACCGTGAAAAACCCAATCTCCCTCGCTCGCCTTATCATGGATAAAATCC
 CCTCATTCCTATCTCGGTTTCTCCGGCGCTGAAGAAATCGCCAAACAACAGGGCGTGGAGATGGTAGAC
 AATGAATATTTTCATCACCGAGGACAATGTTGGAATGCTGAAACTAGCCAAAGAGGCTAACACCATTTTG
 TTCGATTACAGAATTCATTAACTGGATTGGATTCTGTGCGTCATCCGTTGAAAGCCCAATTCGCATG
 15 AACGGATTACCGATAAGTGTTTACGCGCCGGAGACGGTGGGATGTGTGGTGGTAGACGGCCAAGGTAGG
 TGCGCCGCCGCCACATCCACCGGTGGTTTAATGAACAAAATGACCGGTGCTATCGGTGACTCACCGCTG
 ATTGGTGTGGGACCTACGCGAGGTGAGCTTTGTGGGGTGTGATGTACAGGGGAAGGAGAAGCTATCATA
 CGTGAACCCCTAGCACGTGACGTGGCAGCAGTTATGGAATATAAGGAATTGGGCCTTCAAGAAGCAGTG
 20 GACTTTGTGATTAGAAGAGATTGGATAAAGGGTTTGTCTGGGCTTATTGCTGTGTCTAATAAAGGGGAA
 GTGGCTTATGGGTTTAATTGTAATGGAATGTTTAGAGGATGTGCTACTGAAGATGGATTATGGATGTT
 GGTATTTGGTAA

sec. con núm. de ident.: 15 (asparaginasa de trigo)

ATGGCGCGCTGGGCCATCGCCATCCACGGAGGCGCGGGCGTGGACCCCAACCTGCCGGAGCACCGCCAG
 30 GAGGAGGCCAAGCGCGTGTGGCCCCGTGCTGCGAGGTGCGGCGTCGACCTGCTCCGGGCTGGTGCAGC
 GCGCTGGACGTGCTGGAGGCCGTGGTGCAGGAGCTGGAGACGGACCCCTGCTTCAACTCGGGCCGCGGC
 TCCGCGCTCACACGCGCCGGCACCGTCGAGATGGAGGCCAGCATCATGGACGGCCGCGCCGCGCTGC
 35 GCGCCGCTCTCCGGTGTGTCCACCGTTAAAACCCCGTGTCCCTGGGCCGGCGCGTCATGGACAAGTCC
 CCACACTCCTACCTCGCCTTCGACGGCGCGGAGGATTTGCGCGCGGAGCAGGGCCTGGAGGTTGTGGAT
 AACAGCTACTTTCATCACGGAGGAGAACGTGGGCATGCTCAAGCTCGCCAAGGAGGCCAACAGCATCTC
 40 TTCGACTACCGCATCCCGCTGGCGGGCACCGACACTTGCAGCGCGCAGGCAGCGCGGTGGAGGGCCAC
 GGCAGCAATGGCATGGTGAAGCGGGCTGCCCATCAGCATCTACGCGCAGGAGACGGTCCGGGTGCGCG
 GTGGTGGACTCTAACGGCTTCACGGCAGCGGCCACCTCGACCGCGGGGCTCATGAACAAGATGACGGGC
 45 CGCATCGGCGACTCGCCCCCTCATCGGCGCGGGCACCTACGCGTGGGGCACTGCGCTGTGTGCTGCACC
 GCGGAGGGCGAGGCCATCATCCGCTCCACGCTGGCGCGGGACGTGGCGGCCGTGATGAGTACAAGGGC
 CTCCCGCTGCAGGAGGCCGTGGACTTCTGCGTCAAGGAGCGGCTGGACGAGGGGTTCCGGGGGCTCATC
 50 GCCGTGTCCGGCACCGCGAGGTGGCGTACGGGTTCAACTGCACCGGCATGTTACAGGGGCTGCGCCACC
 GAGGACGGCTTCATGGAGGTGCGCATCTGGGATTGA

sec. con núm. de ident.: 16 (asparaginasa de trigo)

MARWALAIHGGAGVDPNLPFHRQEEAKRVLARCLQVGVDLLRAGATALDVVEAVVRELETDPCFNSEGRG
 55 SALTRAGTVEMEASIMDGRGRRCGAVSGVSTVKNPVSLARRVMDKSPHSYLAFDGAEDFAREQGLEVVD
 NSYFITEENVGMLKLAKBANSILFDYRIPLAGTDTCSAQAAVEGHGSNGMVMNGLPISIIYAQETVGCA
 VVDSNGFTAAATSTGGLMNKMTGRIGDSPLIGAGTYACGHCAVVSCTGEGEAIIRSTLARDVAAVMEYKG
 60 LPLQEAVDFCVKERLDEGFAGLIAVSGTGEVAYGFNCTGMFRGCATEDGFMEVGIWD

sec. con núm. de ident.: 17 (promotor puroindolina de trigo)

5 CCTCGTCCACCTCCTAAGTTGGGACCTCCGTGCGAGCGTTGCGGGGCCGCCGCTCGGATGGCTTCTGGA
 AGGCCGTTGTACATGGGCACAGGGTGAATCCCGACGAGAGCTGGCCATTGGCGCGCGCAAGTAGACGAC
 GACGTCCCGACGAAGAGCTGCCCGCCAGCTCGCCTCACTCGCCTTTGATTAGAAATGAAAGATTGGG
 AAGAAGCAGACTTGAGCCTGCAGGGAAAGGATAAGGTGACGATGCAGTCTCCACTCGTTCGGGGCGACA
 10 CGCGTACTGAATGTATGAGAAACGTGACGTGGCAGAGACCCCAAGATACTCCCTCCATTATTTTTAGT
 CTGCATATAAAGTTTGGTCAAAGTCAAGATTGTAAATTTAACTAATTTATAATAAAAAAATATCAA
 CATTACAAATATGAAATAATTATTACCAGATGCGTGAAGAAATGTATTTCCATACTATATAGCCTTGGT
 ATTGGAGATGTTCAATTTTTTTTTATATAAATGGGAAGTAGAGGCACTCTTCCATATAATGAAGTTTATA
 15 ATATATGTGCTTATATTGTACTATAATTGTTTGAATAACTTAGCATATGTTTCAAGATGTATGATATCTGT
 AATTTAAGCGCTTGAATTTTACATATAAATATTATTAAATAAATATGTACCCCTATAATAGCTAGGCCG
 TGCAGTTGCACGGGTAGATGACTAGTGATTACAATCTTGTTGTGTGCAAGTCAAGCTTATCTAGTTTA
 CACGTAACAACTTGTAGAACATTACAAAATTTATGCTTGCTAATAACTTCTAGAACACTACAACACTTG
 20 ACATGTAAAAGGAATTTGACGAGTCATGGCCTACTAAAGCAAGTTACATTACTAGTCTTATCTATCTTA
 ACAGACCACACAAGATTACAACTAAGTACCGTGCCAGCCATACTTATCTAGTTTATGCGTAACAATTT
 GCAGAAAATTAGAACTTAGTTTCAGAAAATACGCAATCTAGATTAGTGTGTTGAGCTGTAAAGTGAAT
 AAGATGAGTCATGCATGTTATCACACCTTTTGGTGGTGGGAATGATAGTGCAACAACAAGGAACTTTAA
 25 TGACCAGTCCAAGAATACACTTGTAAAGTAGTGCCACCAACAGAACATTCCAATGATGATTTTTAGAA
 GCATCCAAGCACTTTCCACACAAACAAATGCCAATTGTGAAAGAGATCAATCCATGGCAGCTATAAATA
 GCCCCATAGCATGACGATCATCCTTCCTCATCCATCATCTCATTAGTAGAGCGCATCTTTAAGCCAA
 30 GCAAGCTGTGGTCAATACAAATCC

sec. con núm. de ident.: 18 (PPO)

35 TTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTTTGTCTTCTGTTCTG
 TTTTTTCTCTGTTGAAATCAGCTTGTGCTTGATTTCAATGAAGTTGTTATTCAAGAATAAATCAGT
 40 TACAATTATGTTTGGG

sec. con núm. de ident.: 19 (R1)

ACCTTATTTCACTACCACCTTTCCACTCTCCAATCCCCATACTCTCTGCTCCAATCTTCATTTTGCTTCG
TGAATTCATCTTCATCGAATTTCTCGACGCTTCTTCGCTAATTTCTCGTTACTTCACTAAAAATCGAC
GTTTCTAGCTGAACCTTGAGTGAATTAAGCCAGTGGGAGGAT

sec. con núm. de ident.: 20 (PhL)

TTAGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGATTTGTGGGAAATGGACAAATATAAGAGAGTGCAGGGGA
GTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATGATAAATAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACAAGAGG
ACGCAACACACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAA
TAATTCACAATCCTCACTCTCTTATCACTCTCATTGCGAAAAGCTAGATTTGCATAGAGAGCACAAA

sec. con núm. de ident.: 21 (P:ubi7)

TCGAGCACATTGATTGAGTTTTATATGCAATATAGTAATAATAAATATTTCTTATAAAGCAAGAGGT
CAATTTTTTTTTATTATACCAACGTCACATAAATTATTTGATAATGTAAACAATTCATTTTACTTA
AATATCATGAAATAAACTATTTTATAACCAAAATTACTAAATTTTTCCAATAAAAAAAGTCATTAAAG
AGACATAAAATAAATTTGAGTAAAAAGAGTGAAGTCGACTGACTTTTTTTTTTTTATCATAAGAAAATA
AATTATTAACCTTAACCTAATAAAACACTAATATAATTTTCATGGAATCTAATACTTACCTCTTAGAAAT
AAGAAAAAGTGTTTCTAATAGACCCCTCAATTTACATTAAATATTTTCAATCAAATTTAAATAACAAATA
TCAATATGAGGTCAATAACAATATCAAAATAATATGAAAAAAGAGCAATACATAATATAAGAAAGAAGA
TTTAAGTGCGATTATCAAGGTAGTATTATATCCTAATTTGCTAATATTTAAACTCTTATATTTAAGGTC
ATGTTTCATGATAAACTTGAAATGCGCTATATTAGAGCATATATTAAATAAAAAAATACCTAAAAATAA
ATTAAGTTATTTTAGTATATATTTTTTACATGACCTACATTTTTCTGGGTTTTCTAAAGGAGCGTG
TAAGTGTCGACCTCATTCTCCTAATTTTCCCACCACATAAAAAATAAAAAAGGAAAGGTAGCTTTTGCG
TGTTGTTTTGGTACACTACACCTCATTATTACACGTGTCCTCATATAATTGGTTAACCCCTATGAGGCGG
TTTCGTCTAGAGTCGGCCATGCCATCTATAAAATGAAGCTTTCTGCACCTCATTTTTTTCATCTCTAT
CTGATTTCTATTATAATTTCTCTCAATTGCCTTCAAATTTCTCTTTAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTT
TTGGTTTTTGCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTATAGCCCTTAATTTTGAGTTT
TTTTTCGGTTGCTTTGATGGAAGGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTTACGTTGGTTTGATGGAAGGCC
TACAATTGGAGTTTTCCCGTTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAGTTTGAGATTTTTTTCTGTGCGATTC
GATTTCAAAGGTTTAAATTTAGAGTTTTTACATTTGTTTGATGAAAAAGGCCTTAAATTTGAGTTTTTC
CGGTTGATTTGATGAAAAAGCCCTAGAATTTGTGTTTTTTCGTGCGTTTGATTCTGAAGGCCTAAAATT
TGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAAG
CCCTAAATTTGAGTTTTTTCCCGTGTTTTAGATTGTTTGGTTTTAATTTCTCGAATCAGCTAATCAGGG
AGTGTAAGAACCCCTAAATTTGAGTTTTTTTCGTTGTTCTGATTGTTGTTTTTATGAATTTGCAGATGC
AGATCTTTGTGAAAACCTCTCACCGGAAAGACTATCACCTAGAGGTGGAAGTTCTGATACAATCGACA
ACGTTAAGGCTAAGATCCAGGATAAGGAAGGAATCCCCCGGATCAGCAAAGGCTTATCTTCGCCGGAA
AGCAGTTGGAGGACGGACGTACTCTAGCTGATTACAACATCCAGAAGGAGTCTACCCCTCATTGTTGTC
TCCGTCTACGTGGAGGTG

Sec. con núm. de ident.: 22 (P:patatina)

ATCTCGAGCCGATCTTACTTTTATTGGCTTTGTTTTATTATCATTTTTTCACACTCTGTGGTTTCAGTAAT
 5 TGACCGGAGACTATACCATAGAAGACCTAATCACAACCTTAGTCTTCTTTTTTATTTTTTCTTTATTTAG
 AAGACCAATTGTTAAAAATATGAACCTGGTACTATTCTAAGGTTTGTTTTATGTTCTTTGTTCATT
 TTGCACCTTATAATTTTACTGAATTGCAGTTTTTACATTATGTTTTAATAGTTAGCAGTTTCATGAATGA
 10 TGAAGTTTATGTTGCCATATAGAGTAGTTTGTGATGATATACTTCATAAACCTTTCACCTTATGTTAAATT
 TGTAATGATAAAATTTAATTATATTGTAAATCAAAAATTACTTATAAAATGGGCATTAAAAACATATGA
 AAGACAAATTGTTTACATATTTTACTTTTGACTCCAATATGAATATCTCAATTTAAATCTTTGTTTTA
 TTTTCTCTTTCTTTTACAGGTATAAAAGGTGAGAATTGAAGCAAGATTGATTGCAGGCTATGTGTCAC
 15 CACATTATTGATACGTTGGAAGGAATTTTACTTTATATGTCTTTGTGTAGGAGTAATTTTTGATATATT
 TTAGTTAGATTTTTTTTTTTCATTGGACATATTTTACTTTTATTTAAGGAATTTGTAATGAGATATTATT
 CTTTAGTATAAATTAAGTTATTTTTATTATATGATCATGGATGAATTTTGATACAAATATTTTTGTCTAT
 TAAATAAATTAATTCATCACAACCTTGATTACTTTTCAGTGACAAAAATGTATTATCGTAGTACCCTTTA
 20 TTGTTAAATATGAATACCTTTTATTTTTATTTTGTGACAATTGTAATGTCACTACTTATGATAAATTT
 TAGTGACAATATATGTCGTTGGTAAAAGCAACACTTTTAGTGACAAAATGATAAATTTAATCACAAT
 TATTAACTTTTTTATAATAATAAATTTGTCCCTAATTTATACATTTAAGGACAAAATATTTTTTGTA
 AATAAAATAGTCTTTAGTGACAATATTATATCTTTTCAACTACGAAATACATACAACCTTAGAGACAA
 25 TTGATGTTGTCCCTGATTGAACTAAATAATTAGCGACGATATAGTTTTGTGCGTTGTAATAACCTTTTT
 AGTGACAAAACATACTATTAACTACAAAAAAGTTACACATTTTATGACAAATAATAAATTCATCACAA
 ATGTTTTATGCATTTGGGGACGATTTTTCTTTTGTAGTTAATGCGTATTAGTTTTAGCGACGAAGCACT
 AAATCGTTTTTGTATACCTTGAGTGACACACGTTTAGTGACGACTGATTGACGAAATTTTTTGTCTCA
 30 CAAAATTTTTAGTGACGAACATGATTATAGATGACGAAATTTTTGTCCCTCATAATCTAATTTGTT
 GTAGTGATCATTACTCTTTGTTTGTTTTATTTGTCTATGTTAGTTCATTAAAAAAAATCTCTCTCT
 TATCAATTCTAACGTGTTTAAATATCATAAGATTAAAAATATTTTAAATATATCTTTAATTTAAACCCAC
 AAAGTTTAAATTTCTTCGTTAACTTAATTTGTCAAATCAGGCTCAAAGATTGTTTTTCATATCGGAATG
 35 AGGATTTTATTTATTCTTTTAAAAATAAAGAGGTGTGAGCTAAACAATTTCAAATCTCATCTCACATA
 TGGGGTCAGCCACAAAATAAAGAACGGTTGGAACGGATCTATTATATAATACTAATAAAGAATAGAAA
 AAGGAAAGTGAGTGAGGTACGAGGGAGAGAATCTGTTTAAATATCAGAGTCGATCATGTGTCAGTTTTAT
 40 TGATATGACTTTGACTTCAACTGAGTTTAAAGCAATTTTGATAAGGCGAGGAAAATCACAGTGCTGAATC
 TAGAAAAATCTCATACAGTGTGAGATAAATCTCAACAAAAACGTTGAGTCCATAGAGGGGGTGTATGTG
 ACACCCAACTCAGCAAAAGAAAACCTCCCTCAAGAAGGACATTTGCGGTGCTAAACAATTTCAAGTC
 TCATCACACATATATATTATATAATACTAATAAAGAATAGAAAAAGGAAGGTAAACATCACTAACGAC
 45 AGTTGCGGTGCAAGAGAGTGAGGTAATAAACATCACTAACTTTTATTGGTTATGTCAAACCTCAAAGTA
 AAATTTCTCAACTTGTTTACGTGCCCTATATATACCATGCTTGTATATGCTCAAAGCACCAACAAAATT
 TAAAAACAATTTGAACATTTGCAAAGGTACCGA

