

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 130**

51 Int. Cl.:

**C07K 4/10** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**A01H 3/00** (2006.01)  
**C07K 14/415** (2006.01)  
**C12N 5/14** (2006.01)  
**C12N 15/29** (2006.01)  
**A01N 61/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2008 E 08741735 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2132218**

54 Título: **Transferasas, epimerasas, polinucleótidos que las codifican y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**08.03.2007 NZ 55370507**  
**06.07.2007 NZ 55638907**

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

**14.08.2015**

73 Titular/es:

**THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND  
FOOD RESEARCH LIMITED (100.0%)**  
**120 Mt Albert Road**  
**Mt Albert, Auckland, NZ**

72 Inventor/es:

**LAING, WILLIAM ALISTER y**  
**BULLEY, SEAN MICHAEL WINSLEY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 543 130 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

Transferasas, epimerasas, polinucleótidos que las codifican y usos de los mismos.

## Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos para producir plantas con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa modificada y/o actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa modificada y/o contenido en ácido ascórbico modificado.

## Antecedentes

El ascorbato es el antioxidante soluble más abundante en las plantas y es también un nutriente esencial para los seres humanos y algunos otros animales. El ascorbato contribuye de manera significativa al aporte total de "eliminadores de radicales libres" o "metabolitos antioxidantes" en la dieta humana. Ahora muestras convincentes demuestran que tales metabolitos bien por separado o en asociación, benefician a la salud y al bienestar, actuando como agentes anticancerígenos y protegiendo contra cardiopatía coronaria.

Casi todo el aporte dietético de ascorbato en los seres humanos procede de productos vegetales. El contenido en ascorbato de los tejidos vegetales, sin embargo, es notablemente variable. Aunque el contenido en ascorbato de la hoja es generalmente alto y relativamente uniforme en plantas herbáceas y leñosas, se encuentra una variabilidad enorme e inexplicable en el contenido en ascorbato en tejidos de plantas comestibles no verdes. Por ejemplo, en frutas, los niveles varían desde hasta 30 mg gFW<sup>-1</sup> (gramos de Peso Fresco, por sus siglas en inglés) AsA en el camu camu de *Mirrciaria dubia*, a menos de 3 µg gFW<sup>-1</sup> AsA en el níspero de *Mespilus germanica* (Rodríguez et al. 1.992, J Chromatogr Sci, 30: 433-437). Se ha indicado un intervalo de valores para ascorbato en kiwis (Ferguson, A. R., Nomenclatura botánica: *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa* y *Actinidia setosa*. Kiwifruit: science and management, ed. I. J. Warrington y G. C. Weston. 1.990, Palmerston North; Nueva Zelanda: Sociedad de Nueva Zelanda para las Ciencias Hortícolas. 576. Beever, D. J. y G. Hopkirk, Fruit development and fruit physiology. Kiwifruit: science and management, ed. I. J. Warrington y G. C. Weston. 1.990, Palmerston North; Nueva Zelanda: Sociedad de Nueva Zelanda para las Ciencias Hortícolas. 576.) Contenido en ascorbato de frutas de diferente variedad de vid para *A. deliciosa*, 30- 400 mg/100 g (Ferguson, A. R., 1.991 Acta Hort. 290: pág. 603-656, Spano, D., et al., 1.997 Acta Hort., 444: pág. 501-506.) mientras que para cultivar 'Hayward' el intervalo indicado es 80-120 mg/100 g (Beever, D. J. y G. Hopkirk, Fruit development and fruit physiology. Kiwifruit: science and management, ed. I. J. Warrington y G. C. Weston. 1.990, Palmerston North; Nueva Zelanda: Sociedad de Nueva Zelanda para las Ciencias Hortícolas. 576.). Se indican mayores concentraciones de ascorbato en fruta de, *A. arguta*, *A. chinensis* (Muggleston, S., et al., Orchardist, 1.998. 71 (8): pág. 38-40, Chen, Q. y Q. Chen, Crop Genetic Resources, 1.998 (2): pág. 3, Coggiatti, S., 1.971 Ital Agr, Oct., 108 (10): pág. 935-941) *A. chrysantha* y *A. polygama* con niveles muy altos en *A. eriantha* y *A. latifolia* (>1% de peso fresco) (Ferguson 1.991 Acta Hort. 290: pág. 603-656 y *A. kolomikta* (Kola, J. y J. Pavelka, 1.988 Nahrung., 32 (5): pág. 513-515).

Se han propuesto tres rutas de biosíntesis de ácido ascórbico en plantas, una por L-Gal (Wheeler et al., 1.998, *Nature* 393, 365-369), otra de mioinositol (Loewus & Kelly, 1.961, *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 483-493; Lorence et al., (2.004) *Plant Physiol.* 134, 1.200-1.205) y una tercera por ácido Galacturónico (Agius et al., 2.003, *Nat Biotechnol* 21, 177-81). La ruta L-Gal transcurre por L-Gal a galactono-1,4-lactona y por lo tanto a ascorbato (Wheeler et al., 1.998, *Nature* 393, 365-369).

Hasta la fecha, se han identificado todos los genes que codifican enzimas, y sus actividades enzimáticas asociadas, para la ruta L-Galactosa y se ha caracterizado al menos parcialmente, excepto para uno, una supuesta enzima que convierte GDP-L-Galactosa en L-Galactosa-1-Fosfato.

Los genes y actividades enzimáticas caracterizados incluyen la GDP-D-Manosa Pirofosforilasa (Conklin, 1.998; Conklin et al., 1.999; Keller et al., 1.999), la GDP-D-Manosa 3',5'-Epimerasa (Wolucka et al., 2.001; Wolucka y Van Montagu, 2.003; Watanabe et al., 2.006), la L-Galactosa- 1-P Fosfatasa (Laing et al., 2.004; Conklin et al., 2.006), L-Galactosa Deshidrogenasa (Wheeler et al., 1.998; Gatzek et al., 2.002; Laing et al., 2.004) y L-Galactono-1,4-lactona Deshidrogenasa (Imai et al., 1.998; Bartoli. et al., 2.005).

La enzima faltante, que (para el mayor conocimiento del solicitante) no se ha indicado que se haya ensayado como una actividad de enzima extraída o purificada o como un gen expresado, cataliza la segunda etapa comprometida para la biosíntesis de ácido ascórbico.

Se identificó el mutante *VTC2* de *Arabidopsis thaliana* en una investigación de resistencia al ozono y también se caracterizó que mostraba niveles de ácido ascórbico especialmente bajos (Conklin et al., 2.000). Se clonó el gen mutado usando una propuesta basada en mapas (Jander et al., 2.002) y se identificó como un gen (At4g26850) que codifica una nueva proteína. Sin embargo, se indicó que este gen no mostraba homología con otros genes en *Arabidopsis* excepto para el At5g55120 no caracterizado de manera similar y otros genes no caracterizados de otras especies. Se indicó que la proteína codificada era lo más similar a la proteína MC015.7 de *Arabidopsis*, la proteína C10F3.4 de *Caenorhabditis elegans* y la proteína CG3552 de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), ninguna de las cuales ha demostrado función.

Aunque se indicó que el gen de *Arabidopsis* (At Ag26850) complementaba cuatro alelos del mutante VTC2, no se proporcionaron detalles (Jander et al., 2.002). Además los autores comentaron que “aunque tenemos un fenotipo asociado a mutaciones en VTC2, la rutas reguladoras o biosintéticas que conducen a los niveles reducidos de vitamina C en estos mutantes permanecen sin descubrir”.

5 La identificación de genes que codifican enzimas en la ruta biosintética para la producción de ascorbato proporciona la oportunidad de propuestas basadas en genes para la manipulación del contenido en ascorbato de las plantas.

Sin embargo, aunque se han generado plantas transgénicas, o mutantes, con expresión cambiada de diferentes genes en la ruta de la L-Galactosa para muchas de las etapas de la ruta de la L-galactosa de la biosíntesis de ascorbato y la expresión disminuida de los genes (y niveles enzimáticos) puede dar como resultado ascorbato reducido, la sobreexpresión no ha dado como resultado ascorbato aumentado en las hojas (Ishikawa et al., 2.006 y Conklin et al., 2.006).

10 Es un objeto de la invención proporcionar composiciones y métodos mejorados para modular la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa (también conocida como GDP-L-Galactosa fosforilasa) y/o la actividad de la GDP-D-Manosa Epimerasa y/o contenido en ascorbato o en las plantas o al menos proporcionar a la sociedad una elección útil.

**Sumario de la invención.**

En la presente memoria se describe un método para producir una célula vegetal o planta con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa aumentada (también conocida como GDP-L-Galactosa fosforilasa), comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11 o una variante del polipéptido, en el que la variante presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

En un caso la variante comprende la secuencia de aminoácidos: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12).

En un caso más la variante comprende la secuencia de aminoácidos: GYNLGLAFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13).

En un caso más la variante comprende las secuencias de las dos: SEC ID N° 12 y SEC ID N° 13.

25 En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una de la SEC ID N° 1 a 11.

En un caso más el polinucleótido codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.

30 En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

En un caso más el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En un caso más el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

35 En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

En un caso más el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

40 En un caso más el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

En un caso más el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

45 En un caso más la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10.

En un caso más el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10.

Se describe también un método para producir una célula vegetal o planta con actividad de la GDP-L-Galactosa

## ES 2 543 130 T3

Guaniltransferasa aumentada, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de la SEC ID N° 14 a 24 o una variante de las mismas, en el que la variante codifica un polipéptido que presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

- 5 En un caso la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para una cualquiera de las secuencias de la SEC ID N° 14 a 24.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende una cualquiera de las secuencias de la SEC ID N° 14 a 24.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 14.
- 10 En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 14.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.
- 15 En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 19.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 19.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.
- 20 En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 20.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 20.
- 25 En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.
- 30 En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 21.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 21.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 21.
- 35 En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 21.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 22.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 22.
- 40 En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 22.
- En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 22.
- En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 23.
- 45 En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 23.

En un caso más la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 23.

En un caso más el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 23.

- 5 Preferiblemente, la planta o célula vegetal con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa aumentada producida por los métodos anteriores también presenta contenido en ascorbato aumentado. La invención proporciona un método para producir una célula vegetal o planta con ascorbato aumentado, relativo a una planta de control adecuada, no incluyendo una planta con una mutación que da como resultado ascorbato disminuido, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11 o una variante del polipéptido, en el que la variante presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y donde la variante comprende al menos una de:

a) la secuencia de aminoácidos: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12);

b) la secuencia de aminoácidos: GYNLGFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13) y

- 15 c) una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.

En una realización más, la variante comprende las secuencias de ambas, SEC ID N° 12 y SEC ID N° 13.

En una realización más, el polinucleótido codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.

- 20 En una realización más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

- 25 En una realización más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En una realización más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

- 30 En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

En una realización más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

- 35 En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

En una realización más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

- 40 En una realización más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10.

En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10.

- 45 También se describe un método que comprende además la transformación de la célula vegetal o planta con un polinucleótido que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35 o una variante del polipéptido, en el que la variante presenta la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa.

En un caso la variante comprende la secuencia de aminoácidos: AADMGGMGFIQSNHNSVI (SEC ID N° 36).

En un caso más, la variante comprende la secuencia de aminoácidos: GTWKGGREKAPAAFCKR (SEC ID N° 37).

- En un caso más, la variante comprende las secuencias de ambas, SEC ID N° 36 y SEC ID N° 37.
- En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35.
- 5 En un caso más, el polinucleótido codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35.
- En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25.
- 10 En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26.
- En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27.
- 15 En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27.
- La transformación con la transferasa y epimerasa puede ser secuencial, en cualquier orden. Alternativamente, la transformación con la epimerasa y transferasa puede ser simultánea. Cuando es simultánea, las secuencias que codifican la epimerasa y transferasa pueden estar en las mismas construcciones o vectores o separados.
- 20 En un aspecto más, la invención proporciona un método para producir una célula vegetal o planta con ascorbato aumentado, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 14 a 24, o una variante de las mismas, en el que la variante codifica un polipéptido que presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.
- 25 En una realización, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 14 a 24.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 14 a 24.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 14 a 24.
- 30 En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 14.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 14.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.
- 35 En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 19.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 19.
- 40 En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 20.
- 45 En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 20.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la

- secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.
- 5 En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 21.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 21.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 21.
- 10 En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 21.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 22.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 22.
- 15 En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 22.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 22.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 23.
- 20 En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 23.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 23.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 23.
- 25 En una realización preferida, el método comprende además la transformación de la célula vegetal o planta con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48, o una variante de las mismas, en el que la variante codifica un polipéptido que presenta la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa.
- 30 En una realización, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias según una cualquiera de SEC ID N° 38 a 48.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 48.
- 35 En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 38.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 38.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.
- 40 En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 39.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 39.
- 45 En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de longitud completa de la SEC ID N° 39.

- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 39.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 40.
- 5 En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 40.
- En una realización más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 40.
- En una realización más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 40.
- 10 La transformación con la transferasa y epimerasa puede ser secuencial, en cualquier orden. Alternativamente, la transformación con la epimerasa y transferasa puede ser simultánea. Cuando es simultánea, las secuencias que codifican la epimerasa y transferasa pueden estar en las mismas construcciones o vectores o separadas.
- También se describe un método para producir una célula vegetal o planta con actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa aumentada, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35, o una variante del polipéptido, en el que la variante tiene la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa.
- 15 En un caso la variante comprende la secuencia de aminoácidos: AADMGGMGFIQSNHSVI (SEC ID N° 36).
- En un caso más la variante comprende la secuencia de aminoácidos: GTWKGGREKAPAAFCKR (SEC ID N° 37).
- En un caso más, la variante comprende las secuencias de ambas, SEC ID N° 36 y SEC ID N° 37.
- 20 En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35.
- En un caso más, el polinucleótido codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35.
- 25 En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25.
- En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26.
- 30 En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 27.
- También se describe un método para producir una célula vegetal o planta con actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa mejorada, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48, o una variante de las mismas, en el que la variante codifica un polipéptido que presenta la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa.
- 35 En un caso, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias según una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48.
- 40 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 48.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 38.
- 45 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 38.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la

- secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.
- 5 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 39.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 39.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 39.
- 10 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 39.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 40.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 40.
- 15 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de longitud completa de la SEC ID N° 40.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 40.
- 20 También se describe un método para producir una célula vegetal o planta con contenido en ascorbato aumentado, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35, o una variante del polipéptido, en el que la variante presenta la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa.
- En un caso, la variante comprende la secuencia de aminoácidos: AADMGGMGFIQSNHSVI (SEC ID N° 36).
- En un caso más, la variante comprende la secuencia de aminoácidos: GTWKGGREKAPAAFCKR (SEC ID N° 37).
- En un caso más, la variante comprende las secuencias de ambas, SEC ID N° 36 y SEC ID N° 37.
- 25 En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35.
- En un caso más, el polinucleótido codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35.
- 30 En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 25.
- En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26.
- 35 En una realización más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26.
- En un caso más, la variante presenta al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 27.
- En un caso más, el polinucleótido de a) codifica codifican polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 27.
- 40 En un caso preferido del método para producir una célula vegetal o planta con contenido en ascorbato aumentado, la célula vegetal o planta se transforma también con un polinucleótido que codifica una GDP-L-Galactosa-Guaniltransferasa.
- 45 La transformación con la epimerasa y transferasa puede ser secuencial, en cualquier orden. Alternativamente, la transformación con la epimerasa y transferasa puede ser simultánea. Cuando es simultánea, las secuencias que codifican la epimerasa y transferasa pueden estar en las mismas construcciones o vectores o separadas.
- Preferiblemente, la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa presenta la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de

SEC ID N° 1 a 11, o una variante del polipéptido, en la que la variante tiene la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

En un caso, la variante comprende la secuencia de aminoácidos: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12).

En un caso más, la variante comprende la secuencia de aminoácidos: GYNLGFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13).

5 En un caso más, la variante comprende las secuencias de ambas, SEC ID N° 12 y SEC ID N° 13.

En un caso más, a la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.

En un caso más, el polinucleótido codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.

10 En un caso más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

En un caso más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

15 En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En un caso más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

20 En un caso más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 8.

En un caso más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 9.

25 En un caso más, la variante presenta al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10.

En un caso más, el polinucleótido de a) codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10.

30 También se describió un método para producir una célula vegetal o planta con contenido en ascorbato aumentado, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48, o una variante de las mismas, en el que la variante codifica un polipéptido que tiene la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa.

En un caso, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 38 a 48.

35 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 48.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 38.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 38.

40 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la

secuencia de SEC ID N° 39.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 39.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 39.

- 5 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 39.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 40.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 40.

- 10 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 40.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 40.

- 15 En un caso preferido del método para producir una célula vegetal o planta con contenido en ascorbato aumentado, la célula vegetal o planta también se transforma con un polinucleótido que codifica una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

La transformación con la epimerasa y transferasa puede ser secuencial, en cualquier orden. Alternativamente, la transformación con la epimerasa y transferasa puede ser simultánea. Cuando es simultánea, las secuencias que codifican la epimerasa y transferasa pueden estar en las mismas construcciones o vectores o separadas.

- 20 Preferiblemente, el polinucleótido que codifica la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa presenta una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 14 a 24, o una variante de las mismas, en el que la variante codifica un polipéptido que presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

En un caso, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para una cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 14 a 24.

- 25 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende una cualquiera de las secuencias de la SEC ID N° 14 a 24.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 14 a 24.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 14.

- 30 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 14.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.

- 35 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 19.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 19.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.

- 40 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.

En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 20.

En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 20.

- 45 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.

- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de SEC ID N° 21.
- 5 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de SEC ID N° 21.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 21.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 21.
- 10 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 22.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 22.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 22.
- 15 En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 22.
- En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de la SEC ID N° 23.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia de la SEC ID N° 23.
- 20 En un caso más, la variante comprende una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 23.
- En un caso más, el polinucleótido de a) comprende la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 23.
- 25 En un aspecto más, la invención proporciona un método para producir una célula vegetal o planta con contenido en ascorbato aumentado, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con:
- a) un polinucleótido que codifica una GDP-D-Manosa epimerasa y
- b) un polinucleótido que codifica una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa;
- en el que el polinucleótido que codifica la GDP-D-Manosa epimerasa comprende al menos uno de (i) la secuencia de aminoácidos: AADMGGMGFIQSNHSVI (SEC ID N° 36); (ii) la secuencia de aminoácidos: GTWKGGREKAPAAFCRK (SEC ID N° 37); (iii) una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencia para la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35 y (iv) la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35 y el polinucleótido que codifica la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa comprende al menos una de (i) la secuencia de aminoácidos: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12); (ii) la secuencia de aminoácidos: GYNLGFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13); (iii) una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11 y (iv) la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.
- 30
- 35
- En un aspecto más la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 7, en el que el polipéptido es una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.
- 40 En una realización, el polipéptido comprende la secuencia AINVSPYEGHVLLIP (SEC ID N° 12).
- En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia GYNLGFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13).
- En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de ambas SEC ID N° 12 y SEC ID N° 13.
- En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad secuencia para la secuencia según una cualquiera de SEC ID N° 1 a 7.
- 45 En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 7.
- En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia

de SEC ID N° 1.

En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N° 1.

En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de SEC ID N° 2.

5 En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de la SEC ID N° 2.

En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de la SEC ID N° 3.

En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de la SEC ID N° 3.

10 En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de SEC ID N° 4.

En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de la SEC ID N° 4.

En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de la SEC ID N° 5.

En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de la SEC ID N° 5.

15 En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de la SEC ID N° 6.

En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de la SEC ID N° 6.

En una realización más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia de la SEC ID N° 7.

20 En una realización más, el polipéptido comprende la secuencia de la SEC ID N° 7.

También se describe un polinucleótido aislado que comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 14 a 20, o una variante de las mismas, en el que la variante codifica una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

25 En un caso, la variante comprende una secuencia con al menos 68% de identidad de secuencia para la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 14 a 20.

En un caso, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de las SEC ID N° 14 a 20.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia según una cualquiera de la SEC ID N° 14 a 20.

30 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 68% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 14.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 14.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 14.

35 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 69% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 15.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 15.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de la SEC ID N° 15.

40 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 66% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 16.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 16.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de la SEC ID N° 16.

En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 69% de identidad de secuencias para la

secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 17.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 17.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 17.

- 5 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 69% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 18.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 18.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 18.

- 10 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 68% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 19.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 19.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 19.

- 15 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 20.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 20.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 20.

- 20 En un aspecto más, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprenden una secuencia con al menos 78% de identidad para una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 7, en la que el polipéptido presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

- 25 En una realización, el polipéptido de variante presenta al menos 78% de identidad de secuencias para una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 7, en el que la variante presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos 78% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

- 30 En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos 78% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.

En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos 78% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3.

- 35 En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos 78% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4.

En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos el 78% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5.

- 40 En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5.

En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos 78% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6.

En una realización más, el polipéptido aislado presenta al menos 78% de identidad de secuencias para la secuencia

de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

En una realización más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 7.

5 También se describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada según una de la SEC ID N° 25 a 27, o una variante de la misma, en el que la variante es una GDP-D-Manosa epimerasa.

En un caso, la variante comprende la secuencia: AADMGGMGFIQSNHSVI (SEC ID N° 36).

En un caso más, la variante comprende la secuencia: GTWKGGREKAPAAFCRK (SEC ID N° 37).

En un caso más, la variante comprende la secuencia de ambas SEC ID N° 36 y SEC ID N° 37.

10 En un caso más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 91% de identidad para la secuencia según una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 27.

En un caso más, el polipéptido comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 27.

En un caso más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 91% de identidad para la secuencia de SEC ID N° 25.

En un caso más, el polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N° 25.

15 En un caso más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 91% de identidad para la secuencia de SEC ID N° 26.

En un caso más, el polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N° 26.

En un caso más, el polipéptido comprende una secuencia con al menos 91% de identidad para la secuencia de SEC ID N° 27.

20 En un caso más, el polipéptido comprende la secuencia de SEC ID N° 27.

También se describe un polinucleótido aislado que comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 40, o una variante de la misma, en el que la variante codifica una GDP-D-Manosa epimerasa.

25 En un caso, la variante comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 40.

En un caso, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa según una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 40.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia según una cualquiera de la SEC ID N° 38 a 40.

30 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 38.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 38.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 38.

35 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 39.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 39.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 39.

40 En un caso más, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de longitud completa de la SEC ID N° 40.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia codificadora de longitud completa dentro de la secuencia de SEC ID N° 40.

En un caso más, el polinucleótido comprende la secuencia de SEC ID N° 40.

También se describe un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 25 a 27, o

una variante de la misma, en el que la variante presenta la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa.

En un caso, el polipéptido de variante presenta al menos 91% de identidad de secuencia para una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de SEC ID N° 25 a 27, en el que la variante presenta la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa.

- 5 En un caso más, el polipéptido aislado presenta al menos 91% de identidad de secuencia para la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 25.

En un caso más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 25.

En un caso más, el polipéptido aislado presenta al menos 91% de identidad de secuencia para la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 26.

- 10 En un caso más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 26.

En un caso más, el polipéptido aislado presenta al menos 91% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 27.

En un caso más, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 27.

También se describe un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la invención.

- 15 También se describe un polinucleótido aislado que comprende:

a) un polinucleótido que comprende un fragmento, de al menos 15 nucleótidos de longitud, de un polinucleótido de la invención;

b) un polinucleótido que comprende un complemento, de al menos 15 nucleótidos de longitud, del polinucleótido de la invención o

- 20 d) un polinucleótido que comprende una secuencia, de al menos 15 nucleótidos de longitud, capaz de hibridar el polinucleótido de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona una construcción genética que comprende al menos un polinucleótido de la invención.

- 25 En un aspecto más, la invención proporciona una construcción de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona una construcción de ARNi que comprende al menos un polinucleótido de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona un vector que comprende una construcción de expresión, construcción genética o construcción de ARNi de la invención.

- 30 En un aspecto más, la invención proporciona una célula huésped que comprende al menos una construcción de expresión o construcción genética de la invención.

En un aspecto más, la invención proporciona una célula huésped genéticamente modificada para expresar al menos un polinucleótido de la invención o al menos un polipéptido de la invención.

- 35 Preferiblemente, la célula huésped está genéticamente modificada para expresar: un polinucleótido que codifica una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y un polinucleótido que codifica una GDP-D-Manosa epimerasa.

También se describe un método para producir un polipéptido de GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, comprendiendo el método cultivar una célula huésped que comprende una construcción de expresión de la invención o una construcción genética de la invención, capaz de expresar un polipéptido de GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

- 40 También se describe un método para producir el producto enzimático de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, comprendiendo el método cultivar una célula huésped que incluye una construcción de expresión de la invención o una construcción genética de la invención, capaz de expresar un polipéptido de GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, en presencia de sustrato enzimático que se puede suministrar a, o puede estar presente de manera natural en la célula huésped.

- 45 También se describe un método para producir un polipéptido de GDP-D-Manosa epimerasa, comprendiendo el método cultivar una célula huésped que comprende una construcción de expresión de la invención o una construcción genética de la invención, capaz de expresar un polipéptido de GDP-D-Manosa epimerasa.

- 5 También se describe un método para producir el producto enzimático de una GDP-D-Manosa epimerasa, comprendiendo el método cultivar una célula huésped que incluye una construcción de expresión de la invención o una construcción genética de la invención, capaz que expresar un polipéptido de GDP-D-Manosa epimerasa, en presencia de sustrato enzimático que se puede suministrar a, o puede estar presente de manera natural en la célula huésped.
- 10 También se describe un método para la biosíntesis de ascorbato que comprende las etapas de cultivar una célula huésped que comprende una construcción de expresión de la invención o la construcción genética de la invención, capaz de expresar una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, en presencia de un precursor de ascorbato que se puede suministrar a, o puede estar presente de manera natural en, la célula huésped.
- 15 Preferiblemente, la célula huésped también comprende una construcción de expresión de la invención capaz de expresar una GDP-D-Manosa epimerasa.
- También se describe un método para la biosíntesis de ascorbato que comprende las etapas de cultivar una célula huésped que comprende una construcción de expresión de la invención o una construcción genética de la invención, capaz de expresar una GDP-D-Manosa epimerasa, en presencia de un precursor de ascorbato que se puede suministrar a, o puede estar presente de manera natural en, la célula huésped.
- 20 Preferiblemente, la célula huésped también comprende una construcción de expresión de la invención capaz de expresar una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.
- Preferiblemente, la célula huésped es una célula vegetal. Preferiblemente, la célula vegetal es parte de una planta.
- En un aspecto más, la invención proporciona una célula vegetal genéticamente modificada para expresar al menos un polinucleótido de la invención, o al menos un polipéptido de la invención.
- En un aspecto más, la invención proporciona una célula vegetal que comprende al menos una construcción de expresión de la invención o al menos una construcción genética de la invención.
- En un aspecto más, la invención proporciona una planta que comprende una célula vegetal de la invención.
- 25 También se describe un método para seleccionar una planta modificada en actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, comprendiendo el método ensayar en una planta la expresión modificada de un polinucleótido de la invención.
- También se describe un método para seleccionar una planta modificada en actividad de la GDP-L-Manosa Guaniltransferasa, comprendiendo el método ensayar en una planta la expresión modificada de un polipéptido de la invención.
- 30 También se describe un método para seleccionar una planta modificada en actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa, comprendiendo el método ensayar en una planta la expresión modificada de un polinucleótido de la invención.
- También se describe un método para seleccionar una planta modificada en actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa, comprendiendo el método ensayar en una planta la expresión modificada de un polipéptido de la invención.
- 35 También se describe un método para seleccionar una planta con contenido en ácido ascórbico modificado; comprendiendo el método ensayar en una planta la expresión modificada de un polinucleótido o polipéptido de la invención.
- 40 En un aspecto más, la invención proporciona una célula vegetal o planta producida por el método de la invención. Preferiblemente, la planta está genéticamente modificada para incluir o expresar un polinucleótido o polipéptido de la invención.
- También se describe una planta seleccionada por el método de la invención.
- 45 También se describe un grupo de plantas seleccionado por el método de la invención. Preferiblemente, el grupo comprende al menos 2, más preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 4, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 9, más preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 11, más preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 13, más preferiblemente al menos 14, más preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 16, más preferiblemente al menos 17, más preferiblemente al menos 18, más preferiblemente al menos 19, más preferiblemente al menos 20 plantas.
- 50 También se describe un método para producir ascorbato, comprendiendo el método extraer ascorbato de una célula vegetal o planta de la invención.

También se describe un método para identificar un compuesto como un candidato para un herbicida, que comprende:

- 5 a) poner en contacto dicho compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11, o una variante de la misma, que presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y
- b) detectar la presencia y/o ausencia de unión entre dicho compuesto y dicho polipéptido; en el que unión indica que dicho compuesto es un candidato a un herbicida.

También se describe un método para identificar un compuesto como candidato a herbicida, que comprende:

- 10 a) poner en contacto dicho compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11, o una variante de la misma, que presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y
- b) evaluar el efecto del compuesto sobre la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa del polipéptido; en el que un aumento de actividad indica que dicho compuesto es un candidato a herbicida.

También se describe un método para identificar un compuesto como un candidato a herbicida que comprende:

- 15 a) poner en contacto dicho compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35, o una variante de la misma, que presenta la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa y
- b) detectar la presencia y/o ausencia de unión entre dicho compuesto y dicho polipéptido; en el que unión indica que dicho compuesto es un candidato a herbicida.

20 También se describe un método para identificar un compuesto como un candidato a herbicida, que comprende:

- a) poner en contacto dicho compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 25 a 35, o una variante de la misma, que presenta la actividad de una GDP-D-Manosa epimerasa y
- 25 b) valorar el efecto del compuesto sobre la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa del polipéptido; en el que una disminución en actividad indica que dicho compuesto es un candidato a herbicida.

También se describe un compuesto identificado por un método de la invención.

30 También se describe un método para determinar si el compuesto de la invención presenta actividad herbicida, que comprende: poner en contacto una planta o células vegetales con dicho candidato a herbicida y detectar una disminución en el crecimiento o viabilidad de dicha planta o células vegetales, en el que dicha disminución es indicativa de actividad herbicida del compuesto.

También se describe un anticuerpo producido contra un polipéptido de la invención.

También se describe un método para producir L-Galactosa-1-fosfato, comprendiendo el método poner en contacto GDP-L-Galactosa y un aceptor de GDP incluyendo una Hexosa-1-fosfato o fosfato con el producto de expresión de una construcción de expresión que comprende un polinucleótido de la invención para obtener L-Galactosa-1-fosfato.

35 También se describe un método para producir GDP-Galactosa, comprendiendo el método poner en contacto GDP-Manosa con el producto de expresión de una construcción de expresión que comprende un polinucleótido de la invención o un polipéptido de la invención para obtener GDP-Galactosa.

40 En realizaciones alternativas de todos los aspectos de la invención, la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa es una GDP-L-Galactosa Hexosa-1-P-Guaniltransferasa. De manera similar, en realizaciones alternativas de todos los aspectos de la invención, la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa es GDP-L-Galactosa Hexosa-1-P-Guaniltransferasa. Una GDP-L-Galactosa Hexosa-1-P-Guaniltransferasa no está limitada necesariamente a uso de Hexosa-1-P como un aceptor de GDP pero puede usar otros aceptores de GDP tales como fosfato y pirofosfato. Preferiblemente, el otro aceptor de GDP es fosfato.

45 Los polinucleótidos y variantes de polinucleótidos, de la invención pueden proceder de cualquier especie. Los polinucleótidos y variantes también pueden ser producidos de manera recombinante y también pueden ser los productos de propuestas de "transposiciones genéticas".

En una realización, el polinucleótido o variante procede de una especie vegetal.

En una realización más, el polinucleótido o variante procede de una especie vegetal de las gimnospermas.

En una realización más, el polinucleótido o variante procede de una especie de planta angiosperma.

En una realización más, el polinucleótido o variante procede de una especie vegetal dicotiledónea.

5 Los polipéptidos y variantes de polipéptidos de la invención pueden proceder de cualquier especie. Los polipéptidos y variantes también se pueden producir de manera recombinante y también se pueden expresar a partir de los productos de propuestas de "transposiciones genéticas".

En una realización, los polipéptidos o variantes de la invención proceden de especies vegetales.

En una realización más, los polipéptidos o variantes de la invención proceden de especies vegetales gimnospermas.

En una realización más, los polipéptidos o variantes de la invención proceden de especies vegetales angiospermas.

En una realización más, los polipéptidos o variantes de la invención proceden de especies vegetales dicotiledóneas.

10 Las plantas vegetales y las plantas de la invención, incluyendo aquéllas de las que proceden los polinucleótidos, polinucleótidos de variante, polipéptido y polipéptidos de variantes, pueden ser de cualquier especie.

En una realización, las células vegetales y plantas son de la especie gimnospermas.

En una realización más, las células vegetales y plantas son de la especie angiospermas.

En una realización más, las células vegetales y plantas son de la especie dicotiledóneas.

15 En una realización más, las células vegetales y plantas son de una especie de fruta seleccionada del grupo que comprende pero no se limita a los siguientes géneros: *Actinidia*, *Malus*, *Citrus*, *Fragaria* y *Vaccinium*.

Especies de plantas de fruto particularmente preferidas son: *Actinidia deliciosa*, *A. chinensis*, *A. eriantha*, *A. arguta*, híbridos de las cuatro especies *Actinidia*, *Malus domestica* y *Malus sieboldii*.

20 En una realización más, las células vegetales y las plantas son de una especie vegetal seleccionada de un grupo que comprende, pero no se limita, los siguientes géneros: *Brassica*, *Lycopersicon* y *Solanum*.

Especies de plantas vegetales preferidas en particular son: *Lycopersicon esculentum* y *Solanum tuberosum*.

En una realización más, las células vegetales y las plantas de la invención son de la especie monocotiledóneas.

En una realización más, las células vegetales y las plantas son de una especie de cultivo seleccionado de un grupo que comprende, pero no se limita a, los siguientes géneros: *Glycine*, *Zea*, *Hordeum* y *Oryza*.

25 Especies de plantas de cultivo preferidas en particular son: *Oryza sativa*, *Glycine max* y *Zea mays*.

### Descripción detallada

30 En esta memoria descriptiva donde se hecho referencia a memorias descriptivas de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto es en general por el propósito de proporcionar un contexto para discutir las características de la invención. A menos que se indique específicamente de otro modo, la referencia a tales documentos externos no se debe interpretar como una admisión de que tales documentos o tales fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica anterior, o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

35 El término "que comprende" como se usa en esta memoria descriptiva significa "que consta al menos en parte de". Cuando se interpreta cada afirmación en esta memoria descriptiva que incluye el término "que comprende", también pueden estar presentes características distintas de la o las introducidas por el término. Los términos relacionados tales como "comprenden" y "comprende" se tienen que interpretar de la misma manera.

### Polinucleótidos y fragmentos

40 El término "polinucleótido(s)" como se usa en la presente memoria, significa un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido mono o bicatenario de cualquier longitud pero preferiblemente al menos 15 nucleótidos, e incluye como ejemplos no limitantes, secuencias codificadoras y no codificadoras de un gen, complementos de secuencias transcritas y complementarias, exones, intrones, ADN genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNsi, ARNmi, ARNt, ribozimas, polipéptidos recombinantes, secuencias de ADN o ARN que se encuentran en la naturaleza aisladas y purificadas, secuencias de ARN y ADN sintéticas, sondas de ácidos nucleicos, cebadores y fragmentos.

45 Un "fragmento" de una secuencia de polinucleótidos proporcionada en la presente memoria es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que es capaz de hibridación específica para un objetivo de interés, por ejemplo, una secuencia que tiene al menos 15 nucleótidos de longitud. Los fragmentos de la invención comprenden 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 20 nucleótidos, más preferiblemente al menos 30 nucleótidos, más preferiblemente al

5 menos 50 nucleótidos, más preferiblemente al menos 50 nucleótidos y lo más preferiblemente al menos 60 nucleótidos de nucleótidos contiguos de un polinucleótido de la invención. Un fragmento de una secuencia de polinucleótidos se puede usar en tecnología complementaria, de silenciamiento de genes, triple hélice o de ribozimas o como un cebador, una sonda, incluido en una microserie, o usado en métodos de selección a base de polinucleótidos de la invención.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido corto, normalmente con un grupo 3'OH libre, que se hibrida a una plantilla y se usa para polimerización de cebado de un polinucleótido complementario al objetivo.

10 El término "sonda" se refiere a un polinucleótido corto que se usa para detectar una secuencia de polinucleótidos, que es complementaria a la sonda, en un ensayo a base de hibridación. La sonda puede constar de un "fragmento" de un polinucleótido como se define en la presente memoria.

#### Polipéptidos y fragmentos

15 El término "polipéptido", como se usa en la presente memoria, incluye cadenas de aminoácidos de cualquier longitud pero preferiblemente al menos 5 aminoácidos, incluyendo proteínas de longitud completa, en que las unidades aminoácido se unen por enlaces peptídicos covalentes. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser productos naturales purificados o se pueden producir parcialmente o completamente usando técnicas recombinantes o sintéticas. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento polipeptídico, una variante de polipéptido o derivado de los mismos.

20 Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la actividad biológica y/o proporciona estructura tridimensional del polipéptido. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento polipeptídico, una variante de polipéptido o derivado de los mismos capaz de realizar la actividad enzimática anterior.

25 El término "aislado" como se aplica a secuencias de polinucleótidos o polipéptidos descritas en la presente memoria se usa para referirse a secuencias que se retiran de su entorno celular natural. Una molécula aislada se puede obtener por cualquier método o combinación de métodos incluyendo técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas.

El término "recombinante" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se retira de las secuencias que la rodean en su contexto natural y/o se recombina con secuencias que no están presentes en su contexto natural.

30 Una secuencia de polipéptidos "recombinante" se produce por traducción de una secuencia de polinucleótidos "recombinante".

35 El término "procedente de" con respecto a polinucleótidos o polipéptidos de la invención que proceden de un género o especie particular, significa que el polinucleótido o polipéptido tiene la misma secuencia que un polinucleótido o polipéptido encontrado de manera natural en ese género o especie. El polinucleótido o polipéptido, procedente de un género o especie particular, se puede producir por lo tanto de manera sintética o de manera recombinante.

#### Variantes

40 Como se usa en la presente memoria, el término "variante" se refiere a secuencias de polinucleótidos o polipéptidos diferentes de las secuencias identificadas específicamente, en las que se suprime, se sustituye o añade, uno o más nucleótidos o restos de aminoácido. Las variantes pueden ser variantes alélicas que se encuentran en la naturaleza o variantes que no se encuentran en la naturaleza. Las variantes pueden ser de la misma especie o de otra especie y pueden incluir homólogas, parálogas y ortólogas. En algunas realizaciones, las variantes de los polipéptidos inventivos y los polipéptidos poseen actividades biológicas que son iguales o similares a las de los polipéptidos inventivos o polipéptidos. El término "variante" con referencia a polipéptidos y polipéptidos incluye todas las formas de polipéptidos y polipéptidos como se define en la presente memoria.

45 Variantes de polinucleótidos.

50 Las secuencias de polinucleótidos de variante presentan preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 51%, más preferiblemente al menos 52%, más preferiblemente al menos 53%, más preferiblemente al menos 54%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 56%, más preferiblemente al menos 57%, más preferiblemente al menos 58%, más preferiblemente al menos 59%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 61%, más preferiblemente al menos 62%, más preferiblemente al menos 63%, más preferiblemente al menos 64%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 66%, más preferiblemente al menos 67%, más preferiblemente al menos 68%, más preferiblemente al menos 69%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 71%, más preferiblemente al menos 72%, más preferiblemente al menos 73%, más preferiblemente al menos 74%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 76%, más preferiblemente al menos 77%, más preferiblemente al menos 78%, más

preferiblemente al menos 79%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 81%, más preferiblemente al menos 82%, más preferiblemente al menos 83%, más preferiblemente al menos 84%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 86%, más preferiblemente al menos 87%, más preferiblemente al menos 88%, más preferiblemente al menos 89%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 94%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 98% y lo más preferiblemente al menos 99% de identidad para una secuencia de la presente invención. La identidad se encuentra por una ventana de comparación de posiciones de al menos 20 nucleótidos, preferiblemente posiciones de al menos 50 nucleótidos, más preferiblemente posiciones de al menos 100 nucleótidos y lo más preferiblemente por la longitud completa de un polinucleótido de la invención.

Se puede determinar la identidad de secuencias de polinucleótidos de la siguiente manera. La secuencia de polinucleótidos objeto se compara a una secuencia de polinucleótidos candidata usando BLASTN (de la serie de programas BLAST, versión 2.2.5 [Nov 2.002]) en bl2seq (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1.999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250), que está públicamente disponible en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utiliza los parámetros por defecto de bl2seq excepto que la filtración de las partes de baja complejidad se debería desactivar.