Sec. con núm. ident.: 23

5 GGTACCAAGTGTCTGAGACAACCAAACTGAAAGTGGGAAACCAAACTCTAAGTCAAAGACTTTATATA
 CAAAATGGTATAAATATAATTATTTAATTTACTATCGGGTTATCGATTAAACCGTTAAGAAAAAATTTC
 AAACCGTTAAGAACCGATAACCCGATAACAAAAAAATCTAAATCGTTATCAAACCGCTAAACTAATA
 ACCCAATATTGATAAAACCAATAACTTTTTTTTATTCGGGTTATCGGTTTCAGTTCTGTTTGGAAACAATCC
 10 TAGTGTCCTAATTATTGTTTTGAGAACCAAGAAAACAAAACCTACGTGCGAAATATTTAGTAAATAC
 TTGTATATCTCAGTGATAATTGATTTCCAACATGTATAATTATCATTACGTAATAATAGATGGTTTTCC
 GAAACTTACGCTTCCCTTTTTCTTTTGAGTCGTATGGAATAAAAGTTGGATATGGAGGCATTCCCGG
 GCCTTCAGGTGGAAGAGACGGAGCTGCTTCACAAGGAGGGGGTTGTTGTACTTGAAAATGGGCATTTAT
 15 TGTTGCGAAACCTATCATGTTCTATGGTTGTTTATTTGTAGTTTGGTGTCTTAATATCGAGTGTCT
 TTAGTTTGTTCCTTTAATGAAAGGATAATATCTGTGCAAAAATAAGTAAATTCGGTACATAAAGACAT
 TTTTTTTTGCATTTTCTGTTTATGGAGTTGTCAAATGTGAATTTATTTATAGCATGTGAGTTTCTCT
 CCTTTTTCATGTGCCCTTGGGCCTTGCATGTTCTTGCACCGCAGTGTGCCAGGGCTGTCGGCAGATGG
 20 ACATAAATGGCACACCGCTCGGCTCGTGGAAAGAGTATGGTCAGTTTCATTGATAAGTATTTACTCGTA
 TTCGGTGTTTACATCAAGTTAATATGTTCAAACACATGTGATATCATAATCCATTAGTTAAGTATAAA
 TGCCAACTTTTACTTGAATCGCCGAATAAATTTACTTACGTCCAATATTTAGTTTGTGTGTCAAACA
 TATCATGCATATTTGATTAAAGATAAATAAACGATGTGTAATTTGAAAACCAATTAGAAAAGAAGTAT
 25 GACGGGATTGATGTTCTGTGAATCACTGGTAAATGGACGGACGATGAAATTTGATCGTCCATTAAAG
 CATAGCAACATGGGTCTTTAGTCATCATCTTATGTTATAATTATTTCTTGAACTTGATACACCAAC
 TTTTATTGGGAAAGTGACAGCATAGTATAAACTATAATATCAATTCGGCAATTTCGAATTATTCAAA
 30 TCTCTTTTGTCAATTCATTTCTCCCTATGTCGCAAGTACCAATATTTAAGTACAAAAAATCTTGA
 TTAAACAATTTATTTTCTCACTAATAATCACATTTAATCATCAACGGTTCATACAGCTCTGTCACTCTT
 TTTTTATTCTCTCAAGCGCATGTGATCATACCAATTTATTTAAATACAAAAAATCTTGATTAAACAATTC
 AGTTTCTCACTAATAATCACATTTAATCATCAACGGTTCATACACATCCGTCACTCTTTTTTTATTCTC
 35 TCAAGCGCATGTGATCATACCAATTTATTTAAATACAAAAAATCTTGATTAAACAATTCATTTTCTCACT
 AATAATCACATTTAATCATCAACGGTTTATACACGTCCGCCACTCTTTTTTTATTCTCTCAAGCGTATG
 TGATCATATCTAACTCTCGTGCAACAAGTGAAATGACGTTCACTAATAAATAATCTTTTGAATACTTT
 GTTCAGTTTAAATTTATTTAATTTGATAAGAAATTTTTTTATTATTGAATTTTATTGTTTTAAATTAATA
 40 ATAAGTTAAATATATCAAAATATCTTTTAATTTTATTTTGAATAAATACGTAGTTCAAACAAATTAATA
 ATTGAGTAACTGTTTTTCGAAAAATAATGATTTCTAATAGTATATTCTTTTTCATCATTAGATATTTTTT
 TTAAGCTAAGTACAAAAGTCATATTTCAATCCCCAAAATAGCCTCAATCACAAGAAATGCTTAAATCCC
 45 CAAAATACCCCTCAATCACAAGACGTGTGTACCAATCATACCTATGGTCTCTCGTAAATTCGGACAAA
 TCAGGTCTATAAAGTTACCTTGATATCAGTATTATAAACTAAAAATCTCAGCTGTAATTCAGTGCA
 ATCACACTCTACCACACACTCTCTAGTAGAGAGATCAGTTGATAACAAGCTTGTTAACGGATCCCTAGT
 AATACTGAGATTAGTTACCTGAGACTATTTCTATCTTCTGTTTGGATTGATTATTAAGGAAAATTA
 50 TGTTTCAACGGCCATGCTTATCCATGCATTTAATGATCAATATATTACTAAATGCTATTACTATAGG
 TTGCTTATATGTTCTGTAATACTGAATATGATGTATAACTAATACATACATTAATTTCTCTAATAAATC
 TATCAACAGAAGCCTAAGAGATTAAACAAATACTACTATTATCCAGACTAAGTTATTTTCTGTTTACTA
 55 CAGATCCTTCCAAGAACAATAAATTAATAATTGTATGGCTGCTATACCATCAAACCAACAATGTATAA
 GAAATAATACTTGCATAACTAATGCACGCCTACTAATGCAAGCATTACTAATGCACCATATTTTGTAT
 TTGTTCTTATACACTCTACCAAACGACCCCTTAGAGTGTGGGTAAGTAATTAAGTTAGGGATTGTGGG
 60 AAATGGACAAATATAAGAGAGTGCAGGGGAGTAGTGCAGGAGATTTTCGTGCTTTTATTGATAAATAAA