La identidad de las secuencias de polinucleótidos se puede examinar usando los siguientes parámetros de la línea de comandos unix:

bl2seq -i nucleótidoseq1 -j nucleótidoseq2 -F F -p blastn

El parámetro -F F desactiva la filtración de secciones de complejidad baja. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. El programa bl2seq indica la identidad de secuencias como tanto el número como el porcentaje de nucleótidos idénticos en una línea "identidades = ".

La identidad de secuencias de polinucleótidos también se puede calcular por la longitud completa de la superposición entre secuencias de polinucleótidos candidata y sujeto usando programas de alineamiento de secuencias globales (por ej., Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1.970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Una implantación total del algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch se encuentra en el programa global alignment algorithm se encuentra en el programa needle en el paquete EMBOSS (Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics Junio de 2.000, vol 16, N° 6. págs. 276-277) que se puede obtener de <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>. El servidor del instituto europeo de bioinformática también proporciona la facilidad para realizar alineamientos globales EMBOSS-needle entre dos secuencias en línea en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>.

Alternativamente, se puede usar el programa GAP que computa una alineación global óptima de dos secuencias sin penalizar huecos terminales. Se describe GAP en el siguiente documento: Huang, X. (1.994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.

Un método preferido para calcular % de identidad de secuencias de polinucleótidos se basa en alineamiento de secuencias para comparar usando Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1.998, *Trends Biochem. Sci.* 23, 403-5.)

Las variantes de polinucleótidos de la presente invención también incluyen aquellas que presentan una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que se podía esperar no razonablemente que hubiera tenido lugar por azar. Dicha similitud de secuencias con respecto a los polipéptidos se puede determinar usando el programa bl2seq disponible al público de la serie de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2.002]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>).

La similitud de secuencias de polinucleótidos se puede examinar usando los siguientes parámetros de la línea de comandos unix:

bl2seq -i nucleótidoseq1 -j nucleótidoseq2 -F F -p tblastx

El parámetro -F F desactiva la filtración de secciones de complejidad baja. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada región indica un "valor E" que es el número esperado de veces que se puede esperar observar dicha correspondencia por azar en una base de datos de un tamaño de referencia fijado conteniendo secuencias aleatorias. El tamaño de esta base de datos se fija por defecto en el programa bl2seq. Para valores de E pequeños, mucho menores que uno, el valor E es aproximadamente la probabilidad de dicha correspondencia aleatoria.

Las secuencias de polinucleótidos de variante presentan preferiblemente un valor E menor que  $1 \times 10^{-6}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-9}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-12}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-15}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-18}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-21}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-30}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-40}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-50}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-60}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-70}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times$

$10^{-80}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-90}$ , y lo más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-100}$ , cuando se compara con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

Alternativamente, los polinucleótidos de variantes de la presente invención se hibridan a las secuencias de polinucleótidos especificadas o complementos de las mismas en condiciones rigurosas.

- 5 El término "hibridar en condiciones rigurosas", y equivalentes gramaticales del mismo, se refieren a la capacidad de una molécula de polinucleótido para hibridar a una molécula de polinucleótido fijada como objetivo (tal como una molécula de polinucleótido fijada como objetivo inmovilizada en una mancha de ADN o ARN, tal como un método Southern o método Northern) en condiciones definidas de temperatura y concentración de sal. La capacidad para hybrid en condiciones de hibridación rigurosas se puede determinar por hibridación inicial en condiciones menos rigurosas, aumentando después la rigurosidad a la rigurosidad deseada.

10 Con respecto a moléculas de polinucleótido mayores que aproximadamente 100 bases de longitud, las condiciones de hibridación rigurosas típicas no son mayores que 25 a 30°C (por ejemplo, 10°C) por debajo de la temperatura de fusión (Tf) del híbrido natural (véase en general, Sambrook *et al.*, Eds, 1.987, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel *et al.*, 1.987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing,). Tf para moléculas de polinucleótido mayores que aproximadamente 100 bases se puede calcular por la fórmula  $Tf = 81,5 + 0,41\% (G + C - \log (Na+))$ . (Sambrook *et al.*, Eds, 1.987, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton y McCarthy, 1.962, PNAS 84: 1.390). Las condiciones rigurosas típicas para polinucleótido mayor que 100 bases de longitud serían condiciones de hibridación tales como prelavado en una disolución de SSC X 6, SDS al 0,2%; hibridación a 65°C, SSC X 6, SDS al 0,2% durante la noche; seguido por dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC X1, SDS al 0,1% a 65°C y dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC X 0,2, SDS al 0,1% a 65°C.

20 Con respecto a moléculas de polinucleótido con una longitud menor que 100 bases, las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares son 5 a 10 °C por debajo de Tf. De promedio, la Tf de una molécula de polinucleótido de longitud menor que 100 pb se reduce por aproximadamente (500/longitud del oligonucleótido)°C.

- 25 Con respecto a las imitaciones de ADN conocidas como ácidos nucleicos de péptidos (los PNA) (Nielsen *et al.*, Science. 6 de diciembre de 1.991; 254 (5.037): 1.497-500) los valores de Tf son mayores que los de los híbridos DE ADN-ADN o ADN-ARN y se pueden calcular usando la fórmula descrita en Giesen *et al.*, Nucleic Acids Res. 1 de noviembre de 1.998; 26 (21): 5.004-6. Condiciones de hibridación rigurosas ejemplares para un híbrido ADN-PNA con una longitud menor que 100 bases son 5 a 10 °C por debajo de Tf.

- 30 Los polinucleótidos de variantes de la presente invención también incluyen polinucleótidos que difieren de las secuencias de la invención pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que tiene similar actividad a un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Una modificación de la secuencia que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido es una "variación silenciosa". Excepto para ATG (metionina) y TGG (triptófano), se pueden cambiar otros condones para el mismo aminoácido por técnicas reconocidas en la técnica, por ejemplo, para optimizar la expresión de condones en un organismo huésped particular.

- 35 Las modificaciones de la secuencia de polinucleótidos que dan como resultado sustituciones conservadoras de uno o varios aminoácidos en la secuencia de polipéptidos codificada sin modificar de manera significativa su actividad biológica también se incluyen en la invención. Un experto conocerá los métodos para preparar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ej., Bowie *et al.*, 1.990, Science 247,1.306).

40 Los polinucleótidos de variantes debido a variaciones silenciosas y sustituciones conservadoras en la secuencia de polipéptidos codificada se puede determinar usando el programa bl2seq disponible para el público o de la serie de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2.002]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) vía el algoritmo tblastx como se describió previamente.

- 45 La función de un polinucleótido de variante de la invención como una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa se puede valorar por ejemplo expresando dicha secuencia en bacterias y ensayando la actividad de la proteína codificada como se describe en la sección Ejemplo. La función de una variante también se puede ensayar por su capacidad para modificar la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa o contenido en ascorbato en las plantas, también como se describe en la sección Ejemplos en la presente memoria.

- 50 La función de un polinucleótido de variante de la invención como una GDP-D-Manosa epimerasa se puede valorar por ejemplo expresando dicha secuencia en bacterias y ensayando la actividad de la proteína codificada como se describe en la sección Ejemplo. La función de una variante también se puede ensayar por su capacidad para modificar la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa o contenido en ascorbato en las plantas, también como se describe en la sección Ejemplos en la presente memoria.

- 55 Variantes de polipéptidos.

El término "variante" con referencia a polipéptidos incluye polipéptidos producidos de manera recombinante y de manera sintética, que se encuentran en la naturaleza. Las secuencias de polipéptidos de variantes presentan preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 51%, más preferiblemente al menos 52%, más preferiblemente al menos 53%, más preferiblemente al menos 54%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 56%, más preferiblemente al menos 57%, más preferiblemente al menos 58%, más preferiblemente al menos 59%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 61%, más preferiblemente al menos 62%, más preferiblemente al menos 63%, más preferiblemente al menos 64%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 66%, más preferiblemente al menos 67%, más preferiblemente al menos 68%, más preferiblemente al menos 69%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 71%, más preferiblemente al menos 72%, más preferiblemente al menos 73%, más preferiblemente al menos 74%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 76%, más preferiblemente al menos 77%, más preferiblemente al menos 78%, más preferiblemente al menos 79%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 81%, más preferiblemente al menos 82%, más preferiblemente al menos 83%, más preferiblemente al menos 84%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 86%, más preferiblemente al menos 87%, más preferiblemente al menos 88%, más preferiblemente al menos 89%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, más preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 94%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 98%, y lo más preferiblemente al menos 99% de identidad para secuencias de la presente invención. Se encuentra identidad por una ventana de comparación de al menos posiciones de 20 aminoácidos, preferiblemente al menos posiciones de 50 aminoácidos, más preferiblemente al menos posiciones de 100 aminoácidos y lo más preferiblemente por la longitud total de un polipéptido de la invención.

Se puede determinar la identidad de secuencias de polipéptidos de la siguiente manera. La secuencia de polipéptidos objeto se compara a una secuencia de polipéptidos candidata usando BLASTP (de la serie de programas BLAST, versión 2.2.5 [Nov 2.002]) en bl2seq, que está disponible al público en NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq excepto que la filtración de las partes de baja complejidad se debería desactivar.

La identidad de secuencias de polinucleótidos también se puede calcular por la longitud completa de la superposición entre secuencias de polinucleótidos candidata y sujeto usando programas de alineamiento de secuencias globales. EMBOSS-needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1.994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.) como se discutió anteriormente también son programas de alineamiento de secuencias globales adecuados para calcular identidad de secuencias de polipéptidos.

Un método preferido para calcular % de identidad de secuencias de polipéptidos se basa en alinear secuencias que se tienen que comparar usando Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1.998, *Trends Biochem. Sci.* 23, 403-5.)

Las variantes de polipéptidos de la presente invención también incluyen aquéllas que presentan una similitud con una o más de las secuencias identificadas específicamente que es probable que conserven la equivalencia funcional de esas secuencias y que se podía esperar no razonablemente que hubiera tenido lugar por azar. Dicha similitud de secuencias con respecto a los polipéptidos se puede determinar usando el programa bl2seq disponible al público de la serie de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2.002]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). La similitud de secuencias de polipéptidos se puede examinar usando los siguientes parámetros de la línea de comandos unix:

`bl2seq -i nucleótidoseq1 -j nucleótidoseq2 -F F -p blastp`

Las secuencias de polipéptidos de variante presentan preferiblemente un valor E menor que  $1 \times 10^{-6}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-9}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-12}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-15}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-18}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-21}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-30}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-40}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-50}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-60}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-70}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-80}$ , más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-90}$  y lo más preferiblemente menor que  $1 \times 10^{-100}$ , cuando se compara con una cualquiera de las secuencias identificadas específicamente.

El parámetro -F F desactiva la filtración de secciones de complejidad baja. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada región indica un "valor E" que es el número esperado de veces que se puede esperar observar dicha correspondencia por azar en una base de datos de un tamaño de referencia fijado conteniendo secuencias aleatorias. Para valores de E pequeños, mucho menores que uno, esto es aproximadamente la probabilidad de dicha correspondencia aleatoria.

Las sustituciones conservadoras de uno o varios aminoácidos de una secuencia de polipéptidos descrita sin modificar de manera significativa su actividad biológica también se incluyen en la invención. Un experto conocerá los métodos para preparar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ej., Bowie *et al.*, 1.990, *Science* 247,1.306).

La función de un polipéptido de variante como una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa se puede valorar por los métodos descritos en la sección Ejemplo en la presente memoria.

La función de una variante de polipéptido como una GDP-D-Manosa epimerasa se puede valorar por los métodos descritos en la sección Ejemplo en la presente memoria.

5 Construcciones, vectores y componentes de los mismos.

El término "construcción genética" se refiere a una molécula de polinucleótido, normalmente ADN bicatenario, que puede tener insertada otra molécula de polinucleótido (la molécula de polinucleótido de inserto) tal como, pero no limitado a, una molécula de ADNc. Una construcción genética puede contener los elementos necesarios que permitan transcribir la molécula de polinucleótido de inserto y, opcionalmente, traducir la transcripción a un polipéptido. La molécula de polinucleótido de inserto puede proceder de la célula huésped o puede proceder de una célula u organismo diferente y/o puede ser un polinucleótido recombinante. Una vez en el interior de la célula huésped la construcción genética puede llegar a integrarse en el ADN cromosómico huésped. La construcción genética puede estar ligada a un vector.

El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido, normalmente ADN bicatenario, que se usa para transportar la construcción genética a una célula huésped. El vector puede ser capaz de replicación en al menos un sistema huésped adicional, tal como *E. coli*.

El término "construcción de expresión" se refiere a una construcción genética que incluye los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de polinucleótidos de inserto y, opcionalmente, traducir la transcripción a un polipéptido. Una construcción de expresión comprende típicamente en una dirección 5' a 3':

- 20 a) un promotor funcional en la célula huésped en la que se transformará la construcción,
- b) el polinucleótido que se tienen que expresar y
- c) un finalizador funcional en la célula huésped en que se transformará la construcción.

El término "región codificadora" o "marco de lectura abierto" (ORF, por sus siglas en inglés) se refiere a la hebra transcrita de una secuencia de ADN genómico o una secuencia de ADNc que es capaz de producir un producto de transcripción y/o un polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La secuencia codificadora se identifica por la presencia de un codón de inicio de la traducción 5' y un codón de parada de la traducción 3'. Cuando se inserta en una construcción genética, una "secuencia codificadora" es capaz de expresarse cuando se une de manera operable a secuencias promotoras y finalizadoras.

"Unido de manera operable" significa que la secuencia que se tiene que expresar se pone bajo el control de elementos reguladores que incluyen promotores, elementos reguladores específicos del tejido, elementos reguladores temporales, potenciadores, represores y finalizadores .

El término "región no codificadora" se refiere a secuencias no traducidas que están aguas arriba del sitio de inicio de la traducción y aguas abajo del sitio de parada de la traducción. Estas secuencias también se refieren respectivamente como la 5' UTR y la 3' UTR. Estas regiones incluyen elementos requeridos para iniciación y finalización de la transcripción y para regulación de la eficacia de la traducción.

Los finalizadores son secuencias, que finalizan la transcripción, y se encuentran en los extremos no traducidos 3' de los genes aguas abajo de la secuencia traducida. Los finalizadores son determinantes importantes de la estabilidad del ARNm y en algunos casos se ha encontrado que presentan funciones reguladoras espaciales.

El término "promotor" se refiere a elementos cis-reguladores no transcritos aguas arriba de la región codificadora que regula la transcripción de genes. Los promotores comprenden elementos cis-iniciadores que especifican el sitio de iniciación de la transcripción y conservan cajas tales como la caja TATA y unidades que se unen por factores de transcripción.

Un "transgen" es un polinucleótido que se toma de un organismo y se introduce en un organismo diferente por transformación. El transgen puede proceder de la misma especie o de una especie diferente como la especie del organismo en que se introduce el transgen.

Una "planta transgénica" se refiere a una planta que contiene nuevo material genético como resultado de manipulación o transformación genética. El nuevo material genético puede proceder de una planta de la misma especie como la planta transgénica resultante o de una especie diferente.

Una "repetición invertida" es una secuencia que se repite, donde la segunda mitad de la repetición está en la hebra complementaria, por ej.,

(5')GATCTA.....TAGATC(3')

(3')CTAGAT.....ATCTAG(5')

La transcripción por lectura producirá una transcripción que experimente apareamiento de bases complementarias para formar una estructura en horquilla siempre que haya un espaciador de 3-5 pb entre las regiones repetidas.

5 Los términos " modificar la expresión de" y "expresión modificada" de un polinucleótido o polipéptido de la invención, se destinan a incluir la situación en que el ADN genómico que corresponde a un polinucleótido de la invención se modifica conduciendo así a expresión modificada de un polinucleótido o polipéptido de la invención. La modificación del ADN genómico puede ser por transformación genética u otros métodos conocidos en la técnica para inducir mutaciones. La "expresión modificada" puede estar relacionada con un aumento o disminución en la cantidad de ARN mensajero y/o polipéptido producido y también puede dar como resultado actividad modificada de un polipéptido debido a modificaciones en la secuencia de un polinucleótido y polipéptido producido.

10 Los solicitantes han identificado nuevos polinucleótidos (SEC ID N° 14 a 20) que codifican nuevos polipéptidos (SEC ID N° 1 a 7 respectivamente) con actividad como GDP-L-Galactosa Guaniltransferasas (también conocidas como GDP-L-Galactosa fosforilasa). Los solicitantes han demostrado también que secuencias conocidas pero no caracterizadas adicionales (polinucleótidos de la SEC ID N° 21 a 24 que codifica polipéptidos de SEC ID N° 8 a 11 respectivamente) con actividad previamente desconocida, son también secuencias de GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

15 Los solicitantes han demostrado que todas las secuencias de polipéptidos descritas (SEC ID N° 1 a 11) muestran conservación de secuencias significativa y son variantes entre sí. Los solicitantes también han identificado dos unidades de secuencias polipeptídicas de consenso (SEC ID N° 12 y 13) ambos de los cuales están presentes en todas las secuencias de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

20 De manera similar, los solicitantes han demostrado que todas las secuencias de polinucleótidos descritas (SEC ID N° 14 a 24) muestran conservación de secuencias significativa y son variantes entre sí.

25 La invención proporciona construcción genéticas, vectores y plantas que contienen las secuencias de polinucleótidos. La invención también proporciona plantas que comprenden la construcción genética y los vectores de la invención.

30 La invención proporciona plantas modificadas en actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, referido a plantas de control adecuadas y plantas modificadas en contenido de ácido ascórbico en relación a plantas de control adecuadas. La invención proporciona plantas con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y contenido en ácido ascórbico aumentados. La invención también proporciona métodos para la producción de dichas plantas y métodos de selección de tales plantas. La invención también proporciona métodos para identificar compuestos herbicidas que inhiban la actividad de los polipéptidos de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa de la invención.

35 Las plantas de control adecuadas incluyen plantas no transformadas de la misma especie o variedad o plantas transformadas con construcciones de control. Las plantas de control adecuadas no incluyen plantas con mutaciones que den como resultado un contenido de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa o contenido en ascorbato disminuidos.

Los solicitantes también han identificado nuevos polinucleótidos (SEC ID N° 38 a 40) que codifican nuevos polipéptido (SEC ID N° 25 a 27 respectivamente) que tienen actividad como GDP-D-Manosa epimerasas.

40 Los solicitantes han demostrado que todas las secuencias de polipéptidos descritas de la epimerasa (SEC ID N° 25 a 35) muestran conservación de secuencias significativa y son variantes entre sí. Los solicitantes también han identificado dos unidades de secuencias polipeptídicas de consenso (SEC ID N° 36 y 37) ambos de los cuales están presentes en todas las secuencias de la GDP-D-Manosa epimerasa.

De manera similar, los solicitantes han demostrado que todas las secuencias de polinucleótidos de epimerasa descritas (SEC ID N° 38 a 48) muestran conservación de secuencias significativa y son variantes entre sí.

45 La invención proporciona construcción genéticas, vectores y plantas que contienen las nuevas secuencias de polinucleótidos (SEC ID N° 38 a 40) o secuencias que codifican las nuevas secuencias de polipéptidos (SEC ID N° 25 a 27). La invención también proporciona plantas que comprenden la construcción genética y vectores de la invención.

50 La invención proporciona plantas modificadas en actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa, respecto a plantas de control adecuadas, y plantas modificadas en contenido en ácido ascórbico respecto a plantas de control adecuadas. La invención proporciona plantas con actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y contenido en ascórbico aumentados.

La invención también proporciona métodos para la producción de tales plantas y métodos de selección de dichas plantas. La invención también proporciona métodos para identificar compuestos herbicidas que inhiban la actividad de los polipéptidos de la GDP-D-Manosa epimerasa de la invención.

5 Las plantas de control adecuadas incluyen plantas no transformadas de la misma especie o variedad o plantas transformadas con construcciones de control.

Además, los solicitantes han demostrado que la expresión de una combinación de GDP-D-Manosa epimerasa y GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa en las plantas, da como resultado un aumento del contenido de ascorbato en las plantas que es mayor que cuando cualquier enzima se expresa de manera individual. Además los solicitantes han demostrado, que cuando ambas enzimas se sobreexpresan en una célula vegetal o planta, hay sinergia. El aumento en ascorbato cuando ambas enzimas están sobreexpresadas juntas en una planta, es mayor que el aumento producido por la sobreexpresión de una enzima añadida al incremento en ascorbato producido por la sobreexpresión de otra enzima. La invención proporciona métodos para producir plantas con ascorbato aumentado, en relación a plantas de control, basándose en expresión de esta combinación. La invención proporciona plantas producidas por el método. La invención también proporciona plantas transformadas con ambas, una secuencia de epimerasa y una de transferasa.

Métodos para aislar o producir polinucleótidos.

Las moléculas de polinucleótido de la invención se pueden aislar usando una variedad de técnicas conocidas para los expertos en la materia. Como ejemplo, tales polipéptidos se pueden aislar por el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) descrito en Mullis *et al.*, Eds. 1.994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser. Los polipéptidos de la invención se pueden multiplicar usando cebadores, como se define en la presente memoria, procedentes de las secuencias de polinucleótidos de la invención.

Métodos adicionales para aislar polinucleótidos de la invención incluyen el uso de todos, o porciones de, los polipéptidos con la secuencia explicada en la presente memoria como sondas de hibridación. La técnica de hibridar sondas de polinucleótidos etiquetados a polinucleótidos inmovilizados en soportes sólidos tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nailon, se puede usar para investigar las bibliotecas genómicas o de ADNc. Las condiciones de hibridación y lavado ejemplares son: hibridación durante 20 horas a 65°C en SSC X 5,0, dodecilsulfato de sodio al 0,5%, disolución de Denhardt X1; lavado (tres lavados de veinte minutos cada uno a 55°C) en SSC X 1,0, dodecilsulfato de sodio al 1% (p/v) y opcionalmente un lavado (durante veinte minutos) en SSC X 0,5, dodecilsulfato de sodio al 1% (p/v), a 60°C. Un lavado más opcional (durante veinte minutos) puede ser realizado en las condiciones de SSC X 0,1, dodecilsulfato de sodio al 1% (p/v), a 60°C.

Los fragmentos de polinucleótidos de la invención se pueden producir por técnicas conocidas en la técnica tales como digestión de endonucleasa de restricción, síntesis de oligonucleótidos y multiplicación por PCR.

Se puede usar una secuencia de polinucleótidos parcial, en métodos conocidos en la técnica para identificar la correspondiente secuencia de polinucleótidos de longitud completa. Tales métodos incluyen métodos basados en PCR, 5'RACE (Frohman MA, 1.993, Methods Enzymol. 218: 340-56) y método basado en hibridación, métodos basados en ordenador/bases de datos. Además como ejemplo, PCR inversa permite la adquisición de secuencias desconocidas, flanqueo de las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente memoria, iniciación con cebadores basándose en una región conocida (Triglia *et al.*, 1.998, *Nucleic Acids Res* 16, 8.186. El método usa diversas enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se circulariza después por ligadura intramolecular y se usa como una plantilla de PCR. Se diseñan cebadores divergentes de la región conocida. Para ensamblar físicamente clones de longitud completa, se pueden utilizar propuestas de biología molecular (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1.987).

Puede ser beneficioso, cuando se produce una planta transgénica de una especie particular, transformar dicha planta con una secuencia o secuencias procedentes de esa especie. El beneficio puede ser aliviar las preocupaciones del público con respecto a la transformación de especies cruzadas en la generación de organismos transgénicos. Adicionalmente cuando la regulación hacia abajo de un gen es el resultado deseado, puede ser necesario utilizar una secuencia idéntica (o al menos muy similar) a esa en la planta, para la que se desea expresión reducida. Por esta razón entre otras, es deseable poder identificar y aislar ortólogos de un gen particular en varias diferentes especies de plantas.

Las variantes (incluyendo ortólogos) se pueden identificar por los métodos descritos.

Métodos para identificar variantes.

Métodos físicos.

Se pueden identificar polipéptidos de variantes usando métodos basados en PCR (Mullis *et al.*, Eds. 1.994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser). Típicamente, la secuencia de polinucleótidos de un cebador, útil para multiplicar variantes de moléculas de polinucleótidos de la invención por PCR, puede estar basada en una secuencia

que codifica una región conservada de la correspondiente secuencia de aminoácidos.

Alternativamente, se pueden emplear métodos de investigación de bibliotecas, conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1.987). Cuando se identifican variantes de la secuencia de la sonda, la rigurosidad de la hibridación y/o lavado se reducirá típicamente relativamente a cuando se buscan correspondencias de secuencias exactas.

Las variantes de polipéptidos también se pueden identificar por métodos físicos, por ejemplo por investigación de bibliotecas de expresión usando anticuerpos producidos contra polipéptidos de la invención (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1.987) o por identificación de polipéptidos de fuentes naturales con la ayuda de tales anticuerpos.

Métodos basados en ordenador.

Las secuencias de variantes de la invención, incluyendo variantes tanto de polinucleótidos como de polipéptidos, también se pueden identificar por métodos basados en ordenador conocidos para los expertos en la materia, usando algoritmos de alineamiento de secuencias de dominio público y herramientas de investigación de similitud de secuencias para buscar bases de datos de secuencias (las bases de datos del dominio público incluyen Genbank, EMBL, Swiss-Prot, PER y otros). Véase, por ej., Nucleic Acids Res. 29: 1-10 and 11-16, 2.001 por ejemplos de recursos en línea. Las búsquedas de similitud recuperan y alinean secuencias fijadas como objetivo para comparación con una secuencia que se tiene que analizar (es decir, una secuencia de consulta). Los algoritmos de comparación de secuencias usan matrices de puntuación para asignar una puntuación total a cada una de las alineaciones.

Una familia ejemplar de programas útil para identificar variantes en bases de datos de secuencias es la serie de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2.002]) incluyendo BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX, que están disponibles al público en (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) o del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés), Biblioteca Nacional de Medicina, Edificio 38A, Habitación 8N805, Bethesda, MD 20894 USA. El servidor de NCBI también proporciona la facilidad de usar los programas para investigar una serie de bases de datos de secuencias disponibles al público. BLASTN compara una secuencia de consulta de nucleótidos frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos. BLASTP compara una secuencia de consulta de aminoácidos frente a una base de datos de secuencias de proteínas. BLASTX compara una secuencia de consulta de nucleótidos traducida en todos los marcos de lectura frente a una base de datos de secuencias de proteínas. tBLASTN compara una secuencia de consulta de proteínas frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos producida dinámicamente en todos los marcos de lectura. tBLASTX compara las traducciones de seis marcos de una secuencia de consulta de nucleótidos frente a las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST se pueden usar con parámetros por defecto o se pueden modificar los parámetros como se requiera para refinar la investigación.

El uso de la familia de algoritmos BLAST, incluyendo BLASTN, BLASTP y BLASTX, se describe en la publicación de Altschul *et al*, Nucleic Acids Res. 25: 3.389-3.402, 1.997.

Los "éxitos" para una o más secuencias de la base de datos por una secuencia consultada producida por BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN, tBLASTX, o un algoritmo similar, alinea o identifica porciones similares de las secuencias. Los éxitos se ordenan por orden del grado de similitud y longitud de la secuencia superpuesta. Los éxitos para una secuencia de base de datos generalmente representan una superposición sobre sólo una fracción de la longitud de la secuencia de la secuencia consultada.

Los algoritmos BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX también producen valores "Esperados" para las alineaciones. El Valor esperado (E) indica el número de éxitos que se puede "esperar" observar por azar cuando se busca en una base de datos del mismo tamaño conteniendo secuencias contiguas aleatorias. El Valor esperado se usa como un umbral de significación para determinar si el éxito para una base de datos indica verdadera similitud. Por ejemplo, un Valor E de 0,1 asignado un éxito de polinucleótido se interpreta que significa que en una base de datos del tamaño de la base de datos investigada, se puede esperar observar 0,1 correspondencias sobre la porción alineada de la secuencia con una puntuación similar simplemente por azar. Para las secuencias que tienen un Valor E de 0,01 o menor sobre porciones alineadas y correspondientes, la probabilidad de encontrar una correspondencia por azar en esa base de datos es 1% o menor usando el algoritmo BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN o tBLASTX.

Las alineaciones de secuencias múltiples de un grupo de secuencias relacionadas se puede llevar a cabo con CLUSTALW (Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1.994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4.673-4.680, <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) o T-COFFEE (Cedric Notredame, Desmond G. Higgins, Jaap Heringa, T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, J. Mol. Biol. (2.000) 302: 205-217)) o PILEUP, que usa alineaciones par a par, progresivas. (Feng y Dolittle, 1.987, J. Mol. Evol. 25, 351).

Aplicaciones de programas informáticos de reconocimiento de patrones están disponibles para buscar unidades o secuencias firma. Por ejemplo, MEME (Múltiple Em para Obtención de Unidades, por sus siglas en inglés) encuentra unidades y secuencias firma en una serie de secuencias y MAST (Alineación de Unidades y Herramienta de Búsqueda, por sus siglas en inglés) usa estas unidades para identificar unidades similares o las mismas unidades en secuencias consultadas. Los resultados de MAST se proporcionan como la serie de alineaciones con datos estadísticos apropiados y una visión general visual de las unidades encontradas. MEME y MAST fueron desarrolladas en la Universidad de California, San Diego.

PROSITE (Bairoch y Bucher, 1.994, *Nucleic Acids Res.* 22, 3.583; Hofmann *et al.*, 1.999, *Nucleic Acids Res.* 27, 215) es un método para identificar las funciones de proteínas no caracterizadas traducidas de secuencias genómicas o de secuencias de ADNc. La base de datos PROSITE ([www.expasy.org/prosite](http://www.expasy.org/prosite)) contiene patrones y perfiles biológicamente significativos y se diseña de manera que se puede usar con herramientas computacionales apropiadas para asignar una nueva secuencia a una familia conocida de proteínas o para determinar que dominio o dominios conocidos están presentes en la secuencia (Falquet *et al.*, 2.002, *Nucleic Acids Res.* 30, 235). Prosearch es una herramienta que puede investigar las bases de datos SWISS-PROT y EMBL con un patrón de secuencia o firma determinada.

Métodos para aislar polipéptidos.

Los polipéptidos de la invención, incluyendo polipéptidos de variantes, se pueden preparar usando métodos de síntesis de péptidos conocidos en la técnica tales como síntesis directa de péptidos usando técnicas de fase sólida (por ej., Stewart *et al.*, 1.969, en *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co, San Francisco California, o síntesis automatizada, por ejemplo usando un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A (Foster City, California). También se pueden producir formas mutadas de los polipéptidos durante tales síntesis.

Los polipéptidos y polipéptidos de variantes de la invención también se pueden purificar de fuentes naturales usando una variedad de técnicas que son conocidas en la técnica (por ej., Deutscher, 1.990, Ed, *Methods in Enzymology*, Vol. 182, *Guide to Protein Purification*).

Alternativamente, los polipéptidos y polipéptidos de variantes de la invención se pueden expresar de manera recombinante en células huésped adecuadas y separar de las células como se discute a continuación.

Métodos para producir construcciones y vectores.

Las construcciones genéticas de la presente invención comprenden una o más secuencias de polinucleótidos de la invención y/o polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención y pueden ser útiles para transformar, por ejemplo, bacterias, hongos, insectos, mamíferos u organismos vegetales. Las construcciones genéticas de la invención se destinan a incluir construcciones de expresión como se define en la presente memoria.

Los métodos para producir y usar construcciones y vectores genéticos son conocidos en la técnica y se describen en general en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1.987; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1.987).

Métodos para producir células huésped que comprenden polinucleótidos, construcciones o vectores.

La invención proporciona una célula huésped que comprende una construcción o vector genético de la invención. Las células huésped pueden proceder de, por ejemplo, bacterias, hongos, insectos, mamíferos u organismos vegetales.

Las células huésped que comprenden construcciones genéticas, tales como construcciones de expresión, de la invención son útiles en métodos conocidos en la técnica (por ej., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1.987; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1.987) para producción recombinante de polipéptidos de la invención. Tales métodos pueden implicar el cultivo de células huésped en un medio apropiado en condiciones adecuadas para o conducentes a expresión de un polipéptido de la invención. El polipéptido recombinante expresado, que opcionalmente puede ser segregado en el cultivo, se puede separar después del medio, células huésped o medio de cultivo por métodos conocidos en la técnica (por ej., Deutscher, Ed, 1.990, *Methods in Enzymology*, Vol 182, *Guide to Protein Purification*).

Métodos para producir células vegetales y plantas que comprenden construcciones y vectores.

La invención proporciona además células vegetales que comprenden una construcción genética de la invención y células vegetales modificadas para modificar la expresión de un polinucleótido o polipéptido de la invención. Las plantas que comprenden tales células también forman un aspecto de la invención.

La modificación de la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o GDP-D-Manosa epimerasa y/o contenido en ácido ascórbico también se puede modificar en una planta por métodos de la invención. Tales métodos pueden implicar la transformación de células vegetales y plantas, con una construcción de la invención diseñada para modificar la expresión de un polinucleótido o polipéptido que modula la actividad de la GDP-L-Galactosa

5 Guaniltransferasa y/o la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o contenido en ácido ascórbico en tales células vegetales y plantas. Dichos métodos también incluyen la transformación de las células vegetales y las plantas con una combinación de la construcción de la invención y otra u otras construcciones más diseñadas para modificar la expresión de uno o más polinucleótidos o polipéptidos que modulan la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o contenido en ácido ascórbico en tales células vegetales y plantas.

10 Los métodos para transformar las células vegetales, las plantas y porciones de las mismas con polipéptidos se describen en Draper *et al.*, 1.988, Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual. Blackwell Sci. Pub. Oxford, pág. 365; Potrykus y Spangenburg, 1.995, Gene Transfer to Plants. Springer-Verlag, Berlin.; y Gelvin *et al.*, 1.993, Plant Molecular Biol. Manual. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Se proporciona una revisión de plantas transgénicas, incluyendo técnicas de transformación, en Galun y Breiman, 1.997, Transgenic Plants. Imperial College Press, Londres.

Métodos para manipulación genética de plantas.

15 Está disponible una serie de estrategias de transformación de plantas (por ej., Birch, 1.997, Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol, 48, 297, Hellens RP, et al (2.000) Plant Mol Biol 42: 819-32, Hellens R et al Plant Meth 1: 13). Por ejemplo, se pueden diseñar estrategias para aumentar la expresión de un polinucleótido/polipéptido en una célula vegetal, órgano y/o en una fase de desarrollo particular donde/cuando se exprese normalmente o para expresar de manera ectópica un polinucleótido/polipéptido en una célula, tejido, órgano y/o en una fase de desarrollo particular que/cuando no se exprese normalmente. El polinucleótido/polipéptido expresado puede proceder de las especies vegetales que se tienen que transformar o puede proceder de una especie vegetal diferente.

20 Se pueden diseñar estrategias de transformación para reducir la expresión de un polinucleótido/polipéptido en una célula vegetal, tejido, órgano o en una fase de desarrollo particular que/cuando se expresa normalmente. Tales estrategias son conocidas como estrategias de silenciación de genes.

25 Las construcciones genéticas para expresión de genes en plantas transgénicas incluyen típicamente promotores para conducir la expresión de uno o más polinucleótidos clonados, finalizadores y secuencias marcadoras seleccionables para detectar la presencia de la construcción genética en la planta transformada.

30 Los promotores adecuados para uso en las construcciones de esta invención son funcionales en una célula, tejido u órgano de una planta monocotiledónea o dicotiledónea e incluye promotores específicos de la célula, del tejido y del órgano, promotores específicos del ciclo celular, promotores temporales, promotores inducibles, promotores constitutivos que son activos en la mayoría de los tejidos vegetales y promotores recombinantes. La elección de promotor dependerá de la expresión temporal y espacial del polinucleótido clonado, así deseado. Los promotores pueden ser esos normalmente asociados a un transgen de interés o promotores que proceden de genes de otras plantas, virus y bacterias y hongos patógenos de plantas. Los expertos en la materia podrán, sin experimentación excesiva, seleccionar promotores que sean adecuados para uso en la modificación y modulación de rasgos de plantas usando construcciones genéticas que comprenden las secuencias de polinucleótidos de la invención. Ejemplos de promotores de plantas constitutivos incluyen el promotor CaMV 35S, el promotor de nopalina sintasa y el promotor de octopina sintasa y el promotor de Ubi 1 de maíz. Los promotores de plantas que son activos en tejidos específicos, responden a señales de desarrollo internas o tensiones abióticas o bióticas externas se describen en la bibliografía científica. Se describen promotores ejemplares, por ejemplo, en la patente internacional WO 02/00894).

40 Los finalizadores ejemplares que son usados comúnmente en construcción genética de transformación de plantas incluyen, por ejemplo, el finalizador del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S, los finalizadores de la nopalina sintasa u octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el finalizador del gen zein de *Zea mays*, el finalizador de la ADP-glucosa pirofosforilasa de *Oryza sativa* y el finalizador PI-II de *Solanum tuberosum*.

45 Los marcadores seleccionables usados comúnmente en transformación de plantas incluyen el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPT II) que confiere resistencia a la kanamicina, el gen *aadA*, que confiere resistencia a la espectinomocina y estreptomocina, la fosfinotricina acetil transferasa (gen *bar*) para resistencia a Ignite (AgrEvo) y Basta (Hoechst) y el gen de higromicina fosfotransferasa (*hpt*, por sus siglas en inglés) para resistencia a la higromicina.

50 También se considera el uso de construcciones genéticas que comprende genes informadores (secuencias codificadoras que expresan una actividad que es extraña para el huésped, normalmente una actividad enzimática y/o una señal visible (por ej., luciferasa, GUS, GFP) que se puede usar para análisis de expresión de promotor en plantas y tejidos vegetales. La bibliografía de genes informadores se revisa en Herrera-Estrella et al., 1.993, Nature 303, 209 y Schrott, 1.995. En: Gene Transfer to Plants (Potrykus, T., Spangenberg. Eds) Springer Verlag. Berlina, págs. 325-336.

55 Las estrategias de silenciación de genes se pueden centrar en el propio gen o elementos reguladores que efectúen la expresión del polipéptido codificado. "Elementos reguladores" se usa en la presente memoria en el sentido más

amplio posible e incluye otros genes que interactúan con del gen de interés.

Las construcciones genéticas diseñadas para disminuir o silenciar la expresión de un polinucleótido/polipéptido de la invención pueden incluir una copia antisentido de un polinucleótido de la invención. En dichas construcciones el polinucleótido se pone en una orientación antisentido con respecto al promotor y finalizador.

- 5 Un polinucleótido “antisentido” se obtiene invirtiendo un polinucleótido o un segmento del polinucleótido de manera que la transcripción producida sea complementaria a la transcripción del ARNm del gen, por ej.,

5'GATCTA 3' (hebra codificadora) 3'CTAGAT 5' (hebra complementaria)

3'CUAGAU5' ARNm 5'GAUCUCG3' ARN antisentido

- 10 Las construcciones genéticas diseñadas para silenciar genes también pueden incluir una repetición invertida. Una “repetición invertida” es una secuencia que se repite donde la segunda mitad de la repetición es la hebra complementaria, por ej.,

5'-GATCTA.....TAGATC-3'

3'-CTAGAT.....ATCTAG-5'

- 15 La transcripción formada puede experimentar apareamiento de bases complementarias para formar una estructura de horquilla. Normalmente se requiere un espaciador de al menos 3-5 pb entre la región repetida para permitir la formación de horquilla.

Otra propuesta de silenciación implica el uso de un ARN antisentido pequeño fijado como objetivo para la transcripción equivalente a un ARNm (Llave *et al.*, 2.002, Science 297, 2.053). El uso de un ARN antisentido pequeño correspondiente a polinucleótido de la invención se considera expresamente.

- 20 El término construcción genética como se usa en la presente memoria también incluye los ARN antisentido pequeños y otros de tales polipéptidos que efectúan silenciación de genes.

- 25 La transformación con una construcción de expresión, como se define en la presente memoria, también puede dar como resultado silenciación de genes a través de un procedimiento conocido como supresión de sentido (por ej., Napoli *et al.*, 1.990, Plant Cell 2, 279; de Carvalho Niebel *et al.*, 1.995, Plant Cell, 7, 347). En algunos casos la supresión de sentido puede implicar sobreexpresión de la secuencia codificante completa o una parcial pero también puede implicar expresión de región no codificante del gen, tal como un intrón o una región no traducida 5' o 3' (UTR, por sus siglas en inglés). Se pueden usar construcciones de sentido parcial quiméricas para silenciar de manera coordinada múltiples genes, (Abbott *et al.*, 2.002, Plant Physiol. 128 (3): 844-53; Jones *et al.*, 1.998, Planta 204: 499-505). El uso de tales estrategias de supresión de sentido para silenciar la expresión de un polinucleótido de la invención también se considera.

- 30 Los insertos de polinucleótidos en las construcciones genéticas diseñadas para silenciar genes pueden corresponder a secuencias codificantes y/o secuencia no codificante, tal como promotor y/o intrón y/o secuencia 5' o 3' UTR o el gen correspondiente.