AAAAGGGTGACATTTAATTTCCACAAGAGGACCGAACACAACACACTTAATTCCTGTGTGTGAATCAAT
 AATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAATAATTCACAATCCTCACTCTCAAAATTCCTATGTTAACC
 5 AAATAAATTGAGACAAATTAATTCAGTTAACCAGAGTTAAGAGTAAAGTACTATTGCAAGAAAATATCA
 AAGGCAAAAGAAAAGATCATGAAAGAAAATATCAAAGAAAAGAAGAGGTTACAATCAAACCTCCCATAA
 AACTCCAAAATAAACATTCAATTTGCAAAAACATCCAATCAAATTGCTCTACTTCACGGGGCCACGC
 10 CGGCTGCATCTCAAACCTTCCACGTGACATCCCATAAACAATCACCACCGTAACCCCTTCTCAAACCTC
 GACACCTCACTCTTTTTCTCTATATTACAATAAAAAATATACGTGTCCGTGTATGGGTGATCCTTCTCT
 TATTATACCGACTAAAGACATTGGTATTAAAGGATATCTTATCTTTTGAGGAGATTCCCGTTCAGATTCT
 GGAGCGTCAGGTTCCGAAGTTGAGAACCAATGAGGTAACATCAGTCAAGGTCTTATGGAGGAATCAGCC
 15 ATGGGGACACGTATATTTTTTATTGTAATATAGAGAAAAAGAGTGAGGTGTGAGTTTTGAGAAGGGTT
 ACGGTGGTGATTTGTTATGGGATGTCACGTGGGAAAGTTTGAGATGCAGCCGGCGTGGGCCCCGTGAAG
 TAGAGCAATTTGATTGGATGTTTTTGCAATTTGAATGTTTATTTTTGGAGTTTTATGGGAGTTTGATTG
 TAACCTCTTCTTTCTTTGATATTTTCTTTCATGATCTTTCTTTTGCCCTTGATATTTCTTGCAAT
 20 AGTACTTTACTCTTAACCTCTGTTAACTGAATTAATTTGTCTCAATTTATTTGGTTAACATAAGAATTT
 TGAGAGTGAGGATTTGTAATTTATTTATGATGAAGATTGGAGAAGTCAATTATTGATTACACACAGG
 AATTAAGTGTGTTGTGTTCCGGTCTCTTGTGGAATTAATGTACCCCTTTTTTTATTTATCAATAAAA
 GCACGAAAATCTCCTGCACACTCTCCCTGCACTCTCTTATATTTGTCCATTTCCACAAAATCCCTAACT
 25 TAATTACTTACCCACACTCTAAGGGGTCGTTTGGTAGAGTGTATAAGAACAATAACAAAATATGGTGCA
 TTAGTAATGCTTGCATTAGTAGTGCGTGCATTAGTTATGCAAGTATTATTTCTTATACATTGTTTGGTT
 TGATGGTATAGCAGCCATACAATTATTAAAGTTTTTGTCTTGGAAAGGATCTGTAGTAAACAGAAAAATA
 ACTTAGTCTGGATAATAGTAGTATTTGTTAATCTCTTAGGCTTCTGTGATAGATTTATTAGAGAATTT
 30 AATGTATGTATTAGTTATACATCATATTCAGTATTACAGAACATATAAGCAACCTATAGTAATAGCATT
 TAGTAATATATTGATCATTAAATAATGCATGGATAAGCATGGCCGTTGAAACATAATTTCTTAAATAAA
 TCAAATCAAACAGAGATAGGAAATAGTCTCAGGTAACATAATCTCAGTATTACTAGCTTTAATGTTTA
 GCAAATGTCCTATCAGTTTTCTTTTTTGTGCAACGGTAATTTAGAGTTTTTTTTTGCTATATGGATTTT
 35 CGTTTTTGATGTATGTGACAACCTCGGGATTGTTGATTTATTTCAAACCTAAGAGTTTTTGCTTATTG
 TTCTCGTCTATTTTGGATATCAATCTTAGTTTTATATCTTTCTAGTTCTCTACGTGTTAAATGTTCAA
 CACACTAGCAATTTGGCTGCAGCGTATGGATTATGGAACATCAAGTCTGTGGGATCGATAAATATGCT
 40 TCTCAGGAATTTGAGATTTTACAGTCTTTATGCTCATTTGGGTTGAGTATAATATAGTAAAAAATAGGA
 ATTCGAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAAATGCAACAAAATCTAGTGGAGGGACCACTACCA
 GTACATTAGATATTTATCTTTTATTACTATAATAATATTTTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAAGT
 GGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCACTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGAGGGGGCCCATGCA
 45 AGGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATAACTGTGATGAGCATTTCC
 CTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCACCCGCTATTCTCTTGACACGTGTCA
 CTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGCACCTCCTCATCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAACAA
 GTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTGATTTTCATGCATGTTTCCCTACATTCTATTATGA
 50 ATCGTGTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCATCTATTCTGATTTTGATTCTTTCGCT
 ACTGAATTTGACCTTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCTCTTCTTCTTCTTCTCAGAA
 ATCAATTTCTGTTTGTGTTTTGTTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCTTTTTGTAGACCACACATCAC
 55 CCGCGGTATATGGTGTAGAAGGAATGGTTCCGAAACCATGGTGGGTTGTACCATCTTCTAAGTCCT
 CCATTTTTGCTTGAATAAATATGACCGGAAGGAAGCTAACAAATCGTTTCAATCATCACTTAAGGCT

TTCATCTCTGAGGAAAACCATATGGAGCCATCAAGACCCACCCCATATAAAGGGGTGTAATGCCAATG
 GCATCCCAGAGCAGCGATGAAACTTTTATCCCGGGTATCAAGAAGAACAAAAGAGAACATCCCATCCAAC
 ATGTCAATGAAGTTTTCTCCATATTCCTTCATAAAGATGGGCAATAACTTCACAATCACTTTCAGTTCGA
 AACTGATGAGAAAATTCATTGGGGCTATACCTTGCTTTATATAATATGTAAAACAGTATAATTATTCAAT
 TTTAGAGGCGGCTTCCATATCAATTATTCAGGAAGCGGTAGGTGGGGGAACCTTTATCCAGAAATGG
 TACTCTAGCTTCTAAGCCCCACGCGGATGTAGCCTTGTGCTCTTAAACAGTCATACTGGTGAAGCGC
 TTTTATCTTGGACATGTTCCGTGTGGAACTCTTCCTTGTGGGAGCCTTGTGGAAGTACAAGTAACC
 ACCAAAAATTCGTGAGCGCCTTCCCTTGATATGACCATCTTCACCTCCTAGTGATTTAATCTTACGCGA
 CATAAGGAACATAGGAGTGCTGGCTCTTATTGTTGTTACATCATACGTCTCGATATGATATATAACATC
 TTCAATAGCATCAATACCGTCTGAACAGTAAAGTGAAACTCATGGTGAACGGTTCTTAAAAGTCAGC
 AACTTCTTTTGCAGCCTTGAGATCTGGTGAGCCCTCGAGACTGCAGCACTTTGGTTCTGAGGCGTGCCCT
 TCGAAAATGCTGTTATCAAACGGTTGATGACTGATGTCCCTTTGGCGTTCTGCTCTCGGGGGGACTTG
 ATTCGTCTTTGGTTGCTTCTGTCACTACTCGATACTGGCTGGAACAAAGCTGCTAAGCAATGGGGAG
 CACAACTTCATTCCTTCTGTGTTGGTCTCGAGGGCTCACCAGATCTCAAGGCTGCAAAAGAAGTTGCTG
 ACTTTTATAGGAACCGTTCAACCATGAGTTTCACTTTACTGTTGAGGACGGTATTGATGCTATTGAAGATG
 TTATATATCATATCGAGACGTATGATGTAACAACAATAAGAGCCAGCACTCCTATGTTCTTATGTCGC
 GTAAGATTAAATCACTAGGAGTGAAGATGGTCATATCAGGGGAAGGCGCTGACGAAATTTTGGTGGTT
 ACTTGTACTTCCACAAGGCTCCCAACAAGGAAGAGTTCCACACGGAACATGTGCAAGATAAAAGCGC
 TTCACCAGTATGACTGTTTAAAGCAACAAGGCTACATCCGCGTGGGGCTTAGAAGCTAGAGTACCAT
 TTCTGGATAAAGAGTTCCCCACCTACCGCTTCTTGGAAATAATTGATATGGAAGCCGCTCTAAAATTG
 AATAATTATACTGTTTTACATATTATATAAAGCAAGGTATAGCCCAATGAATTTTCTCATCAGTTTCGA
 ACTGAAAGTGATTGTGAAGTTATTGCCCATCTTTATGAAGAATATGGAGAAAACCTTATTGACATGTTG
 GATGGGATGTTCTCTTTGTCTCTTCTGATACCCGGGATAAAAGTTTCATCGCTGCTCGGGATGCCATT
 GGCATTACACCCCTTTATATGGGGTGGGGTCTTGATGGCTCCATATGGTTTTCTCAGAGATGAAAGCC
 TTAAGTGATGATTGTGAACGATTGTAGCTTCTTCCCGGTCAATTTATTCAAGCAAAAATGGAGGA
 CTTAGAAGATGGTACAACCACCATGTTTTCGGAACCATTCCTTCTACACCATATGAGTGGGAGATT
 CTCTAACCGACAACCACCACTATGAGCCTAAGTGGTGATACAGTGCTTGTGTCACGCTGCCAGAACTGT
 CCTATACTTTGCCGTATATAGAATGCTTAACCTTAGTGGATCGACCAGTCTATGCTATCTAGAGTGATG
 TGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAACAAAAACAAAACAGAAATTGATTCTGA
 GAAGAAGAAGAAGAAGAGGAAGCATTTCATTTATCACCGATTACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAA
 GAGAATCAAAATCAGAATAGATGAGATGAGATATGAAACAACGTTTATACACCATAACACGATTCATAA
 TAGAATGTAGGGAAACATGCATGAATCAGAAATAATTGGAGGAGATGAGTAAAGTTACCCTTGTG
 AGCTGTGTGAGTGAGTGAGTGAGTGTGAGAATGAGGAGGTGCTGCTTATTTGTAGCAGGTTTCAGTGACAC
 GTGTCAAGAGAATAGCGGGTGGCTATCCCTTAGCGGAAGGCAACTGTGGACACTGTATTATAGGGAAAT
 GCTCATCGACAGTATTATGGGCCCTCTCTTGTGATTACGGCTGGACTTCAACTTGGGCCTTGCAAT
 GGGCCCTCCGTTCTGTCTCTAGTATCTAAAAACCTGAACCAACTCCCTCCTACCGCTACCACTTGA
 CATTCCTATGTCTCGTGTAAATTAATAATTATTATAGTAATAAAAGATAATATCTAATGTACTGGTAC
 TGGTCCCTCCACTAGAATTTGTTGCATTTTTTAGTATTAAGATTGAGATGCATGGTTCGAGCTC

Sec. con núm. de ident.: 24 (P:PPO)