Otras estrategias de silenciación de genes incluyen propuestas negativas dominantes y el uso de construcciones de ribozimas (McIntyre, 1.996, Transgenic Res, 5, 257).

- 35 La silenciación pretranscripcional se puede producir por mutación del propio gen o sus elementos reguladores. Tales mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales, desplazamientos del marco de lectura, inserciones, supresiones y sustituciones.

- 40 Lo siguiente son publicaciones representativas que describen protocolos de transformación genética que se pueden usar para transformar genéticamente las especies vegetales siguientes: Arroz (Alam *et al.*, 1.999, Plant Cell Rep. 18, 572); apple (Yao *et al.*, 1.995, Plant Cell Reports 14, 407-412); maíz (Patentes de EE.UU. N° de Serie 5.177.010 y 5.981.840); trigo (Ortiz *et al.*, 1.996, Plant Cell Rep. 15, 1.996, 877); tomate (Patente de EE.UU. N° de Serie 5.159.135); patata (Kumar *et al.*, 1.996 Plant J. 9.: 821); mandioca (Li *et al.*, 1.996 Nat. Biotechnology 14, 736); lechuga (Michelmores *et al.*, 1.987, Plant Cell Rep. 6, 439); tabaco (Horsch *et al.*, 1.985, Science 227, 1.229); algodón (Patentes de EE.UU. N° de Serie 5.846.797 y 5.004.863); pasto (Patentes de EE.UU. N° 5.187.073 y 6.020.539); menta (Niu *et al.*, 1.998, Plant Cell Rep. 17, 165); plantas de cítricos (Pena *et al.*, 1.995, Plant Sci. 104, 183); comino (Krens *et al.*, 1.997, Plant Cell Rep, 17, 39); banana (Patente de EE.UU. N° de Serie 5.792.935); soja (Patentes de EE.UU. N° 5.416.011; 5.569.834; 5.824.877; 5.563.04455 y 5.968.830); piña (Patente de EE.UU. N° de Serie 5.952.543); chopo (Patente de EE.UU. N° 4.795.855); monocotiledóneas en general (Patentes de EE.UU. N° 5.591.616 y 6.037.522); brassica (Patentes de EE.UU. N° 5.188.958 ; 5.463.174 y 5.750.871); cereales (Patente de EE.UU. N° 6.074.877); pera (Matsuda *et al.*, 2.005, Plant Cell Rep. 24 (1): 45-51); Prunus (Ramesh *et al.*, 2.006 Plant

Cell Rep. 25 (8): 821-8; Song y Sink 2.005 Plant Cell Rep. 2.006; 25 (2): 117-23; Gonzalez Padilla et al., 2.003 Plant Cell Rep. 22 (1): 38-45; fresa (Osumi et al., 2.006 Planta. 223 (6): 1.219-30; Folta et al., 2.006 Planta Apr 14; PMID: 16614818), rosa (Li et al., 2.003), Rubus (Graham et al., 1.995 Methods Mol Biol. 1.995; 44: 129-33), tomate (Dan et al., 2.006, Plant Cell Reports V25: 432-441), manzana (Yao et al., 1.995, *Plant Cell Rep.* 14, 407-412) y *Actinidia eriantha* (Wang et al., 2.006, Plant Cell Rep. 25, 5: 425-31). La transformación de otras especies también se considera por la invención. Métodos y protocolos adecuados están disponibles en la bibliografía científica.

Se pueden emplear diversos métodos adicionales conocidos en la técnica para modificar la expresión de un nucleótido y/o polipéptido de la invención. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, Tilling (Till et al., 2.003, Methods Mol Biol, 2%, 205), denominados tecnología "Deletagene" (Li et al., 2.001, Plant Journal 27 (3), 235) y el uso de factores de transcripción artificiales tales como factores de transcripción con dedo de cinc sintéticos (por ej., Jouvenot et al., 2.003, Gene Therapy 10, 513). Adicionalmente, anticuerpos o fragmentos de los mismos, fijados como objetivo a un polipéptido particular también se pueden expresar en plantas para modular la actividad de ese polipéptido (Jobling et al., 2.003, Nat. Biotechnol., 21 (1), 35). También se pueden aplicar propuestas de marcado con transposón. Adicionalmente, los péptidos que interactúan con un polipéptido de la invención se pueden identificar por tecnologías tales como indicador de fase (Dyax Corporation). Dichos péptidos que interactúan se pueden expresar en o aplicar a una planta para afectar a la actividad de un polipéptido de la invención. El uso de cada una de las propuestas anteriores en la modificación de la expresión de un nucleótido y/o polipéptido de la invención se considera específicamente.

Métodos de selección de plantas.

También se proporcionan métodos para seleccionar plantas con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o contenido en ascorbato modificados. Tales métodos implican ensayar en plantas alteraciones de la expresión de un polinucleótido o polipéptido de la invención. Dichos métodos se pueden aplicar a una edad joven o fase de desarrollo temprana cuando la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o el contenido en ascorbato modificados pueden no ser fácilmente medibles necesariamente.

La expresión de un polinucleótido, tal como un ARN mensajero, con frecuencia se usan como un indicador de la expresión de un polipéptido correspondiente. Métodos ejemplares para medir la expresión de un polinucleótido incluyen, pero no se limitan a, análisis por el método Northern, RT-PCR y análisis *dot-blot* (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press, 1.987). Los polinucleótidos o porciones de los polinucleótidos de la invención son útiles así como sondas o cebadores, como se define en la presente memoria, en métodos para identificación de plantas con niveles modificados de la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa o ascorbato. Los polinucleótidos de la invención se pueden usar como sondas en experimentos de hibridación o como cebadores en experimentos basados en PCR, diseñados para identificar tales plantas.

Alternativamente, se pueden producir anticuerpos contra polipéptidos de la invención. Métodos para producir y usar anticuerpos como estándar en la técnica (véase por ejemplo: Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow a Lane, Eds, Cold Spring Harbour Laboratory, 1.998). Tales anticuerpos se pueden usar en métodos para detectar la expresión modificada de polipéptidos que modulan el tamaño de las flores en las plantas. Tales métodos pueden incluir análisis ELISA (Kemeny, 1.991, A Practical Guide to ELISA, NY Pergamon Press) y Western (Towbin & Gordon, 1.994, J Immunol Methods, 72, 313).

Estas propuestas para análisis de expresión de polinucleótidos o polipéptidos y la selección de plantas con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa o contenido en ascorbato, modificados, son útiles en los programas de reproducción convencionales para producir variedades con actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa o contenido en ascorbato, modificados.

Plantas

El término "planta" se destina a incluir una planta completa, cualquier parte de una planta, propágulos y progenie de una planta.

El término "propágulo" significa cualquier parte de una planta que se puede usar en reproducción o propagación, sexual o asexual, incluyendo semillas y esquejes.

Las plantas de la invención se pueden cultivar y autosembrar o cruzar con una cepa de planta diferente y se pueden identificar los híbridos resultantes, con las características de fenotipo deseadas. Se pueden cultivar dos o más generaciones para asegurar que las características fenotípicas objeto se mantengan y se hereden de manera estable. Las plantas que resultan de dichas propuestas de reproducción clásicas también forman un aspecto de la presente invención.

La modificación de la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o contenido en ácido ascórbico también se puede modificar en una planta por métodos de la invención.

Tales métodos pueden implicar la transformación de células vegetales y plantas, con una construcción de la invención diseñada para modificar la expresión de un polinucleótido o polipéptido que module la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o contenido en ácido ascórbico en dichas células vegetales y plantas. Tales métodos pueden incluir la transformación de células vegetales y plantas con una combinación de la construcción de la invención y otra u otras construcciones más diseñadas para modificar la expresión de uno o más polinucleótidos o polipéptidos que modulan la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y/o la actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y/o el contenido en ácido ascórbico en dichas células vegetales y plantas.

Métodos para extraer medir ascorbato de plantas.

- 10 También se proporcionan métodos para la producción de ascorbato por extracción de ascorbato de una planta de la invención. Se puede extraer ascorbato de las plantas como sigue:

Se muelen muestras de tejido congeladas a un polvo fino en un Cryomill a la temperatura de nitrógeno líquido. Aproximadamente 200 mg de tejido en polvo congelado se suspenden después en 4 volúmenes de HCl 0,5 N que contienen TCEP 4 mM (Pierce), se someten a agitadora vorticial durante 20 s y se incuban en un bloque térmico durante 2 h a 40°C. Se usa TCEP en la disolución de extracción, debido a que es un agente reductor más eficaz en condiciones ácidas que DTT, asegurando que toda la vitamina C está en la forma reducida de ácido ascórbico. Se centrifuga el extracto a 4°C y se inyectan veinte µl del sobrenadante en una columna de HPLC Aminex HPX-87H de 7,8 x 300 mm (BioRad). Se hace funcionar la columna con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,8 mM, a un caudal de 0,6 ml/min y se calcula la cantidad de ácido ascórbico a partir de la absorbancia a 245 nm (tiempo de retención 9,6 min), usando ácido ascórbico (Sigma St Louis) como un patrón. Si autenticada el pico como ácido ascórbico mostrando que se degrada completamente por la ascorbato oxidasa a pH 5,5.

Este método se puede realizar a mayor escala para extracción de ascorbato a mayor escala usando propuestas conocidas para los expertos en la materia.

Métodos de detección sistemática de herbicidas.

- 25 Se puede identificar sistemáticamente cualquier compuesto con un herbicida candidato usando los métodos de la invención. Ejemplos de compuestos que se podían identificar sistemáticamente incluyen compuestos inorgánicos y orgánicos tales como, pero no limitándose a, aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, glicoconjugados, oligosacáridos, lípidos, alcoholes, tioles, aldehídos, alquilantes, éteres carbónicos, hidrazidas, hidracinas, cetonas, nitrilos, aminas, sulfocloruros, triazinas, piperizinas, sulfonamidas y similares. Preferiblemente se identifican sistemáticamente bibliotecas de compuestos en los métodos en la presente memoria. Los métodos para sintetizar y detectar sistemáticamente bibliotecas de compuestos son conocidos para los expertos en la materia. Véanse por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 5.463.564; 5.574.656; 5.684.711 y 5.901.069.

- 35 Los métodos para identificar compuestos que se unen a tales polipéptidos son conocidos y se describen por ejemplo en la patente internacional WO 03/077648. Los métodos para medir la actividad de los polipéptidos de la invención se describen en los Ejemplos proporcionados en la presente memoria.

- 40 También se puede decir ampliamente que esta invención consta de las partes, elementos y características referidos o indicados en la memoria descriptiva de la solicitud, de manera individual o de manera colectiva, y cualquier combinación o todas las combinaciones de dos o más cualesquiera de dichas partes, elementos o características, y donde se mencionen números enteros específicos en la presente memoria que tengan equivalentes conocidos en la técnica a la que se refiere esta invención, se estima que dichos equivalentes conocidos se incorporan en la presente memoria como si se explicara individualmente.

### Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los dibujos adjuntos en que:

- 45 La Figura 1 muestra una alineación de la secuencia VTC2 de *Arabidopsis thaliana* con la secuencia 319998 'Hort16A' de *Actinidia chinensis* y una segunda secuencia *A. thaliana*, At5g55120. También se alinea la enzima At5g18200 de *Arabidopsis* (que codifica una UDP-glucosa-hexosa-1 -fosfato uridililtransferasa putativa (EC-Número 2.7.7.12 )) y la proteína de ratón no identificada Mm\_74150758 (el número es el número de acceso GenBank). Se muestran restos alineados idénticos en las cinco secuencias en gris oscuro, restos similares en gris claro. Las secuencias se alinearon usando Clustal X (Jeanmougin et al., 1.998) con algún ajuste manual. La secuencia de tríada HIT se identifica en ~ el resto de aminoácidos 250.

- 55 La Figura 2 muestra la respuesta de la GDP-Manosa-1-P Guaniltransferasa del kiwi, EST 319998 (SEC ID N° 1/14), a GDP-L-Galactosa. La GDP-L-Galactosa se hizo de GDP-D-Manosa usando la epimerasa como se describe en los métodos y la concentración de la mezcla que fue GDP-L-Galactosa determinado por HPLC. Los ensayos se realizaron usando el ensayo acoplado continuo usando 0,029 ug de enzima por ensayo. La concentración de Manosa-1-P fue MgCl<sub>2</sub> 0,93 mM y 1,87 mM. Otras condiciones fueron como se describe en el texto. Los parados representan de reacción menos el fondo producido sin manosa-1-P. Los triángulos representan los valores de fondo

usando extracto E coli purificados HisTrap (0,006 ug) expresando un vector PET30a vacío. (transcursos del tiempo 319998 11 10 06.xls).

5 La Figura 3 muestra la respuesta de la enzima, EST319998 (SEC ID N° 1/14) a potenciales guanil-aceptores. Se llevaron a cabo los ensayos usando el ensayo acoplado continuo con concentraciones variables de fosfato inorgánico (cuadrado), pirofosfato inorgánico (círculo) o D-Manosa-1-P (triángulo) como el aceptor de guanilo. Los valores  $v_{max}$  fueron  $0,12 \pm 0,03$ ,  $0,032 \pm 0,002$  y  $0,17 \pm 0,009$  nmoles  $s^{-1} \mu g^{-1}$  de proteína para los sustratos fosfato, pirofosfato y D-manosa-1-P, respectivamente. Los valores  $K_M$  fueron  $4,4 \pm 2$ ;  $0,16 \pm 0,05$  y  $0,11 \pm 0,03$  mM, respectivamente. Se llevaron a cabo los ensayos tres veces con resultados similares.

10 La Figura 4 muestra el efecto de EST 319998 de kiwi expresado de manera transitoria (SEC ID N° 1) sobre contenido de ascorbato y actividad enzimática en hojas de tabaco. Véanse métodos para detalles. Las barras blancas representan concentración de ascorbato (expresado sobre una base de peso fresco) en la hoja, las barras negras la actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa (expresado sobre una base de g de proteína). L1, L2 y L3 representan tres hojas de la parte de arriba que se inyectaron. Las barras de error son el error estándar de la media (n=3 a 6).

15 La Figura 5 muestra reacciones que convierten D-Manosa-1-Fosfato en L-Galactosa-1-Fosfato.

20 La Figura 6 muestra una alineación de un intervalo de secuencias con similitud significativa a At4g26850. Las alineaciones de realizaron usando ClustalX (I). 244893\_Ac y 319998\_Ac son ESTs de *Actinidia chinensis*, 24547\_Ae y 276582\_Ae ESTs de *A. eriantha*, 82552\_Md un EST de *Malus x domestica*, 315905\_Ms un EST de *M. sieboldii* (manzana silvestre) At4g26850 es VTC2 de *Arabidopsis thaliana* y At5g55120 es un homólogo también de *A. thaliana*. BT013858\_Le es una traducción de una entrada de ADN Genbank de tomate (*Lycopersicon esculentum*), Os12g0190000 es una secuencia de *Oryza sativa* (arroz). Contig\_St es un contig se reunió a partir de 95% de solapamientos idénticos de EST de *Solanum tuberosum* (patata) identificados Genbank.

La Figura 7 muestra % de identidad entre las secuencias alineadas en la Figura 6.

25 La Figura 8 muestra un árbol sin raíces de secuencias alineadas anteriormente que muestra agrupamientos de las secuencias de diferentes especies.

La Figura 9 muestra alineaciones (usando ClustalX) de secuencias codificantes de polinucleótidos, que codifican las secuencias de polipéptidos alineadas en la Figura 6.

La Figura 10 muestra identidades en porcentaje entre las secuencias que codifican polinucleótidos alineadas en la Figura 9.

30 La Figura 11 muestra una alineación de las secuencias de polipéptidos de la GDP-D-Manosa epimerasa de SEC ID N° 25 a 35. Se muestran restos alineados idénticos en las cuatro secuencias en gris oscuro, restos similares en gris claro. Las secuencias fueron alineadas usando Clustal X (Jeanmougin et al., 1.998).

La Figura 12 muestra % de identidad de secuencias entre las secuencias alineadas en la Figura 1.

35 La Figura 13 muestra una alineación (usando ClustalX) de secuencias de polinucleótidos de epimerasa de SEC ID N° 5 a 8.

La Figura 14 muestra % de identidad entre las secuencias de polinucleótidos de epimerasa de SEC ID N° 25 a 28.

40 La Figura 15 muestra ascorbato en hojas de tabaco como una función de la cantidad de la GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa (319998) y epimerasa (169164) inyectada en la hoja. Se transformó tabaco de manera transitoria con *Agrobacterium* que contenía uno de cualquiera de los dos genes. Se mezclaron cantidades diferentes antes de inyección, se añadió una cantidad constante de *Agrobacterium* que contenía P19 y se completó el volumen a un nivel constante para todas las mezclas. Se midió el ascorbato después de ~8 días. la valoración de epimerasa (A) y transferasa (B) se muestra a diferentes niveles del otro gen.

La Figura 16 muestra niveles de ascorbato en hojas de tabaco transformado de manera transitoria con un intervalo de construcciones de GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa y epimerasa.

45 La Figura 17 muestra niveles de ascorbato en hojas de tabaco transformado de manera transitoria con una GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa especializada.

50 La Figura 18 muestra segregación de resistencia a la kanamicina en líneas de *Arabidopsis* transformadas de GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa 319998. Se cultivaron semillas en placas de Kanamicina se contaron los números de semillas germinadas verdes y muertas. Verdadero =copia múltiple, Falso =copia única. Los números en negrita fueron llevados sobre la segunda generación (Tabla 3).

La Figura 19 muestra líneas de segunda generación de *Arabidopsis* transformada de GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa 319998 que muestra incidencia de ascorbato alto en hojas. Todas las plantas se seleccionaron

como resistentes a la Kanamicina. Los números entre paréntesis son errores estándar de la media. Ascorbato (ASC) en mg/100 g.

5 La Figura 20 muestra líneas de tercera generación de *Arabidopsis* transformada de GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa 319998 que muestran incidencia de ascorbato alto en hojas. Todas las plantas se seleccionaron como resistentes a Kanamicina. Los números entre paréntesis son errores estándar de la media. Ascorbato (ASC) en mg/100 g.

La Figura 21 muestra expresión de genes y concentraciones de ascorbato de hoja en líneas de *Arabidopsis* transformada de GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa 319998. Se midió la expresión de los genes por qPCR en línea seleccionadas.

10 La Figura 22 muestra niveles de ascorbato en tabaco transformado de GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa 319998 de manera estable y expresión de genes. Se llevó a cabo PCR usando técnicas cualitativas.

15 La Figura 23 muestra actividades enzimáticas de la GDP-L-Glactosa Guaniltransferasa observadas con enzima expresada en *E coli*. Los ensayos se realizaron en una lector de placas Victor antiguo ("antiguo" usando un factor de corrección de 0,000254517 nmoles/F para convertir unidades de fluorescencia en nmoles) o en un Victor 3 más nuevo ("nuevo" factor de corrección 2,6565E-05 nmoles/F) a 20 C.

### Ejemplos

La invención se ilustrará ahora con referencia al siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplo 1: Identificación de un homólogo putativo de *Arabidopsis thaliana* At4g 26850 de kiwi.

20 Las búsquedas con Blast usando At4g26850 de una base de datos EST *Actinidia* patentado del Instituto de Investigación Hortícola y Alimentaria de Nueva Zelanda reveló 120 ESTs con homología a AT4g26850 de un total de más de 132.000 ESTs. Esto procedió de un intervalo de tejidos incluyendo pétalos, fruto, yemas y meristemas y hojas. Los solicitantes seleccionaron EST 319998 de una biblioteca de fruta joven de *Actinidia chinensis*. Las dos proteínas de Arabidopsis y la proteína de kiwi mostraron 71 a 75 por ciento de identidad entre sí. Las secuencias fueron alineadas usando ClustalX (Clustal X (Jeanmougin et al., 1.998) como se muestra en la Figura 1.

25 Ejemplo 2: Uso de análisis bioinformático para revelar una función putativa para At 4g 26850 como una GDP-L-Galactosa-Guaniltransferasa.

Similitud y búsquedas de unidades.

30 PSI Blast (Altschul et al., 1.997; Schaffer et al., 2.001) fue realizado para 6+ iteraciones y se examinaron además los genes identificados por sus anotaciones. La búsqueda de unidades se realizó usando MEME (Bailey y Elkan, 1.994) usando una serie de genes como entrada seleccionada (At4g26850 y miembros de HIT incluyendo GalT).

35 Por búsquedas de BLASTp para genes que codifican proteínas similares a la secuencia de proteínas prevista del gen de Arabidopsis At4g26850 no caracterizado, los solicitantes detectaron inicialmente sólo otros genes breath de plantas que también fueron anotados como similares a At4g26850. Sin embargo, adicionalmente en la lista de genes igualados había miembros de la familia Interpro HIT (IPR001310) de proteínas, que son caracterizados como proteínas de unión de nucleótidos e hidrolasas. La familia incluye diadenosina tetrafosfato (Ap4A) hidrolasa y GalT (D-Galactosa-1 -fosfato uridil transferasa, clase I) (Brenner, 2.002). Por ejemplo, un gen de rata perteneciente a esta familia GalT mostró un valor esperado de 1E-37 con 30% de identidad y 48% de similitud sobre 364 restos de At4g26850. Estas proteínas HIT se caracterizan normalmente por la unidad HXHXH (donde X es un aminoácido hidrófobo) aunque el subgrupo de GalT (también interpro IPR001937) presenta la unidad relacionada HXHXQ. Se ha demostrado que GalT es un miembro de la familia HIT de proteínas basado en análisis estructural (Brenner et al., 1.997).

45 Los solicitantes refinaron esta búsqueda usando PSI-BLAST (Altschul et al., 1.997; Schaffer et al., 2.001) y una categoría principal de secuencias alineadas fueron miembros de la familia HIT. Por ejemplo, después de 6 iteraciones, la primera secuencia alineada no planta fue un gen humano (Genbank 34527348) con 28% de identidad, 47% de similitud (de un total de 373 restos) y un valor esperado de 2E-99. Se encontraron alineaciones similares para genes de una serie de especies de mamíferos, todas con valores E < 2E-93 y descripciones Diadenosina tetrafosfato (Ap4A) hidrolasa y otras hidrolasas de la familia HIT. A menos similitud, los solicitantes observaron un grupo de ATP proteínas de tipo adeniltransferasa (excepto >E-70). A valores esperados mayores (>1E-10) los solicitantes encontraron después genes adicionales con anotaciones HIT.

50 Los solicitantes usaron después un grupo seleccionado de miembros interpro IPR001310 del grupo HIT, más AT4g26850, At4g26850 y EST 319998 (véase la tabla 1) y buscaron unidades usando el sitio web de MEME <http://meme.sdsc.edu> (Bailey y Elkan, 1.994). Los solicitantes identificaron seis unidades significativas que estuvieron presentes en las cinco secuencias de plantas. Cinco de estas unidades que estaban presentes en cuatro secuencias de animales y la secuencia de animal restante presentaron cuatro unidades (Tabla 1). Esto muestra que

estas proteínas están claramente relacionadas y pertenecen a la superfamilia HIT.

Tabla I. Unidades presentes en un intervalo seleccionado de homólogos para kiwi es 319998.

Acceso Genbank	Descripción	Valor E	Longitud	Unidad (en orden lineal)					
				2	5	3	1	6	4
At4g26850	<i>Arabidopsis thaliana</i> VTC2	9,00E-228	442	+	+	+	+	+	+
At5g55120	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,10E-226	431	+	+	+	+	+	+
319998	Enzima de kiwi usada en este documento	3,30E-225	450	+	+	+	+	+	+
ABA96028	tipo VTC2 de arroz	3,30E-210	438	+	+	+	+	+	+
NP_915203	Proteína sin nombre de arroz	2,40E-156	352	+	+	+	+	+	+
BAC85370	Proteína sin nombre de <i>Homo sapiens</i> HIT	4,30E-140	385	+	+	+	+		+
BAE25508	Proteína sin nombre de <i>Mus musculus</i> HIT	5,00E-139	386	+	+	+	+		+
XP_689388	Tipo VTC2 <i>Danio rerio</i>	3,70E-138	343	+	+	+	+		+
AAI21599	Proteína sin nombre <i>Xenopus tropicalis</i>	7,60E-135	399	+	+	+	+		+
CAG03444	Proteína sin nombre <i>Tetraodon nigroviridis</i>	1,80E-102	288		+	+	+		+

5 La unidad 1 incluía el patrón de diagnóstico HxHxQ (de HxHxH) (véase la Figura 1). Curiosamente, la subfamilia de GalT de la familia HIT también comparte este patrón HxHxQ, aunque no se pudieron descubrir unidades en común con esta secuencia.

De estos análisis bioinformáticos, parece posible que el gen responsable del VTC2 mutante de ácido ascórbico (At4g26850) y su homólogo de kiwi codificaran una guaniltransferasa.

10 Ejemplo 3: Expresión de EST 319998 de GDP-L-Glactosa guaniltransferasa de kiwi y At4g26850 de *Arabidopsis thaliana* en *E. coli* y caracterización de actividad enzimática.

Materiales y métodos

15 Expresión de genes en *E. coli*. EST 319998 de fruta joven de *Actinidia chinensis* y At4g26850 se clonaron cada uno en pET30A (Novagene, USA), se comprobó su secuencia y se expresó en *E. coli*. La etiqueta del N terminal His<sub>6</sub> se usó para purificar la proteína. Se expresó un control de vector vacío y se purificó en paralelo. Las técnicas fueron esencialmente como se describió anteriormente (Laing et al., 2004). En gran parte de este trabajo se purificó además la proteína His en una columna de 5 ml HiTrap Q FF (GE Healthcare), y se tuvieron idénticos resultados con ambas preparaciones.

Enzimas de acoplamiento:

20 Se clonó L-Galactosa deshidrogenasa (acceso GenBank AA018639 (EST 56121) 1,5 ug/ensayo) de un EST procedente de una biblioteca de yemas brotadas de *A. deliciosa* (kiwi) con una presecuencia de proteínas de unión a maltosa y se ensayó como se describió previamente (Laing et al., 2004). Se clonó L-Galactosa-1-Fosfato

fosfatasa, de *Arabidopsis thaliana* (At3g02870, 3,1 ug/ensayo) y se ensayó como se describe (Laing et al., 2.004). Se clonó GDP-D-Manosa 3',5'-Epimerasa (198296) de yemas latentes de kiwi (*A. deliciosa*) tres días después de tratamiento con cianamida de hidrógeno y se ensayó como se describe (Wolucka et al., 2.001). Las dos enzimas primeras son altamente específicas en cuanto a sus sustratos (Laing et al., 2.004; Laing et al., 2.004).

- 5 GDP-L-Galactosa (~ 50% pura, contaminada con los productos descompuestos GDP y L-Galactosa-1-Fosfato como se muestra por HPLC y LCMS) y L-Galactosa-1-Fosfato se adquirieron de Glycoteam, Hamburg, Alemania. Los solicitantes encontraron que la GDP-L-Galactosa era la vil extremadamente ácida no intentaron purificarla más. Se adquirieron otros productos bioquímicos de Sigma.

Ensayos de actividad:

- 10 Se realizó el ensayo para GDP-L-Galactosa-1-Fosfato Guaniltransferasa en TrisCl 20 mM, pH 8,0, GDP-L-Galactosa, con D-Manosa-1-Fosfato 1 mM. Se usó GDP-L-Galactosa directamente del producto Glycoteam (en cuyo caso se observaron altos fondos debido a L-Galactosa-1-Fosfato contaminante) o se generó GDP-L-Galactosa usando la epimerasa. En el último caso, se incubaron 0,21 mg de epimerasa con GDP-D-Manosa en Tris Cl 20 mM pH 8 en un volumen total de 400 ul (véase Wolucka et al., 2.001) durante 30 minutos a 20C y después se usó  
15 directamente en el ensayo a una dilución 1 a 20. Se terminaron los ensayos después de 10 minutos por calentamiento a 100 °C durante tres minutos o directamente acoplado a la fosfatasa y L-Galactosa deshidrogenasa para medir la formación de producto durante el ensayo. Los ensayos terminados con calor se enfriaron sobre hielo, se centrifugaron para eliminar la proteína precipitada y se ensayó L-Galactosa usando las enzimas de acoplamiento descritas anteriormente (véase también (Laing et al., 2.004)). Los ensayos para L-Galactosa fueron lineales con L-Galactosa-1-Fosfato añadido por el intervalo medido. Se realizaron fondos usando el control de vector vacío, que  
20 proporciona el mismo resultado que un control de enzima hervida.

- Como un ensayo alternativo, se usó LCMS para identificar la reacción delantera descrita anteriormente así como medir la reacción de la pirofosforilasa inversa donde se incubaron GTP (1 mM) y L-Galactosa-1-Fosfato como anteriormente y siguió la formación de GDP-L-Galactosa. Se separaron GDP-D-Manosa y GDP-L-Galactosa por  
25 HPLC antes de MS. LC-MS empleó un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ provisto de una interfase ESI (ThermoQuest, Finnigan, San Jose, CA, USA) acoplado a un Ettan™ MDLC (GE Healthcare Bio-Sciences). La separación de GDP-D-Manosa y GDP- L-Galactosa se consiguió usando una columna Hypercarb (Thermo Electron, USA), 100 x 2,1 mm mantenida a 40 °C. Los disolventes fueron (A) acetato de amonio 50 mM y (B) acetonitrilo y el caudal fue 200 ul/min. La fase móvil inicial, se mantuvo al 5% de B durante 3 min, después en  
30 gradiente positivo de manera lineal a 20% de B a 11 min, mantenido durante 5 min, después en gradiente positivo, de manera lineal a 70% de B a 19 min y mantenido durante 5 min antes de restablecimiento de las condiciones originales. Los tiempos de retención para GDP-D-Manosa y GDP-L-Galactosa fueron 16,8 min y 17,5 min, respectivamente.

- Se adquirieron datos de MS en el modo negativo usando tanto un método de control de la reacción selectivo (SRM, por sus siglas en inglés) SRM m/z 604 > m/z 344, 362, 424, 442 como un método de control de iones seleccionados (SIM, por sus siglas en inglés) SIM m/z 604. Este método SIM controla sólo el ión (M-H)- para la GDP-D-Manosa y GDP-L-Galactosa mientras el método SRM controla los iones producto distintivos formados por fragmentación del  
35 ión precursor (M-H)- para ambos compuestos. Ambos métodos maximizan la sensibilidad investigando cualquier ruido químico de otros compuestos presentes. El voltaje ESI, temperatura capilar, presión del gas de la envoltura, gas de barrido y gas auxiliar se fijaron a -10 V, 350° C, 172 kPa (25 psi), 221 kPa (3 psi) y 221 kPa (3 psi), respectivamente. La separación de D-Manosa-1-Fosfato y L-Galactosa-1-Fosfato se consiguió isocráticamente usando una columna Hypercarb (Thermo Electron, USA), 100 x 2,1 mm mantenida a 40°C. Los disolventes fueron (A) acetato de amonio 20 mM y (B) metanol y el caudal fue 200 ul/min. Usando una fase móvil de 2% de B los  
40 tiempos de retención para D-Manosa-1-Fosfato y L-Galactosa-1-Fosfato fueron 4,3 min y 4,9 min, respectivamente. Se adquirieron datos de MS en el modo negativo usando ambos un método de control de la reacción selectivo (SRM) SRM m/z 259 > m/z 79, 97 y un método de control de iones seleccionados (SIM) SIM m/z 259.

- Se midió la actividad de la transferasa en hojas de tabaco por extracción de hojas molidas en nitrógeno líquido en aproximadamente cinco volúmenes de TrisCl pH 8,0, DTT 2 mM y AEDT 1 mM, centrifugación, desalación del sobrenadante usando una columna de desalación NAP equilibrada con el mismo tampón y ensayando la enzima  
50 usando el ensayo acoplado descrito anteriormente. Se midió la proteína en los extractos usando el ensayo Biorad Bradford Coumassie (Bradford, 1.976) usando BSA como un estándar.

Resultados

- Los solicitantes expresaron estos genes en *E. coli* en el vector pET30 y purificaron la proteína usando la etiqueta His y una columna de quelación de Ni. La proteína apareció en un gel SDS a ~55 KD y constituyó aproximadamente  
55 90% de la proteína aislada. Los controles conteniendo el vector pET30 vacío también fueron tratados de la misma manera.

Los solicitantes usaron dos ensayos para caracterizar la enzima, usando dos fuentes del sustrato GDP-L-Galactosa. El primer ensayo usó las enzimas de acoplamiento expresadas en *E. coli* L-Galactosa-1-Fosfato fosfatasa y L-

Galactosa deshidrogenasa. La fosfatasa es altamente específica a L-Galactosa-1-Fosfato, desfosforilando significativamente sólo de otro modo mio-inositol-1-P (Laing et al., 2004). La deshidrogenasa es específica a L-Galactosa, no reaccionando con D-Manosa o D-Galactosa o un intervalo de otros azúcares (Gatzek et al., 2002; Laing et al., 2004) excepto L-Gulosa. Con este último sustrato, la L-Galactosa deshidrogenasa, mostró aproximadamente 2,5 veces la velocidad máxima superior y 30 veces el  $K_M$  (sustrato) dando como resultado aproximadamente 8% de actividad con L-Gulosa comparado con L-Galactosa a concentraciones de sustrato limitantes. Por consiguiente, nuestro ensayo acoplado mediría principalmente L-Galactosa y también L-Gulosa. Los solicitantes miden el producto formado por adición de las enzimas de acoplamiento en el ensayo y midiendo el transcurso del tiempo de NADH formado o por detención de la reacción después de 10 minutos hirviendo durante 3 minutos y centrifugando. Para este último ensayo de tiempo fijado, los solicitantes añadiendo después enzimas de acoplamiento para medir la producción de L-Galactosa o usando la LCMS para medir los productos. La LCMS se usó sólo para confirmar los resultados de la reacción de enzima acoplada y para medir la reacción inversa.

Usando tanto la LCMS como la reacción acoplada para medir productos quedó claro que EST 319998 y At4g26 de kiwi expresados en *E. coli* podían catalizar la conversión de la GDP-L-Galactosa en L-Galactosa-1-P. Dependiendo de la concentración de enzima, los transcurros de tiempo fueron lineales durante hasta ~10 minutos y la velocidad de la reacción fue lineal con enzima añadida durante el intervalo ensayado (datos no mostrados). No tuvo lugar reacción en presencia de enzima hervida o vector vacío (Figura 2). D-manosa-1-P fue un aceptor mejor para el resto guanilo que fosfato o pirofosfato, pero se observó reacción con estos dos últimos compuestos en concentraciones fisiológicas de estos sustratos (Figura 3). No se observó actividad de reducción de NAD con GDP-D-Manosa sin epimerasa o con sustrato y sin las enzimas de acoplamiento (datos no mostrados). Las reacciones usando GDP-L-Galactosa-1-Fosfato adquirido comercialmente presentó grandes fondos debido a la L-Galactosa-1-Fosfato contaminante y se ensayaron usando el procedimiento de tiempo fijado. Este sustrato mostró una velocidad ligeramente mayor que la observada con el sustrato generado de epimerasa. Se ensayaron otros aceptores de guanilo y se encontró que la enzima aceptaba un amplio intervalo de sustratos de Hexosa-1-P aunque la D-Glucosa-6-P reaccionaba a sólo aproximadamente 25% de la velocidad de los mejores aceptores (Tabla 2). La reacción no requirió Mg (datos no mostrados) aunque se incluyó Mg en el ensayo acoplado ya que la fosfatasa requería Mg.

Usando ensayos acoplados la secuencia de *Arabidopsis* expresada (At4g26850) también mostró actividad de la transferasa (datos no mostrados) con propiedades similares al EST 319998 de kiwi.

Tabla 2. Efecto de diferentes fosfatos de azúcar para actuar como aceptores de guanilo para la actividad de la transferasa. Se ensayó enzima usando el sustrato generado de epimerasa y el ensayo acoplado continuo con otras condiciones como se describe en los métodos. N=6. (transcurros de tiempo 319998.11 10 06.xls)

Sustrato	Velocidad nmoles/s/ug proteína	Error Std	% de D- manosa-1 P
D-Glucosa-1-P	0,35	0,036	106
D-Glucosa-6-P	0,08	0,002	24
D-Glucosa-1-P	0,24	0,05	74
L-Mioinositol-1-P	0,42	0,07	126
D-Galactosa-1-P	0,38	0,01	113
D-Manosa-1-P	0,33	0,07	100

Los productos de la reacción se confirmaron usando LC espectrometría de masa para ser L- Galactosa-1-Fosfato (Tabla 3). Esto implicó la separación de los productos de la reacción usando cromatografía líquida, que separó L-Galactosa de D-Manosa y GDP-L-Galactosa de GDP-D-Manosa y confirmación de la identidad de los productos por su masa medida. Se detectó poca o ninguna reacción de nuevo.

Tabla 3. Medición de la actividad de la transferasa por LCMS. Se midió actividad usando un ensayo de tiempo fijado a concentración de proteína alta o baja y diferentes combinaciones de aceptor y sustrato como se muestra en la tabla. Los ensayos se destruyeron hirviendo y se midieron alícuotas usando enzimas de acoplamiento o por LCMS. nm es no medido.

sustrato	aceptor	ug proteína	nmoles/s/ug proteína	
			Ensayo	LCMS
			acoplado	
GDPMan/epim	Manosa-1-P	0,057	0,012	0,0094
GDPMan/epim	Ninguno	1,14	0,00038	0,00031
GDPMan/epim	ninguno	0,057	0,00012	0
GDPGal	Manosa-1-P	0,057	0,017	alto BG
GDPMan/epim	PPi	1,14	0,00095	0,0013
GDPMan/epim	PPi	0,057	0,0026	0,0031
GDPMan	Gal1P	1,14	nm	0
GDPMan	Gal1P	0,057	nm	0
GTP	Gal1P	1,14	nm	0
GTP	Gal1P	0,057	nm	0

Ejemplo 4: Actividad de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa y producción de ascorbato aumentados en plantas por expresión de polinucleótidos de transferasa de la invención.

Transformación transitoria de hojas de tabaco.

5 Se transformó de manera transitoria tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con *Agrobacterium* que contenía el gen del kiwi para GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa (EST 319998) clonado en pGreen (Hellens et al., 2.000) mezclado con *Agrobacterium* que contenía el gen para silenciar supresor P19 como se describió previamente (Hellens et al., 2.005). Se realizaron controles usando *Agrobacterium* que contenía P19 en pGreen sólo. Se recogieron hojas de tabaco 9 días después de la transformación y se congelaron en nitrógeno líquido.

10 Medición de ascorbato.

Se extrajo ascorbato como se describió previamente en ácido metafosfórico sin agente reductor (Davey et al., 2.003; Rassam y Laing, 2.005).

15 Cuando se transformaron de manera transitoria hojas de tabaco con un clon de *Agrobacterium* que contenía EST 319998 de kiwi en el vector pGreen mezclado con P19 como supresor de silenciamiento, se pudo medir la actividad medible en el extracto de las hojas (Figura 4A). Se observó poca actividad (~2% de transformado) en las hojas de tabaco transformadas sólo con P19 sólo (Figura 4). El nivel bajo de enzima en los controles es típico de otras enzimas en la ruta de la L-Galactosa de la biosíntesis del ascorbato (W Laing, observaciones no publicadas).

20 La actividad estuvo presente en una serie de hojas de diferentes edades inyectadas con *Agrobacterium*. Las mismas hojas 319998 transformadas mostraron un incremento de tres veces muy significativo en ascorbato comparado con las hojas de control (Figura 4).

Ejemplo 5: El análisis de expresión de genes de genes de la ruta del ascorbato en kiwi muestra que la alta expresión de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa se asocia a la producción de ascorbato aumentada.

25 La expresión de genes de genes para las etapas comprometidas en la ruta de la L-galactosa de la biosíntesis de ascorbato de fruta que se desarrolla de dos especies de kiwi se midió usando qPCR. *Actinidia deliciosa* presenta 100 mg/100 g FW de ascorbato y *A. eriantha* presenta 10 veces más ascorbato. La única etapa que muestra un fuerte aumento en la expresión de los genes, en paralelo con el aumento en ascorbato, es el gen para la GDP-L-Galactosa-1, Fosfato transferasa (Tabla 1s). Esto soporta la observación de que la sobreexpresión de este mismo gen en hojas de tabaco da como resultado un aumento de tres veces en los niveles de ascorbato.

30 Tabla 1s: Nivel relativo de expresión de miembros de la ruta biosintética del ácido L-galactosa ascórbico comparado con un gen doméstico (PPRSA; expresión fijada a 1) en Hayward y fruta *A. eriantha* a las cuatro semanas después de antesis.