CTAGTAATACTGAGATTAGTTACCTGAGACTATTTCTATCTTCTGTTTTGATTTGATTTATTAAGGAA
AATTATGTTTCAACGGCCATGCTTATCCATGCATTATTAATGATCAATATATTACTAAATGCTATTACT
ATAGGTTGCTTATATGTTCTGTAATACTGAATATGATGTATAACTAATACATACATTAAATTCTCTAAT
AAATCTATCAACAGAAGCCTAAGAGATTAACAAATACTACTATTATCCAGACTAAGTTATTTTTCTGTT
TACTACAGATCCTTCCAAGAACAAAACCTTAATAATTGTATGGCTGCTATAC

Sec. con núm. de ident. : 25 (P:PHL)

CATCAAACCAAACAATGTATAAGAAATAATACTTGCATAACTAATGCACGCCTACTAATGCAAGCATT
ACTAATGCACCATATTTTGTATTTGTTCTTATACACTCTACCAAACGACCCCTTAGAGTGTGGGTAAGT
AATTAAGTTAGGGATTTGTGGGAATGGACAAATATAAGAGAGTGCAGGGGAGTAGTGCAGGAGATTTT
CGTGCTTTTATTGATAAATAAAAAAGGGTGACATTTAATTTCCACAAGAGGACCGAACACAACACACT
TAATTCCTGTGTGTGAATCAATAATTGACTTCTCCAATCTTCATCAATAAAATAATTCCAAATCCTCAC
TCTC

Sec. con núm. de ident.: 26 (P:R1)

AAAATTCTTATGTTAACCATAAATTTGAGACAAATTAATTCAGTTAACCAGAGTTAAGAGTAAAGTAC
TATTGCAAGAAAATATCAAAGGCAAAAGAAAAGATCATGARAGAAAATATCAAAGAAAAGAAGAGGTT
ACAATCAAACCTCCATATAAACTCCAAAAATAAACATTCAAATTGCAAAAACATCCAATCAAATTGCTCT
ACTTCACGGGGCCACGCCGGCTGCATCTCAAACTTCCACGTGACATCCCATACAAATCACCACCG
TAACCTTCTCAAACCTCGACACCTCACTCTTTTTCTCTATATTACAATAAAAAATATACGTGTCC

Sec. con núm. de ident.: 27 (G:PPO)

GAAAATTCATTGGGCTATACCTTGCTTTATATAATATGTAAACAGTATAATTATTCAATTTTAGAGGC
GGCTTCCATATCAATTATTCCAGGAAGCGGTAGGTGGGG

Sec. con núm. de ident.: 28 (GS1)

GTTCATCTTCTTCTCTCACTTCTCTTAACAACATCTTTTCTGCATTGGCCACTTAGTTGGTTAGGAGGT
 GAACATGGCTCAGATTCTGGCTCCATCTGCACAATGGCAGATGAGAATGACAAAGAGCTCAACAGATGC
 TAGTCCCTTGACTTCAAAGATGTGGAGCTCTGTGGTGTCTGAAGCAGAACAAAAGACTTGCTGTAAAAG
 CTCTGCCAAATTTAGAGTTTGTGCCCTCCAGTCTGACAATGGCACCCTGAACAGAAATGGAACAGCTGCT
 AAACCTGGACGTAACCTCCATACACTGATAAGATCATTGCTGAATATATTTGGATCGGGGGGACTGGAAT
 TGATGTGCGCAGTAAATCAAGGACTATTTCAAACCAGTCAAGGATGCTTCTGAGCTCCCAAAGTGGAA
 CTACGATGGATCAAGTACTGGACAAGCACCTGGAGAAGACAGTGAAGTCATTCTATATCCTCAGGCAAT
 ATTCAAAGACCTTTCCGTGGTGGTAACAACATCTTGGTTATCTGTGATACCTACACACCAGCTGGAGA
 GCCAATTCCTACAAACAAACGCCATAAAGCTGCTCAAATTTTTCAGCGACCCAAAAGTTGCATCTCAAGT
 TCCATGGTTTGGAAATAGAACAAGAGTACACCTTACTCCAGCCAAATGTAAACTGGCCCTTAGGTTGGCC
 TGTGGAGGCTACCTCGACCTCAGGGTCTTACTACTGTGGTGTCTGGAGTGGAAAAGTCATTTGGCCG
 AGATATATCAGATGCTCACTACAAGGCTTGCTGTATGCTGGAATTAACATTAGTGGTACTAACGGAGA
 GGTATGCCAGGACAGTGGGAATTTCAAGTAGGACCTAGTGTGGAAATTGAAGGTGGAGATCATATCTG
 GTGTGCTAGATACCTCCTCGAGAGAATTACTGAACAAGCAGGAGTTGTCTCTCACTCGATCCAAAACC
 AATTGAGGGTGAAGTGAACCGGTGCAGGATGCCACACTAACTACAGTACACTGAGTATGAGAGAAGAGGG
 AGGCTTTGAAGTGATAAAGAAAGCAATTCCTTAATCTATCCCTTCGCCACAAGGAACATATAAGTGCTTA
 TGGAGAAGGAAATGAGAGAAGGTTGACCGGAAAGCATGAAACTGCTAGTATTGACCAATTTTCATGGGG
 AGTTGCTAACCGTGGTTGCTCAATCCGTGTGGGGCGTGACACTGAGAAGGAAGGCAAGGGTTATTTGGA
 AGACCGCCGCCCAGCTTCAAACATGGACCCCTATGTTGTGACCGCATTACTGCGGAAACTACTATACT
 GTGGGAGCCAAACCTTGAGGCTGAAGCTCTTGCTGCCCAAAGATCTCATTGAAGGTTTAGAGTAATTG
 AGGGGAAATTGTTTTCATCATAATCCTCTTAGAATTTATGAGATAAGTGCTGAAGCTTGTACCTTGTG
 AGATTCCCTTATTTGGGAAATTTCTGTAAAGGAATCAAATTTTACCAGTTCATCCTAGAAAGAGGTTCC
 TTAAGACATGAGACTACTTTGGAGTTGAGGTGTAATTGTTGGACTACTTTGAACATCTTTACCTTTCTT
 TTCTCCAGATGAATCCATTTCTCTGAAATTCCAATTGGTGTGATTTTCCGAATTAATCTTTGAACAC
 ATAATCAATCATGTACACTTACAGTTTCAAACCTAGCTAGTTAAGTTACTTATATGATATTATCTTCTGT
 CTGCTATGTTCAAGCTCAGGTTCTTTAGAGAATTATCATAATATTTTATTTTCATGTTGGCCATCAATC
 TGCCACGACTCTCGTCTTTATCTGGATTTAAACTTGGTTGCTTTCCAACATATACATAATTCATGTTAC
 ATGCACTTGAATATATGTATCCAGCATGCCATTTTCCAGAACTTTGTACTTGATGTGCAAAGTACATGA
 GGACTTCCAAGTGAGTAAAGATGCATAATCTCATGTACAAGC

Sec. con núm. de ident.: 29 (GS2)

GATCAAATTAATTAAATTCCTCTCATTCAACAAATTCAAACTTTGAATTATTATTATTTTACATAATGG
 CTCATCTTTTCAGATCTTGTCAATCTCAATCTCTCTGATTCCTCTGACAAAATCATTGCTGAATACATAT
 GGATTGGTGGATCAGGAATGGATGTAAGGAGCAAAGCCAGGACTCTATCTGGTCCTGTTGATGATCCTT
 CAAAGCTTCCCAAATGGAATTATGATGGTTCTAGCACAGGTCAAGCTCCTGGAGAAGACAGTGAAGTGA
 TCCTATATCCTCAAGCAATTTTCAAGGATCCATTGAGGAGGGGCAACAATATCCTGGTCATCTGTGATT
 GTTACACCCAGCTGGTGAACCAATTCCAACAAACAAGAGGCACAATGCTGCTAAAAATTTAGCAACC
 CTGATGTTGTTGTTGAGGAACCATGGTATGGTCTTGAGCAAGAATACACCTTGCTACAAAAGGAAATTA