ES 2 543 130 T3

Enzima	Sustrato	<i>A. deliciosa</i> (Hayward)	<i>A. eriantha</i> (11-4-18a)	Veces cambio
GDP-manosa-3',5'- epimerasa	GDP-manosa	1,8	2,4	1,3
GDP-L- Galactosa Guaniltransferasa	GDP-L-galactosa	4,1	31,2*	7,6
L-galactosa-1- fosfato fosfatasa	L-galactosa-1-fosfato	0,7	1,8 *	2,6
L-galactosa deshidrogenasa	L-galactosa	1,5	1,2*	0,8
L-galactono-1,4- lactona deshidrogenasa	L-galactono-1,4-lactona	No ensayado	No ensayado	-
ácido L- ascórbico ácido L- ascórbico en 4 semanas después de anthesis fruta (mg/100 mg peso fresco)		100	1.085	10,9

\* significativamente diferente a Hayward (p=0,05)

Ejemplo 6: Variantes de EST de kiwi para GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

Se identificaron diversas secuencias de variantes de EST de kiwi para GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa descrita esencialmente como se describió en el Ejemplo 2, de Genbank o de las bases de datos patentadas EST HorfResearch de las secuencias de *Actinidia* y *Malus*. Se alinearon las once secuencias de proteínas por Clustal X (Jeanmougin et al., 1.998, *Trends Biochem. Sci.* 23, 403-5.) como se muestra en la Figura 6.

Las secuencias mostraron todas regiones de fuerte homología e incluyeron dos unidades completamente conservadas: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12) y GYNLGFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13) que se identificaron por inspección visual de las secuencias alineadas.

Cuando se usó la secuencia (SEC ID N° 12 o 13) en un blastp (Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1.990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215: 403-410) búsqueda de la base de datos de proteínas traducidas de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Proteína>) el 3 de marzo de 2.007, no se identificaron secuencias de plantas adicionales que contuvieran las unidades perfectamente conservadas, distintas de las descritas en el listado de secuencias de la presente solicitud.

Cualquier unidad de secuencias parece ser diagnosticada por lo tanto de la GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa de la invención o usada en los métodos de la invención.

El % de identidad entre todas las secuencias de polipéptidos se muestra en la Figura 7.

La Figura 8, muestra el árbol sin raíces donde las secuencias de manzana y kiwi agrupadas entre sí y las secuencias

de arroz y tomate están más aisladas. Se identificaron las secuencias usando búsquedas Blastp de bases de datos Genbank y HorfResearch y alineadas usando ClustalX y visualizadas usando Treeview.

5 Las secuencias de ADN para la región codificadora de cada secuencia de polinucleótidos también se alinearon usando Clustal X como se muestra en la Figura 9. El % de identidad de secuencias entre todas las secuencias codificadoras de polinucleótidos se muestra en la Figura 10.

Ejemplo 7: Identificación de una secuencia de la GDP-D-Manosa epimerasa de kiwi y manzana.

10 Los solicitantes realizaron búsquedas de Blast de las bases de datos EST *Actinidia* y *Malus* patentadas del Instituto de Investigación Hortícola y Alimentaria de Nueva Zelanda para identificar ESTs con homología a At5g28840. Los solicitantes seleccionaron tres secuencias, dos de kiwi (169164\_KUFA: SEC ID N° 38 y 1998296\_KALA: SEC ID N° 39) y uno de manzana (108403\_AAOA: SEC ID N° 40) como secuencias codificadoras de la GDP-D-Manosa epimerasa potenciales. Las correspondientes secuencias de polipéptidos se muestran en SEC ID N° 25, 26 y 27, respectivamente. Los solicitantes también identifican otras secuencias de GDP-D-Manosa epimerasa de bases de datos públicas con las secuencias de polinucleótidos de SEC ID N° 42 a 48, que codifican las secuencias de polipéptidos de SEC ID N° 29 a 35. Las secuencias de polipéptido se alinearon usando ClustalX (Clustal X (Jeanmougin et al., 1.998) como se muestra en la Figura 11. El nivel de % de identidad de secuencias entre las secuencias se muestra en la Figura 12.

Los solicitantes también identificaron dos unidades de secuencias (SEC ID N° 36 y 37) que se conservan completamente en todas las secuencias alineadas.

20 Ejemplo 8: Expresión de secuencia de la GDP-D-Manosa epimerasa de kiwi en *E. coli* y caracterización de actividad enzimática.

Materiales y métodos

25 Se clonó la secuencia 198296\_KALA (SEC ID N° 39) de *Actinidia deliciosa* usando técnicas clásicas en pET30A (Novagene, USA) y se expresó en *E. coli*. Se usó la etiqueta His<sub>6</sub> N terminal para purificar la proteína. Se expresó un control de vector vacío y se purificó en paralelo. Las técnicas fueron esencialmente como se describió anteriormente (Laing et al., 2.004). Se desaló la proteína His en una columna de 5 ml HiTrap Q FF (GE Healthcare). Los métodos fueron como se describe en el Ejemplo 3.

Se ensayó la actividad enzimática como se describe (Wolucka et al., 2.001).

30 Se incubaron 0,21 mg de epimerasa con GDP-D-Manosa en Tris Cl 20 mM pH 8 en un volumen total de 400 ul (véase Wolucka et al., 2.001) durante 30 minutos a 20°C. Se separaron los productos de la reacción por HPLC para identificar GDP-L-Galactosa recién sintetizada, el producto de la reacción. Típicamente se usó una columna de fase inversa.

Resultados

La proteína apareció en un gel SDS a ~50 KD y constituyó aproximadamente 90% de la proteína es nada. Los controles que contenían el vector pET30 vacío se trataron también de la misma manera.

35 Ejemplo 9: Actividad de la GDP-D-Manosa epimerasa y producción de ascorbato creciente en plantas por expresión del polinucleótido epimerasa de la invención.

Transformación transitoria de hojas de tabaco.

40 Se transformó de manera transitoria tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con cultivos de *Agrobacterium* separados conteniendo los genes de kiwi para GDP-D-Manosa epimerasa (169164\_KUFA: SEC ID N° 38) y/o GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa (EST 319998\_Ac SEC ID N° 14) clonados en pGreen (Hellens et al., 2.000) mezclados con *Agrobacterium* que contiene el gen para el supresor de silenciamiento P19 como se describió previamente (Hellens et al., 2.005). Se realizaron los controles usando *Agrobacterium* que contenían P19 en pGreen sólo. Se recogieron hojas de tabaco 9 días después de la transformación y se congelaron en nitrógeno líquido.

Medición de ascorbato.

45 Se extrajo ascorbato como se describió previamente en ácido metafosfórico sin agente reductor (Davey et al., 2.003; Rassam y Laing, 2.005).

50 Cuando se transformaron de manera transitoria hojas de tabaco con un clon de *Agrobacterium* que contenía EST 319998 de kiwi en el vector pGreen mezclado con P19 como un supresor de silenciamiento, se pudo medir la actividad medible en el extracto de las hojas. Se observó poca actividad (~2% de la transformada) en las hojas de tabaco transformadas sólo con P19 solo.

La infiltración de las hojas con *Agrobacterium* que contenía el vector pGreen que soportaba la epimerasa o P19, o

inyección con agua que contenía sólo aceto-siringinona, no tuvo efecto sobre los niveles de ascorbato en la hoja. La infiltración de las hojas de tabaco con *Agrobacterium* soportando el gen para la transferasa dio como resultado niveles de ascorbato en la hoja de tabaco ascendiendo a ~3 tres veces como se demostró previamente (Laing et al., 2.007). Sin embargo, la inyección de la hoja con una mezcla de epimerasa y transferasa elevó los niveles de ascorbato otras 2 veces (Tabla 2) para un total de ~6 veces, como se muestra en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Los niveles de ascorbato en las hojas encontrados después de expresión transitoria de los genes para la GDP-L-Galactosa Guanil Transferasa (319998) o la GDP-D-Manosa Epimerasa (169164) por separado o juntas. En cada caso, el gen para la proteína supresora vírica, P19, también se expresó con los otros dos genes. Los controles usaron P19 solo, o el agente de infección de *Agrobacterium* aceto-siringona solo (resultados idénticos). Los datos representan la media de tres plantas, tres hojas por planta (9 mediciones, excepto los controles donde los datos representan 18 mediciones).

Tratamiento	promedio	SE	Cantidad relativa de ascorbato
Controles	34,2	2,7	1,0
Epimerasa	33,3	2,3	1,0
Transferasa	102,0	7,4	3,0
Epim + Trans	194,2	22,6	5,7

Estos experimentos muestran que la sobreexpresión de la secuencia de epimerasa de la invención puede aumentar la producción de ascorbato en las plantas. Esto se demuestra por un incremento de dos veces adicional de los niveles de ascorbato en las plantas ya aumentado (3 veces) en ascorbato, debido a sobreexpresión de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.

Ejemplo 10: Variación de la relación de las secuencias de transferasa y epimerasa de la invención expresadas en plantas para manipular la producción de ascorbato.

Sobreexpresión transitoria en tabaco.

El sistema de expresión transitoria (Hellens *et al.*, 2.005) se usó para transformar *Nicotiana benthamiana* por inyección de cultivos de *Agrobacterium* suspendidos conteniendo el gen de interés. La GDP-Manosa epimerasa fue el EST 169164 de *A. eriantha* y la transferasa fue el EST 319998 de *A. chinensis*.

Después se recogieron las hojas y se midieron los niveles de ascorbato. Además en algunos casos, también se midió la actividad enzimática.

Los métodos usados fueron como se describió en el Ejemplo 9.

Se estudió la interacción y la sinergia entre las secuencias de epimerasa y transferasa de la invención mediante una valoración de ambos genes inyectados en hojas de tabaco como mezclas. Los volúmenes de transferasa (EST 319998) y epimerasa (169164) conteniendo suspensiones de *Agrobacterium* se variaron desde cero añadido, 0,01, 0,1 y 1 ml, en todas las combinaciones de cada enzima con la otra. También se añadió P19 en todos los casos para evitar la silencianción de genes.

Los resultados (Figura 15) muestran que los niveles aumentados de la epimerasa en ausencia de la transferasa no tiene efecto de ascorbato en la hoja. Sin embargo, en presencia de transferasa, el ascorbato responde a epimerasa aumentada en una curva que satura. Por otra parte, a medida que aumenta la transferasa en presencia de diferentes cantidades de epimerasa, no se alcanza la saturación. Estos datos muestran que los dos genes actúan de manera sinérgica, pero que se requieren volúmenes mayores de transferasa para alcanzar concentraciones máximas de ascorbato en la hoja que la epimerasa. En este experimento, los solicitantes observaron un aumento de 7,5 veces en ascorbato de la hoja en las cantidades máximas de las dos enzimas usadas. Ajustando un modelo hiperbólico simple para los datos predice incremento de más de 9 veces de ascorbato en la hoja a transferasa y epimerasa de saturación.

Ejemplo 11: La expresión de una secuencia de epimerasa de la invención junto con una variedad de secuencias de transferasa de la invención aumenta la producción de ascorbato en las plantas.

Se midió la producción de ascorbato en hojas de tabaco transformadas de manera transitoria (por métodos descritos en el Ejemplo 8) con un gen de la GDP-L-Galactosa transferasa de kiwi (319998\_Ac), tomate (BT013858\_Lc) y

manzana (82552\_Md) en presencia de la epimerasa (169164) de kiwi. También se realizó la transformación de 319998 de kiwi en tres combinaciones de construcción de vector/ cepa *Agrobacterium* diferentes. Los resultados se muestran en la Figura 16. Para todas las especies mostradas, la transferasa aumentó los niveles de ascorbato en la hoja y añadir epimerasa aumentó más el ascorbato en un modo sinérgico. EST 319998 fue normalmente el gen más eficaz haciendo esto. Los tres diferentes vectores y los clones de *Agrobacterium* actuaron de manera similar.

Los solicitantes también comprobaron que dos construcciones especializadas de 319998.

La primera fue la transferasa 319998 clonada en pGreenII 0229 62-SK (Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2.000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-32) que proporcionaron resistencia a bialafos. Esta construcción se puede usar para producir plantas doblemente transformadas con tanto transferasa como epimerasa en la misma planta, pero con dos marcadores seleccionables diferentes, permitiendo la selección de ambos genes. Los resultados en la Figura 17 muestran que esta construcción es completamente funcional. Este experimento también compara las epimerasas de kiwi (169164) y manzana (108403) y demostró que ambas eran eficaces en aumentar de manera sinérgica el ascorbato con la transferasa.

La segunda construcción incluía una etiqueta His frente al gen de la secuencia 31998 de transferasa en pGreen, para facilitar la purificación de la proteína de una fuente vegetal. Cuando se transforman de manera transitoria en hojas de tabaco, esto fue activo en aumentar el ascorbato de la hoja (Figura 17).

Ejemplo 12: La expresión de la secuencia de transferasa de la invención en plantas transgénicas aumenta la producción de ascorbato.

Los solicitantes generaron plantas de *Arabidopsis* transformadas por inmersión floral con *Agrobacterium* que contenía la transferasa 319998 en pGreen (Clough SJ y Bent AF, 1.998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-7.430. Se recogió simiente y se seleccionaron líneas resistentes a Kanamicina. Se recuperaron 44 líneas resistentes a Kanamicina, de las cuales se ensayaron 19 por la relación de segregación de resistencia a la kanamicina. Estos datos se muestran en la Figura 18.

Sobre la base de estos datos se seleccionaron las siguientes líneas para estudio adicional: 2, 6, 8, 16, 21, 34, 37, 40, 41, 43, 44 tres de las cuales sólo presentaron un inserto.

En la segunda generación, hasta 12 plantas de cada línea, seleccionadas de las placas de Kanamicina, se cultivaron a un tamaño estándar de una roseta completa de hojas en el invernadero y se midió el ascorbato (Figura 19). En las 11 líneas seleccionadas sobre la base de la resistencia Kanamicina, 9 mostraron ascorbato significativamente aumentado. El ascorbato aumentado osciló hasta más de 4 veces el nivel normal de ascorbato en hojas de *Arabidopsis*. Algunas plantas mostraron ascorbato reducido comparado con las plantas de control (por ejemplo, líneas 8 y 16) sugiriendo que tenía lugar silenciamiento de genes. Estas líneas presentaban una mezcla de plantas de ascorbato alto y bajo dentro de la línea.

Se llevaron plantas seleccionadas de la segunda generación a la siguiente generación. Se comprobaron plantas por crecimiento en placas de Kanamicina por presencia del marcador seleccionable y se demostró que eran resistentes a Kanamicina. De nuevo los solicitantes observaron plantas con ascorbato en la hoja más de 4 veces el nivel del control (Figura 20), pero de nuevo dentro de una línea con progenie de ascorbato alto, siempre había plantas con ascorbato alto y bajo a pesar de que todas las plantas venían de un precursor resistente a kanamicina de ascorbato alto. De nuevo esto sugiere que está teniendo lugar silenciamiento de genes. Éste es especialmente el caso cuando los niveles de ascorbato caen por debajo del ascorbato de la hoja en plantas no transformadas que también sugiere que también se silenciaban los genes endógenos. Se encontraron regiones de identidad de secuencias completa, cuando la secuencia de 319998 y *Arabidopsis* se alinean (datos no mostrados). Esto podía justificar la silenciamiento aparente observada.

Los solicitantes comprobaron la tercera generación de plantas para expresión de genes del 319998 (Figura 21). En cada caso, las plantas con alto ascorbato relativo a los controles también mostraron expresión aumentada de 319998. En un caso, una planta con bajo ascorbato (no había plantas en esta línea con alto ascorbato) también demostró alta expresión de 319998. Esto se puede interpretar que significa que durante la silenciamiento de genes en esta línea, alguna expresión de genes ocurría, cuando se mide por nuestro método qPCR.

Ejemplo 13: La expresión del gen de la transferasa de la invención en tabaco transgénico da como resultado contenido en ascorbato aumentado.

Se transformó tabaco con 319998 y se seleccionaron líneas resistentes a Kanamicina. Estas plantas se transfirieron al suelo y crecieron hasta que se expandieron varias hojas. Se midió el ascorbato y la expresión de genes en estas hojas (Figura 22). Muchas líneas mostraron expresión de genes y dos líneas también mostraron un aumento significativo en ascorbato en la hoja de 60%.

Se transformó *Nicotiana tabacum* 'Samsun' usando cepa GV101 de *Agrobacterium tumefaciens* llevando el vector

pHex que contenía EST 319998. Los métodos usados fueron como se describe por Guerineau et al (1.990), excepto que se usó kanamicina en vez de agentes selectivos de sulfonamida a la velocidad de 100 mg.l-1.

Ejemplo 14: Expresión de secuencias de transferasa y epimerasa de la invención en *E. coli* y demostración de actividad enzimática.

- 5 Se clonaron varios genes de transferasa en el vector pET30 y se transformaron en *E. coli*. Se expresó proteína con una etiqueta His-Trap, se extrajo, se purificó mediante cromatografía de ión de metal y se desaló usando una columna G25, se midió la actividad usando un ensayo acoplado donde se realizaron los ensayos usando una mezcla de GDP-D-Manosa/GDP-L-Galactosa (generada por mezcla de proteína GDP-Manosa epimerasa expresada de EST 198296 con GDP-manosa) como el sustrato. Esta mezcla de sustrato se incubó con la transferasa que se estaba ensayando, con un exceso de enzimas de acoplamiento (más epimerasa, L-Galactosa fosfatasa, L-Galactosa deshidrogenasa) y Bis tris propano 50 mM, pH 7,5, NAD 0,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM. Los ensayos fueron lineales con el tiempo y la cantidad transferasa añadida.

- 10 La actividad medida estaba en el intervalo de 0,1 a 0,7 nmoles/mg de proteína/s (Figura 23). Todos los genes expresados ensayados mostraron actividad de transferasa. Además, *E coli* expresó ESTs 198296 y 108403 también mostraron actividad de epimerasa (datos no mostrados) cuando se mide por HPLC y ensayo de acoplamiento directo.

- 15 No se tiene la intención de limitar el alcance de la invención a los ejemplos mencionados solo. Como apreciaría un experto en la materia, son posibles muchas variaciones sin apartarse del alcance de la invención.

**REFERENCIAS**

Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol* 21: 177-181.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Bailey TL, Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. AAAI Press, Menlo Park, California, pp 28-36.

Bartoli CG, Guiamet JJ, Kiddle G, Pastori GM, Di Cagno R, Theodoulou FL, Foyer CH (2005) Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell and Environment* 28: 1073-1081.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brenner C (2002) Hint, Fhit, and GalT: Function, Structure, Evolution, and Mechanism of Three Branches of the Histidine Triad Superfamily of Nucleotide Hydrolases and Transferases. *Biochemistry* 41: 9003-9014.

Brenner C, Garrison P, Gilmour J, Peisach D, Ringe D, Petsko GA, Lowenstein JM (1997) Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat Struct Biol* 4: 231-238.

Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci* 100: 3525-3530.

Conklin PL (1998) Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant. *Trends Plant Sci* 3: 329-330.

Conklin PL, Gatzek S, Wheeler GL, Dowdle J, Raymond MJ, Rolinski S, Isupov M, Littlechild JA, Smirnoff N (2006) *Arabidopsis thaliana* VTC4 Encodes L-Galactose-1-P Phosphatase, a Plant Ascorbic Acid Biosynthetic Enzyme. *J. Biol. Chem.* 281: 15662-15670.

Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4198-4203.

Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000) Identification of Ascorbic Acid-Deficient *Arabidopsis thaliana* Mutants. *Genetics* 154: 847-856.

Davey MW, Dekempeneer E, Keulemans J (2003) Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Analytical Biochemistry* 316: 74-81.

Ferguson AR, MacRae EA (1992) Vitamin C in Actinidia. *Acta Horticulture* 297: 481-487.

Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N (2002) Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. *Plant Journal* 30: 541-553.

Guerineau F, Brooks L, Meadows J, Lucy A, Robinson C, Mullineaux P (1990) Sulfonamide resistance gene for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 15: 127-136

Hellens R, Allan A, Friel E, Bolitho K, Grafton K, Templeton M, Karunairetnam S, Gleave A, Laing W (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1: 13.

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42: 819-832.

Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003) Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *J. Biol. Chem.* 278: 43885-43888.

Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Oba K, Hirai M (1998) L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase from sweet potato: Purification and cDNA sequence analysis. *Plant and Cell Physiology* 39: 1350-1358.

Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 343-355.

Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL (2002) Arabidopsis Map-Based Cloning in the Post-Genome Era. *Plant Physiol.* 129: 440-450.

Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23: 403-405.

Keller R, Renz FS, Kossmann J (1999) Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J* 19: 131-141.

Laing WA, Barraclough D, Bulley S, Cooney J, Wright M, Macrae E (2004) A specific L-Galactose-1-Phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 16976-16981.