ACTGGCCTCTTGGATGGCCTATTGGTGGTTTTCTGGACCACAGGGACCATACTACTGTGGAATTGGAT
 CTGGAAAGGCTTTTGGACGCGATATTGTTGATGCTCATTACAAGGCATGTATCTATGCCGGGATTAAACA
 TTAGTGGTATCAACGGAGAAGTGATGCCCTGGACAGTGGGAATTTCAAGTTGGTCCCTTCAGTTGGCATTG
 CATCAGGTGACGAGTTGTGGGCAGCTCGTTACATTCTCGAGAGGATTACAGAGATTGCTGGAGTTGTGCG
 TGTCAATTCGACCCCAAACCTATTCCGGGCGACTGGAATGGTGCAGGAGCGCATACAAATTACAGTACCA
 AGTCCATGAGGAATGAGGGAGGGTATGAAGTTATCAAGAAGGCTATTGAGAAGCTTGGACTTAGGCACA
 AGGAGCACATTGCAGCATATGGTGAAGGCAATGAACGTCGTCTCACTGGAAGACACGAAACAGCTGACA
 TCAACACGTTCAAATGGGGTGTGCAAAATCGTGGTGCATCCATTCTGTGGGAAGAGACACGGAGAAGG
 AAGGCAAGGGATACTTTGAGGACAGGAGGCCTGCATCGAACATGGATCCATACATCGTGACCTCTATGA
 TCGCGGAGACTACCCTCCTGTGGAACCTTGAACGCGTATGGGATGAATATTCTCGGGTGCAACATATG
 GAGAAAGAATTGAATTTCTTAACAGCCCTTTCCTCACATGTCTTAAAGAGAGTTATGTAGCTAGTAATT
 TTGATATATTATGTTGTTTCTAAGTTTCAATTTGTATTGTACTCAGCAAGCCTGAGTTCATTGCCAAA
 ATGATTTGGCAATGTTGTTAAAAATAAGAGTTTAAATCTTATTAATAACAATATGGAAGGGTTTAACTT

Sec. con núm. de ident.: 30 (GS3)

GATCTAATAGAGAATTTCAATTTCAAGAAGTTATCATCATGTCTCTGCTTTTCAGATCTTATCAACCTCA
 ATCTCTCAGATGATACTCAGAAGATCATTGCTGAATACATATGGATTGGTGGATCAGGCATGGACATGA
 GGAGCAAAGCCAGGACTCTCCCTGGTCCAGTTACTAGTCTGCGAGAACTACCCAAATGGAACCTATGATG
 GATCAAGCACAGGTCAAGCTCCTGGAGAAGACAGTGAAGTGATCATATACCCACAAGCAATCTTCAAGG
 ATCCATTGAGGAGAGGCAACAATATCTTGGTCATGTGTGATGCCCTATACTCCTGCTGGTGAGCCCATCC
 CAACAAACAAGAGGCACGCCGCTGCCAAGGTCTTCTGCCACCCTGATGTGGCTGCTGAGGAACTTGGT
 ATGGTATTGAACAAGAATATACCTTGCTGCAAAAGGAGGTCAACTGGCCTCTTGGATGGCCCATTGGCG
 GTTTTCTGGACCCAGGGACCATACTACTGTGGAACCTGGAGCTGACAAGGCCCTTGGACGTGACATTG
 TGGACGCCCATTACAAGGCATGTCTCTATGCTGGGATTAAATATCAGCCGAATCAATGGTGAAGTCATGC
 CGGGACAGTGGGAATTTCAAGTGGGACCTTCTGTTGGCATCTCAGCCGGTGATGAAGTGTGGGTAGCTC
 GTTACATTCTAGAGAGGATTGCAGAGATTGCTGGGGTGGTGTGTCATTGACCCCAAGCCTATTCCGG
 GCGACTGGAACGCGCAGGTGCTCACACAAATTACAGCACCAAGTCGATGAGGGAAGACGGAGGCTATA
 AAATAATCTTGAAGGCTATTGAGAAGCTTGGCCTGAAGCACAAGAACACATTGCTGCATATGTTGAAG
 GCAATGAGCGTGTCTCACTGGAAGCACGAAACAGCCAACATCAACACCTTCAAATGGGGGGTTGCAA
 ACCGTGGTGCATCTGTCCGTGTTGGAAGAGACACAGAGAAGGCAGGCAAGGGATACTTTGAGGACAGAA
 GGCCAGCCTCAAATATGGACCCATACGTCGTTACCTCCATGATCGCAGAAACCACCATCATCGGTTAAC
 CTTGAAGACATTTTACTATGGATGGCTCGGGGGATCGCTTGTCTTGGTTTGACAAATTTGGGATAGGA
 GAAAAGATTGAATTGTGAAACGACCCCTTCGACTTCACCTGTGTTAATTTTATGTTATAGGGGTAGATT
 GTCTCTGTTATTTTCTGTTTATTTGCCAGTTGAATGTATTTTCATACAGCAAGGCCCTTATACATTG
 TCTATGATTTGGCAATGCTGTGTTACAAAACAATGTTATTCTTATTAATAACAAGATAATGAAAGGGT
 TTGATTCTATTGCTCATTGCACT

Sec. con núm. de ident.: 31 (gen de asparaginasa de E. coli)

5 ATGGGCAAAGCAGTCATTGCAATTCATGGTGGCGCAGGTGCAATTAGCCGCGCGCAGATGAGTCTGCAA
 C
 AGGAATTACGCTACATCGAGGCGTTGTCTGCCATTGTTGAAACCGGGCAGAAAATGCTGGAAGCGGGCG
 A
 10 AAGTGGCTGGATGTGGTGACGGAAGCGGTGCGTCTGCTGGAAGAGTGTCCACTGTTTAAACGCCGGAAT
 T
 GGCGCCGTCTTTACGCGTGATGAAACGCATGAACGGACGCCCTGTGTGATGGATGGTAACACCCCTGAAA
 G
 15 CCGGTGCGGTGGCGGGCGTTAGTCATCTGCGTAATCCGGTTCCTTGCCGCCCGGCTGGTGATGGAGTAAA
 G
 CCCGCATGTGATGATGATTGGCGAAGGGGCAGAAAATTTGCGTTTGCTCATGGCATGGAGCGCGTCTC
 A
 20 CCGGAGATTTTCTCCACGCCCTTTGCGTTATGAACAATAATGGCAGCGCGCGAGGAAGGGGCAACAGTC
 C
 TCGACCATAGCGGTGCGCCACTGGATGAAAAACAGAAAATGGGCACCGTGGGGGCCGTGGCGTTGGATT
 T
 25 AGACGGCAATCTGGCGGCAGCCACGTCCACGGGCGGAATGACCAATAAATTACCCGGACGAGTTGGCGA
 T
 AGCCCCCTTAGTGGGTGCCGGATGCTACGCCAATAACGCCAGTGTGGCGGTTTCTTGTACCGGCACGGGC
 G
 30 AAGTCTTCATCCGCGCGCTGGCGGCATATGACATCGCCGCGTTAATGGATTACGGCGGATTAAAGTCTCG
 C
 GGAAGCCTGCGAGCGGGTAGTAATGGAAAACTCCCTGCGCTTGGCGGTAGCGGTGGCTTAATCGCTAT
 C
 35 GACCATGAAGGGAATGTGCGCTACCGTTTAAACACCGAAGGAATGTATCGCGCCTGGGGCTACGCAGGC
 G
 ATACGCCAACCAACCGGTATCTACCGTGAAAAAGGGGACACCGTTGCCACACAGTGA

Ssec. con núm. de ident.: 32 (gen de asparaginasa de Agrobacterium)

5 ATGACGAAGATCGCACTGGCCATTACGGTGGTTGCGGCGTGATGCCGGAAGACAGCATGACGGCGGGCG
G
AATGGGCGCGGGCCCGTGAAGATCTGGCAGCAGCGCTGCGGGCCGGTTATGGCGTGCTGAAGGCGGGCG
G
10 AACAGCGCTCGAGGCCGTTGAGGCAGCGGTCGTGTCATGGAGGACAGCCCGCACTTCAATGCGGGACA
C
GGGGCGGCGCTGAACGAAAACGGCATTACGSAACTCGATGCTCGATCATGGACGGGGCCACGCTTTGCG
G
15 CAGGCGCGATCAGCGCATCCCGCGCCATTTCGCAATCCTGTGAAGGCGGCCCGCGCACTGATGGTGGATG
A
ACGGGCGGTCTATCTCACAGGAGAGGCTGCGGATCGCTTTGCCACGGAGAAGGGTCTCGCCACCGAACC
20 T
CAGTCCTATTTACCACGCAAAAACGCCTCGAGGCACTGGCAGCGATGAAGCGCCATGCAGCCACAGGC
A
CGGAAGCGACGGAAAACGAAAAGCACGGAACCGTCGGCGCGGTGGCGCTCGATGCGGCGGGGCACCTTG
25 C
TGCGGCCACCTCAACCGGCGGCTATACCAACAAGCCGGATGGCCGGGTGGGCGACAGCCCGTGATCGG
C
GCCGGCACCTATGCGCGGACGGCGCCTGCGCGGTCTCCGGCACCGGCAAGGGTGAGTTTTTCATCCGT
30 T
ATGTCGTGCGCCACGAGATCGCGTCACGCGTCGCCTATCTCGGACAGGATCTGGAACCGCCGCGGCA
A
35 TCTCGTGACAGGGACCTGGCTCCCTATGATATCGGTGCCGCTCTGGTCGCCATTGATGCGAAGGGCGG
C
ATTACCGCTCCGTACAATACACAGGCATGTTCCGCGGCTGGGTTACGGCGTCTGGAGAGGCGTTTGTG
G
40 CCACTCACGCTGAAGCTTACGCCGTCAAATTATAA

Sec. con núm. de ident.: 33 (gen de asparaginasa de cebada)

5 ATGGCGCGCTGGGCCATTGCCATCCACGGCGGCGGGCGTGGACCCGAACCTGCCGAGCACAGGCAG
G
AGGAGGCCAAGCGGGTGTGGCCCGGTGCCTGCAGGTGGGCGTGCACCTGCTGCGCGCCGGCGCCACCG
C
10 GCTGGACGTGTGGAGGCCGTGGTGCGGGAGCTGGAGACGGACCCCTGCTTCAACTCGGGCCGCGGCTC
C
GCGCTCACC CGCCGGCACCGTCGAGATGGAGGCCAGCATCATGGACGGCCGCGCCGCGCTGCGGC
G
15 CCGTCTCCGGCGTCTCCACCGTTAAAAACCCCGTCTCCCTCGCCCGCGCGTCATGGACAGGTCCCCG
A
CTCCTACCTCGCTTCGACGGCGCCGAGGATTTGCCCCGCGAGCAGGGTCTTGAGGTTGTGGACAACAG
C
20 TACTTCATCACGGAGGAGAACGTGGGCATGCTCAAGCTCGCCAAGGAGGCCAACAGCATCCTCTTCGAC
T
ACCGCATCCCGCTCGCCGGGGCCGACACCTGCAGCGCGCAGGCGGCGGCGACCGAGAACCACAACAACA
A
25 CGGCATGGTGATGAACGGGCTGCCCATCAGCATCTACGCGCCGGAGACGGTGGGGTGCGCCGTGGTGGA
C
TGTAACGGCTTCACGGCGGGCGCCACCTCCACGGGCGGGCTCATGAACAAGATGACGGGCGGCATCGGC
G
ACTCGCCGCTCATCGGCGCTGGCACCTACGCGTGCGGGCACTGCGCCGTGTGCTGCACGGGCGAGGGCG
A
35 GGCCATCATCCGCTCCACGCTGGCGGGGACGTGGCCCGGTGATGGAATCAAGGGGCTGCCTTCTGCA
G
GAGGCCGTGGACTTCTGCGTCAAGGAACGGCTCGACGAAGGGTTGCGCGGGCTCATCGCCGTGTCCGGC
A
40 CCGGCGAGGTGGCATAACGGTTCAACTGCACCGGCATGTTTCAAGGCTGCGCCACCGAGGACGGATTCA
T
GGAGGTGCGCATCTGGGAGTGA

Sec. con núm. de ident.: 34 (gen Ast de trigo)

CGCCGCTCCGTTCCGCCCCGTÀCCTTACCCCTCCCCACCACCCGCGCCTGCGTCGCCGCCGGCGCCGCTCG
 CCGGCGACCGTCCCTCCTCGTCGGGCGCGCCGCGCCCCCGCCCCGTTTCGTCCGCGGCGTCTGGCCAACG
 AGGCGTGAGGTCCCGCCGGCCGCCACCATGTGCGGCATCCTCGCCGTCTTCGGCGTCGGCGACGTCTCC
 CTCGCCAAGCGTCCCGCATCATCGAGCTCTCCCGCCGATTACGGCACAGAGGCCCTGATTGGAGTGGT
 ATACACAGCTTTGAGGATTGCTATCTTGACACACCAGCGGTTGGCTATTGTTGATCCACATCTGGAGAC
 CAGCCATTGTACAACGAGGACAAAACAGTTGTTGTGACGGTGAATGGAGAGATCTATAACCATGAAGAA
 CTGAAAGCTAAGCTAAAATCTCATCAATTCCAAACTGGTAGTGATTGTGAAGTTATTGCTCACCTATAT
 GAGGAATACGGGGAGGAATTTGTGGATATGCTGGATGGCATGTTCTCGTTTGTGCTTCTTGACACACGT
 GATAAAAGCTTCATTGCTGCCCCGTGATGCTATTGGCATCTGTCCTTTGTACATGGGCTGGGGTCTTGAT
 GGGTCAGTTTGGTTTTCTTCAGAGATGAAGGCATTGAGTGATGATTGCGAGCGCTTCATATCGTTCCCC
 CCTGGACACTTGTACTCAAGCAAAACAGGTGGCCTAAGGAGGTGGTACAACCCCCCATGGTTTTTCAGAA
 AGCATTCCCTCAGCCCCCTATGATCCTCTCCTCATCCGAGAGAGTTTTGAGAAGGCTGTTATTAAGAGG
 CTAATGACTGATGTGCCATTTGGTGTTCTCTTGCTGCTGGTGGGCTTGACTCTTCTTTGGTGGCTTCTGTT
 GTTTCACGCTACTTGGCAGAAACAAAAGTTGCTAGGCAGTGGGGAAACAACTGCACACCTTTTGCATC
 GGTTTGAAGGGTCTCCTGATCTTAAAGCTGCTAAGGAAGTTGCTGACTACCTTGGCACAGTCCATCAT
 GAATTACACTTTACAGTGCAGGAGGGCATTGATGCTTTTGGGAAGAAGTTATATATCACATCGAGACGTA
 TGACGTAACGACCATTAGAGCAAGTACCCCGATGTTTCTAATGTCTCGGAAAATCAAATCGTTGGGTGT
 GAAGATGGTTCTTTTCGGGTGAAGGTTCGGATGAAATATTTGGTGGTTATCTTTATTTTCATAAGGCACC
 AAACAAAAGGAACTCCATGAGGAAACATGTCGGAAGATAAAAGCTCTCCATTTATATGATTGTTTGAG
 AGCGAACAAAGCAACTTCTGCCTGGGGTCTCGAGGCTCGTGTTCCATTCCCTCGACAAAAACTTCATCAA
 TGTAGCAATGGACCTGGATCCGGAATGTAAGATGATAAGGCGTGATCTTGGCCGGATCGAGAAATGGGT
 CCTGCGTAATGCATTTGATGATGAGAAGAAGCCCTATTTACCCAAGCACATTCTTTACAGGCAAAAAGA
 ACAGTTCAGCGATGGTGTTGGGTACAGTTGGATTGATGGATTGAAGGACCATGCTAATGCACATGTGTC
 AGATTCCATGATGACGAACGCCAGCTTTGTTTACCTGAAAACACACCCACAACAAAAGAAGCCTACTA
 TTATAGGACAGTATTTGAGAAGTTTTATCCCAAGAATGCTGCTAGGCTAACGGTGCCAGGAGGTCCAG
 CGTTGCATGCAGCACCGCGAAAGCTGTTGAATGGGACGCGCCTGGTCCAAGCTCCTCGACCCATCTGG

CCGTGCTGCTCTCGGTGTGCATGACGCGGCATATGAAGAAGAAAAGGCTCCTGCGTTGGCCGATCATGT
 CTTCCGTCCACCAGCCCCACGGGGAGAGCATCCTAGTCGAAACTGGTGTTCAGCAGCAGCTGTTTAACT
 TTCCATTCCATGGTTTCATAAAATGCTTGAGAAAATGTTGTGCGTTAGTTCAATTCAGCGTTGCAACT
 TGTCCGTAGCTTCAATCATTAGTGTAGAAATTCCTGTGCACCATTTTCCTTGATGCTTGCTGGTATGT
 CATGCTTTTCGCATGTATGTACTAAGTTTATGTGGTGAGCAGTGCATGGTAAATATTTACCATGGTTG
 TACATCCGAATTGCTCAAAGTCTGGGTGCAACCTGGAAAAGTTTCATTAATAAACCCCAAGGTGT

Sec. con núm. de ident.: 35 (gen Ast de trigo)

TACGACAACCCACACGTCCGGGACTGGAGCACGAGGACACGGACATGGACTGACCCCGTAGAAATTCCC
 ATCCTCTTTTCAAGACACAGAGAGAGATCTTCTAGCTACATACTGTTGCCGTGATCCAGCGAAAATGT
 GCGGCATACTGGCGGTGCTGGGCTGCGCTGATGACACCCAGGGGAAGAGAGTGGCGGTGCTCGAGCTCT
 CGCGCAGGCTCAAGCACCGCGGCCCGACTGGAGCGGCATGCACCAGGTTGGCGACTGCTACCTCTCCC
 ACCAGCGCCTCGCCATCATCGACCCTGCTCTGGCGACCGAGCGCTCTACAACGAGGACAAGTCCATCG
 TCGTCACAGTGAATGGAGAGATCTACAACCATGAACAGCTCCGGGCGCAGCTCTCCTCCACACGTTCA
 GGACAGGCAGCGACTGCGAGGTTCATCGCACCTGTACGAGGAGCATGGGGAGAATTCATCGACATGC
 TGGATGGTGTCTTCTCCTTCGTCTTGCTCGATACACGCGACAACAGCTTCATTGCTGCACGTGATGCCA
 TTGGCGTCACACCCCTCTATATTGGCTGGGGAATTGATGGGTGCGGTGTGGATATCATCAGAGATGAAGG
 GCCTGAATGATGATTGTGAGCACTTTGAGATCTTTCTCCTCGCCATCTCTACTCCAGCAAGCAGGGAG
 GCTTCAAGAGATGGTACAACCCACCTTGCTTCTCGAGGTCATTCTTCAGTGCCATATGACCCACTTG
 CTCTCAGGAAGGCTTTGAAAAGGCTGTATCAAGAGGCTTATGACGGACGTTCCATTGCGGTGTTCTAC
 TCTCTGGTGGCCTTGACTCATCATGTTGTCAGCCGTTACAGTTCGTACCTGGCAGGAACAAAGGCTG
 CAAAGCGCTGGGGGACTAAGCTTCACTCTTTTTGTGTGCGGACTTGAGGGGTACCTGATCTGAAGGCTG
 CAAAGGAGGTAGCCAATTACCTGGGCACCATGCACCATGAGTTACCTTCAGTTTCAGGACGGCATTG
 ATGCAATTGAGGATGTGATTTATCACACCGAATCATATGATGTGACGACAATCAGGGCAAGCAGCCAA
 TGTTCCTGATGTACGCAAGATCAAGTCACTTGGGGTCAAGATGGTCATCTCTGGTGAGGGTTCCGATG
 AGATTTTCGGAGGGTACCTCTACTTCCACAAGGCACCCAAAGAGAGGAGCTCCACCGTGAGACATGTC
 AAAAGATCAAAGCTCTGCATCAGTACGATTGCTTGAGGGCCAAACAAGGCAACATCTGCATGGGGCCTCG
 AAGCACGTGTGCCATTCTTGACAAGGAGTTTATCAATGAGGCAATGAGCATTGATCCTGAGTGGAAGA
 TGATCCGGCCTGATCTTGGAAGAATTGAGAAATGGGTGCTGAGGAAAGCATTGATGACGAGGAGCAAC
 CATTCTGCGGAAGCACATTCTGTACAGGCAGAAAGAGCAGTTTCAAGTATGGTGTGGCTACAGCTGGA
 TTGATGGCCTAAAGGCTCACGCAGAATCAAATGTGACAGATAAGATGATGTCAAATGCAAAGTTTCATCT
 ACCCACACAACACCCCGACTACAAAAGAGGGCTACTGTTACAGGATGATATTTGAGAGGTTCTTCCCCC
 AGAACTCGGCGATCCTGACGGTGCCAGGTGGGCCAAGCGTTGCATGCAGCACGGCGAAGGCGGTAGAGT
 GGGATGCCCAGTGGTCAGGGAACCTGGATCCCTCAGGGAGAGCAGCACTTGGAGTCCATCTCTCGGCCT
 ATGAACAGGAGCATCTCCAGCAACCATCATGGCAGGAACAGCAAGAAGCCGAGGATGATCGAGGTTG
 CGGCGCCTGGTGTGCAATTGAGAGTTGATGGTGTCTGTCTCTGCTTGCCGTTTCTGATAAGAAATAAG
 ATGTACCTGGTCTTGCCATTAGAGTGGTGACACCTAAGGTTTGAGTGAAGATTGTGCATTAATGTTTC
 TATTGTTCTTATGACGATTGTGAATCCTTTTCTGGCAACTTCCATCAAAACATTATTACATGATGGTTA
 TTATTTGACATAAACGGCTACATCTACCC

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto de tubérculo procesado con calor obtenido a partir de una planta de papa en la que el nivel de la biosíntesis de asparagina se disminuye mediante la reducción de la expresión de un gen de asparagina sintetasa I codificada por la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el producto de tubérculo procesado con calor tiene al menos una concentración de acrilamida 70 % inferior que un producto de tubérculo procesado con calor que se elabora a partir del tejido correspondiente de una planta de lo contrario idéntica no transgénica.
- 10 2. El producto de tubérculo procesado con calor de la reivindicación 1, en donde el producto de tubérculo de la planta que porta el tubérculo es una papa frita a la francesa, papa frita, crujiente, papa o papa asada.
- 15 3. El producto de tubérculo procesado con calor de la reivindicación 1, en donde el producto de tubérculo tiene una concentración de acrilamida que es inferior que la concentración de acrilamida en el producto de tubérculo procesado con calor que se elabora a partir de tejido correspondiente de una planta de lo contrario idéntica no transgénica por al menos 80%.
- 20 4. El producto de tubérculo procesado con calor de la reivindicación 1, en donde la planta de papa comprende un casete de expresión que comprende un primer promotor específico de tubérculo y ya sea un segundo promotor específico de tubérculo o un terminador, y en donde el primer y opcionalmente segundo promotor se sitúan en la orientación convergente, que es capaz de reducir los niveles del gen de la asparagina sintetasa I codificada por la sec. con núm. de ident.: 1.
- 25 5. El producto procesado con calor de la reivindicación 4, en donde el promotor es un promotor de (i) un gen sintasa de almidón unido a gránulo de papa, (ii) un gen de la ADP glucosa pirofosforilasa de papa, (iii) un gen patatina de papa, o (iv) una gen flavonoide monooxigenasa de papa.
- 30 6. El producto de tubérculo procesado con calor de la reivindicación 1, en donde la planta expresa además un polinucleótido que comprende un fragmento del gen R1 y un fragmento de gen fosforilasa-L en orientación antisentido.
- 35 7. El producto de tubérculo procesado con calor de la reivindicación 1, en donde, cuando el producto es una fritada al horno, papa frita o frituras de papa, la concentración de acrilamida en el producto de tubérculo procesado con calor obtenido a partir de una planta que porta tubérculo que expresa el polinucleótido en el tubérculo se selecciona del grupo que consiste de 1-20 partes por billón, 20-40 ppb, 40-60 ppb, 60-80 ppb; 80-100 ppb y 100-120 ppb de acrilamida.

Figura 1

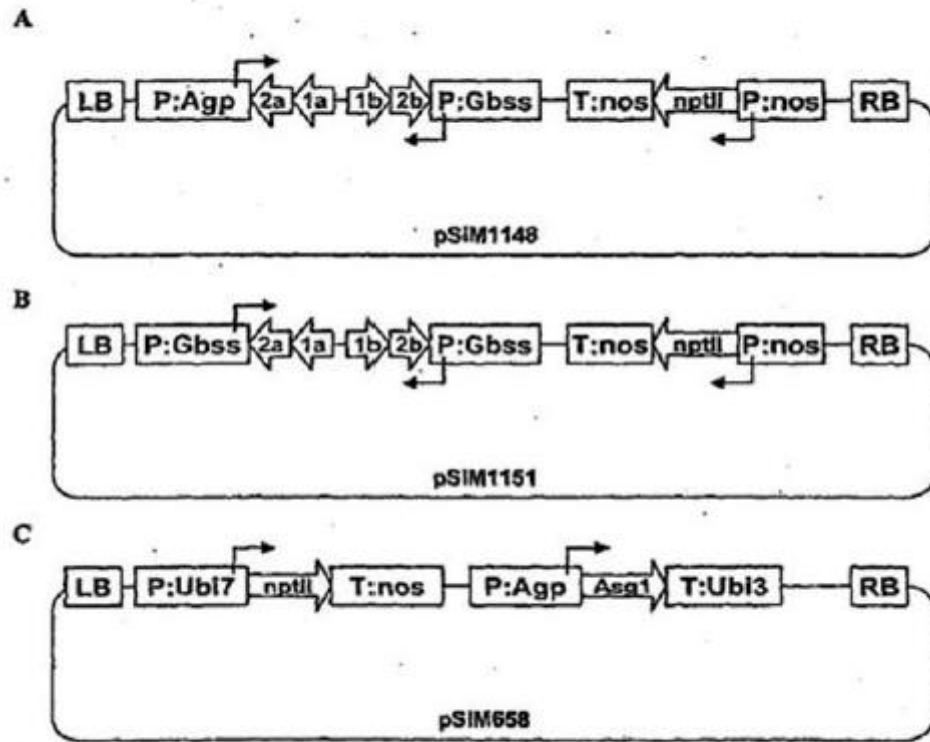


Figura 2