Laing WA, Frearson N, Bulley S, MacCrae E (2004) Kiwifruit L-Galactose dehydrogenase; molecular, biochemical and physiological aspects of the enzyme. *Functional Plant Biology* 31: 1015 - 1025.

Laing, W. A., Wright, M., Cooney, J. & Bulley, S. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 104:9534-9..

Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004) myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. *Plant Physiol.* 134: 1200-1205.

Piro G, Zuppa A, Dalessandro G, Northcote DH (1993) Glucomannan synthesis in pea epicotyls: the mannose and glucose transferases. *Planta* 190: 206-220.

Radzio JA, Lorence A, Chevone BI, Nessler CL (2003) L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient Arabidopsis (*vtc*) mutants. *Plant Mol Biol* 53: 837-844.

Rassam M, Laing W (2005) Variation in Ascorbic Acid and Oxalate Levels in the Fruit of *Actinidia chinensis* Tissues and Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2322-2326.

Redgwell RJ (1983) Composition of *Actinidia mucilage*. *Phytochemistry* 22: 951-956.

Redgwell RJ, Melton LD, Brasch DJ (1990) Cell wall changes in kiwifruit following post harvest ethylene treatment. *Phytochemistry* 29: 399-407.

Schaffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV, Altschul SF (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* 29: 2994-3005.

Seifert GJ (2004) Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 277-284.

Smirnoff N (2001) L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm* 61: 241-266.

Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M (2005) Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta* 220: 854-863.

Valpuesta V, Botella MA (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* 9: 573-577.

Watanabe K, Suzuki K, Kitamura S (2006) Characterization of a GDP-d-mannose 3",5"-epimerase from rice. *Phytochemistry* 67: 338-346.

Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369.

Wolucka BA, Davey MW, Boerjan W (2001) A high-performance liquid chromatography radio method for determination of L-ascorbic acid and guanosine 5'-diphosphate-l-galactose, key metabolites of the plant vitamin C pathway. *Anal Biochem* 294: 161-168.

Wolucka BA, Persiau G, Van Doorselaere J, Davey MW, Demol H, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Zabeau M, Boerjan W (2001) Partial purification and identification of GDP-mannose 3 ",5 "-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 14843-14848.

Wolucka BA, Van Montagu M (2003) GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants. *J. Biol. Chem.* 278: 47483-47490.

**Sumario de secuencias**

Transferasa = GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa

Epimerasa = GDP-D-Manosa Epimerasa

SEC ID N°	Comentario	Tipo molécula	Especies	Referencia
1	transferasa	polipéptido	<i>Actinidia chinensis</i>	EST319998_Ac
2	transferasa	polipéptido	<i>Malus x domestica</i>	EST 82552_Md
3	transferasa	polipéptido	<i>Actinidia chinensis</i>	EST244893_Ac
4	transferasa	polipéptido	<i>Actinidia eriantha</i>	EST24547_Ae.
5	transferasa	polipéptido	<i>Actinidia eriantha</i>	EST276582_Ae
6	transferasa	polipéptido	<i>Malus sieboldii</i>	EST315905_Ms
7	transferasa	polipéptido	<i>Solanum tuberosum</i>	contig_st
8	transferasa	polipéptido	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g26850
9	transferasa	polipéptido	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g55120
10	transferasa	polipéptido	<i>Lycopersicon esculentum</i>	BT013858_Le
11	transferasa	polipéptido	<i>Oryza sativa</i>	Osl2g0190000
12	transferasa	polipéptido	-	unidad de transferasa conservada 1
13	transferasa	polipéptido	-	unidad de transferasa conservada 2
14	transferasa	polinucleótido	<i>Actinidia chinensis</i>	EST319998_Ac
15	transferasa	polinucleótido	<i>Malus x domestica</i>	EST 82552_Md
16	transferasa	polinucleótido	<i>Actinidia chinensis</i>	EST 244893_Ac
17	transferasa	polinucleótido	<i>Actinidia eriantha</i>	EST 24547_Ae
18	transferasa	polinucleótido	<i>Actinidia eriantha</i>	EST 276582_Ae
19	transferasa	polinucleótido	<i>Malus sieboldii</i>	EST315905_Ms

ES 2 543 130 T3

SEC ID N°	Comentario	Tipo molécula	Especies	Referencia
20	transferasa	polinucleótido	<i>Solanum tuberosum</i>	contig_st
21	transferasa	polinucleótido	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g26850
22	transferasa	polinucleótido	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g55120
23	transferasa	polinucleótido	<i>Lycopersicon esculentum</i>	BT013858_Le
24	transferasa	polinucleótido	<i>Oryza sativa</i>	Osl2g0190000
25	Epimerasa	polipéptido	<i>Actinidia eriantha</i>	169164_KUFA
26	Epimerasa	polipéptido	<i>Actinidia deliciosa</i>	198296_KALA
27	Epimerasa	polipéptido	<i>Malus x domestica</i>	108403_AAOA
28	Epimerasa	polipéptido	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g28840
29	Epimerasa	polipéptido	<i>Malpighia glabra</i>	DQ229167
30	Epimerasa	polipéptido	<i>Oryza sativa</i>	AB193582
31	Epimerasa	polipéptido	<i>Oryza sativa</i>	AB235855
32	Epimerasa	polipéptido	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XM_001422193
33	Epimerasa	polipéptido	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ268848
34	Epimerasa	polipéptido	<i>Vitis vinifera</i>	EF554358
35	Epimerasa	polipéptido	<i>Lycopersicon esculentum</i>	BT013590
36	Epimerasa	polipéptido	-	unidad de transferasa conservada 1
37	Epimerasa	polipéptido	-	unidad de transferasa conservada 2
38	Epimerasa	polinucleótido	<i>Actinidia eriantha</i>	169164_KUFA
39	Epimerasa	polinucleótido	<i>Actinidia deliciosa</i>	198296_KALA
40	Epimerasa	polinucleótido	<i>Malus x domestica</i>	108403_AAOA
41	Epimerasa	polinucleótido	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g28840
42	Epimerasa	polinucleótido	<i>Malpighia glabra</i>	DQ229167

ES 2 543 130 T3

SEC ID N°	Comentario	Tipo molécula	Especies	Referencia
43	Epimerasa	polinucleótido	<i>Oryza sativa</i>	AB193582
44	Epimerasa	polinucleótido	<i>Oryza sativa</i>	AB235855 .
45	Epimerasa	polinucleótido	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XM_001422193
46	Epimerasa	polinucleótido	<i>Solanum tuberosum</i>	DQ268848
47	Epimerasa	polinucleótido	<i>Vitis vinifera</i>	EF554358
48	Epimerasa	polinucleótido	<i>Lycopersicon esculentum</i>	BT013590

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN HORTÍCOLA Y ALIMENTARIA DE NUEVA ZELANDA.  
LIMITADO

<120> TRANSFERASAS, EPIMERASAS, POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN ESTAS Y  
USOS DE LOS MISMOS.

<130> 570832 HCF

<160> 48

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Actinidia chinensis

<400> 1

Met Leu Lys Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Val Ser Asn Phe Gln Lys  
1 5 10 15

Asp Glu Ala Glu Asp Gly Ala Arg Ser Gly Gly Gly Cys Gly Arg Asn  
20 25 30

Cys Leu Gln Lys Cys Cys Ile Gln Gly Ala Lys Leu Pro Leu Tyr Ala  
35 40 45

Phe Lys Arg Val Lys Glu Val Val Gly Glu Lys Gly Leu Leu Ala Val  
50 55 60

Asp Asp Glu Glu Ala Pro Val Ala Phe Leu Asp Ser Leu Leu Leu Gly  
65 70 75 80

Glu Trp Glu Asp Arg Val Gln Arg Gly Leu Phe Arg Tyr Asp Val Thr  
85 90 95

Ala Cys Glu Thr Lys Val Ile Pro Gly Glu Tyr Gly Phe Ile Ala Gln  
100 105 110

Leu Asn Glu Gly Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Arg Val  
115 120 125

Asp Lys Val Leu Gln Pro Phe Asp Glu Ser Lys Phe Asn Phe Thr Lys  
130 135 140

Val Gly Gln Glu Glu Val Leu Phe Gln Phe Glu Ala Ser Asp Asp Asn  
145 150 155 160

Glu Val Gln Phe Phe Pro Asn Ala Pro Val Asp Val Glu Asn Ser Pro  
165 170 175

Ser Val Val Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu  
180 185 190

Leu Ile Pro Arg Ile Leu Glu Cys Leu Pro Gln Arg Ile Asp Arg Glu  
 195 200 205  
 Ser Phe Leu Leu Ala Leu His Met Ala Ala Glu Ala Gly Asn Pro Tyr  
 210 215 220  
 Phe Arg Leu Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His  
 225 230 235 240  
 Leu His Phe Gln Ala Tyr Tyr Leu Ala Val Pro Phe Pro Ile Glu Lys  
 245 250 255  
 Ala Pro Thr Arg Lys Ile Thr Thr Leu Asn Gly Gly Val Lys Ile Ser  
 260 265 270  
 Asp Leu Leu Asn Tyr Pro Val Arg Gly Leu Val Phe Glu Gly Gly Asn  
 275 280 285  
 Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asn Ala Val Ser Asp Ser Ser Ile Cys Leu  
 290 295 300  
 Gln Gly Asn Asn Ile Pro Tyr Asn Val Leu Ile Ser Asp Ser Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Ile Phe Leu Leu Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu Gly  
 325 330 335  
 Glu Val Ser Ser Asp Leu Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro Ala Val Trp  
 340 345 350  
 Glu Ile Ser Gly His Met Val Leu Lys Arg Lys Glu Asp Tyr Glu Glu  
 355 360 365  
 Ala Ser Glu Gly Asn Ala Trp Arg Leu Leu Ala Glu Val Ser Leu Ser  
 370 375 380  
 Glu Glu Arg Phe Glu Glu Val Lys Ala Leu Ile Phe Glu Ala Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Cys Ala Asp Asp Arg Ser Gly Ser Thr Ala Glu Asn Leu Leu Glu Glu  
 405 410 415  
 Pro Asp Asp Asn Pro Gln Ser Arg Lys Val Ala Asn Asp Ala Leu Asn  
 420 425 430  
 Lys Gly Ser His Arg Gly Met Val Pro Gly Lys Gln Glu Cys Leu Val  
 435 440 445  
 Gln His  
 450

<210> 2  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Malus x domesticus

<400> 2

Met Leu Arg Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Val Ser Asn Tyr Gln Lys  
 1 5 10 15

Asp Glu Ala Glu Glu Val Ala Arg Arg Val Gly Gly Cys Gly Arg Asn  
 20 25 30

Cys Leu Asn Gln Cys Cys Ile Pro Gly Ala Lys Leu Pro Leu Tyr Ala  
 35 40 45

Phe Lys Lys Leu Asn Val Asn Asp Gly Asp Thr Gly Leu Leu Gly Arg  
 50 55 60

Glu Lys Arg Glu Pro Pro Val Ala Phe Leu Asp Ser Leu Leu Leu Gly  
 65 70 75 80

Glu Trp Glu Asp Arg Met Gln Arg Gly Leu Phe Arg Tyr Asp Val Thr  
 85 90 95

Ala Cys Glu Thr Lys Val Ile Pro Gly Gln Phe Gly Phe Ile Ala Gln  
 100 105 110

Leu Asn Glu Gly Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Arg Val  
 115 120 125

Asp Lys Val Leu Gln Pro Phe Asp Gly Ser Lys Phe Asn Phe Thr Lys  
 130 135 140

Val Gly Gln Glu Glu Val Leu Phe Gln Phe Glu Ala Ser Lys Asp Gly  
 145 150 155 160

Glu Val Gln Phe Phe Pro Ser Ala Pro Ile Asp Val Glu Ser Ser Pro  
 165 170 175

Ser Val Val Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu  
 180 185 190

Leu Ile Pro His Ile Leu Glu Arg Leu Pro Gln Arg Ile Asp Arg Glu  
 195 200 205

Ser Phe Leu Leu Ala Leu His Met Ala Ala Glu Ala Gly Asn Pro Tyr  
 210 215 220

Phe Arg Leu Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His  
 225 230 235 240

Leu His Phe Gln Ala Tyr Tyr Leu Ala Val Thr Phe Pro Ile Glu Lys  
245 250 255

Ala Pro Thr Lys Lys Ile Ser Thr Leu Asn Ala Glu Val Lys Val Ser  
260 265 270

Glu Leu Leu Asn Tyr Pro Val Arg Gly Leu Val Phe Glu Gly Gly Asn  
275 280 285

Thr Leu Gln Asp Leu Ser Asn Thr Val Ser Asp Ala Cys Ile Cys Leu  
290 295 300

Gln Glu Asn Asn Ile Pro Tyr Asn Val Leu Ile Ser Asp Ser Gly Lys  
305 310 315 320

Arg Ile Phe Leu Val Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu Gly  
325 330 335

Glu Val Arg Ala Glu Ile Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro Ala Val Trp  
340 345 350

Glu Ile Ser Gly His Met Val Leu Lys Arg Lys Lys Asp Tyr Asp Glu  
355 360 365

Ala Ser Asp Glu Asn Ala Trp Lys Leu Leu Ala Glu Val Ser Leu Ser  
370 375 380

Glu Glu Arg Phe Leu Glu Val Asn Ala Leu Ile Phe Glu Gly Ile Ala  
385 390 395 400

Ser Gly Asp Asn Gly Asn Glu Asn Leu Leu Lys Asp Pro Glu Val Lys  
405 410 415

Pro Arg Ser His Glu Glu Val Asn Thr Ile Asn Lys Arg Val His Cys  
420 425 430

Ser Ala Val Asn Glu Gln Ile Cys Arg Val Phe Thr Met  
435 440 445

- <210> 3
- <211> 450
- <212> PRT
- <213> Actinidia chinensis

<400> 3

Met Leu Lys Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Val Ser Asn Phe Gln Lys  
1 5 10 15

Asp Glu Ala Asp Asp Gly Ala Arg Ser Gly Gly Gly Cys Gly Arg Asn  
20 25 30

cys Leu Gln Lys Cys Cys Ile Gln Gly Ala Lys Leu Pro Leu Tyr Ala

	35		40		45														
Phe	Lys 50	Arg	Val	Asn	Glu	Val 55	Val	Gly	Glu	Lys	Gly 60	Val	Leu	Ala	Leu				
Asp	Asn	Glu	Glu	Ala	Pro 70	Val	Ala	Phe	Leu	Asp 75	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly 80				
Glu	Trp	Glu	Asp	Arg 85	Val	Gln	Arg	Gly	Leu 90	Phe	Arg	Tyr	Asp	Val 95	Thr				
Ala	Cys	Glu	Thr 100	Lys	Val	Ile	Pro	Gly 105	Glu	Tyr	Gly	Phe	Ile 110	Ala	Gln				
Leu	Asn	Glu 115	Gly	Arg	His	Leu	Lys 120	Lys	Arg	Pro	Thr	Glu 125	Phe	Arg	Val				
Asp	Lys 130	Val	Leu	Gln	Pro	Phe 135	Asp	Gly	Ser	Lys	Phe 140	Asn	Phe	Thr	Lys				
Val	Gly	Gln	Glu	Glu	Val 150	Leu	Phe	Gln	Phe	Glu 155	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn 160				
Glu	Val	Gln	Phe	Phe 165	Pro	Asn	Ala	Pro	Val 170	Asp	Val	Glu	Asn	Ser 175	Pro				
Ser	Val	Val	Ala 180	Ile	Asn	Val	Ser	Pro 185	Ile	Glu	Tyr	Gly	His 190	Val	Leu				
Leu	Ile	Pro 195	Ser	Ile	Leu	Glu	Cys 200	Leu	Pro	Gln	Arg	Ile 205	Asp	Arg	Glu				
Ser	Phe 210	Leu	Leu	Ala	Leu	His 215	Met	Ala	Ala	Glu	Ala 220	Gly	Asn	Pro	Tyr				
Phe	Arg	Leu	Gly	Tyr	Asn 230	Ser	Leu	Gly	Ala	Phe 235	Ala	Thr	Ile	Asn	His 240				
Leu	His	Phe	Gln	Ala 245	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Val 250	Pro	Phe	Pro	Ile	Glu 255	Lys				
Ala	Pro	Thr	Arg 260	Lys	Ile	Thr	Thr	Leu 265	Asn	Gly	Gly	Val	Lys 270	Ile	Ser				
Glu	Leu	Leu 275	Asn	Tyr	Pro	Val	Arg 280	Gly	Leu	Val	Phe	Glu 285	Gly	Gly	Asn				
Thr	Leu 290	Glu	Asp	Leu	Ser	Asn 295	Ala	Val	Ser	Asp	Ser 300	Ser	Ile	Cys	Leu				
Gln	Gly	Asn	Asn	Ile	Pro	Tyr	Asn	Val	Leu	Ile	Ser	Asp	Ser	Gly	Lys				



Ala Cys Gln Thr Lys Val Ile Pro Gly Glu Tyr Gly Phe Ile Ala Gln  
 100 105 110

Leu Asn Glu Gly Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Arg Val  
 115 120 125

Asp Lys Val Leu Gln Pro Phe Asp Glu Ser Lys Phe Asn Phe Thr Lys  
 130 135 140

Val Gly Gln Glu Glu Val Leu Phe Gln Phe Glu Ala Ser Val Asp Asn  
 145 150 155 160

Glu Val Gln Phe Phe Pro Asn Ala Pro Val Asp Val Glu Asn Ser Pro  
 165 170 175

Ser Val Val Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu  
 180 185 190

Leu Ile Pro Arg Ile Leu Glu Cys Leu Pro Gln Arg Ile Asp Arg Glu  
 195 200 205

Ser Phe Leu Leu Ala Leu His Met Ala Ala Glu Ala Gly Asn Pro Tyr  
 210 215 220

Phe Arg Leu Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His  
 225 230 235 240

Leu His Phe Gln Ala Tyr Tyr Leu Ala Val Pro Phe Pro Ile Glu Lys  
 245 250 255

Ala Pro Thr Arg Lys Ile Thr Thr Leu Asn Gly Gly Val Lys Ile Ser  
 260 265 270

Glu Leu Leu Asn Tyr Pro Val Arg Gly Leu Val Phe Glu Gly Gly Asn  
 275 280 285

Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asn Ala Val Ser Asp Ser Ser Ile Cys Leu  
 290 295 300

Gln Cys Asn Asn Ile Pro Tyr Asn Val Leu Ile Ser Asp Ser Gly Lys  
 305 310 315 320

Arg Ile Phe Leu Leu Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu Gly  
 325 330 335

Glu Val Ser Ser Glu Leu Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro Ala Val Trp  
 340 345 350

Glu Ile Ser Gly His Met Val Leu Lys Arg Lys Glu Asp Tyr Gln Glu  
 355 360 365

ES 2 543 130 T3

Ala Ser Glu Gly Asn Ala Trp Arg Leu Leu Ala Glu Val Ser Leu Ser  
 370 375 380

Glu Glu Arg Phe Glu Glu Val Lys Ala Leu Ile Phe Glu Ala Ile Ser  
 385 390 400

Cys Ala Asp Asp Arg Ser Gly Ser Thr Ala Glu Asn Leu Leu Glu  
 405 410 415

<210> 5  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Actinidia eriantha  
 <400> 5

Met Leu Lys Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Val Ser Asn Phe Gln Lys  
 1 5 10 15

Asp Glu Ala Glu Asp Gly Ala Arg Ser Gly Gly Gly Cys Gly Arg Asn  
 20 25 30

Cys Leu Gln Lys Cys Cys Ile Gln Gly Ala Lys Leu Pro Leu Tyr Ala  
 35 40 45

Phe Lys Arg Val Lys Glu Val Val Gly Glu Lys Gly Leu Leu Ala Val  
 50 55 60

Gly Asp Glu Glu Ala Pro Val Ala Phe Leu Asp Ser Leu Leu Leu Gly  
 65 70 75 80

Glu Trp Glu Asp Arg Val Gln Arg Gly Leu Phe Arg Tyr Asp Val Thr  
 85 90 95

Ala Cys Glu Thr Lys Val Ile Pro Gly Glu Tyr Gly Phe Ile Ala Gln  
 100 105 110

Leu Asn Glu Gly Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Arg Val  
 115 120 125

Asp Lys Val Leu Gln Pro Phe Asp Glu Ser Lys Phe Asn Phe Thr Lys  
 130 135 140

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

Glu Val Gln Phe Phe Pro Asn Ala Pro Val Asp Val Glu Asn Ser Pro  
 165 170 175

Ser Val Val Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu  
 180 185 190

Leu Ile Pro Arg Ile Leu Glu Cys Leu Pro Gln Arg Ile Asp Arg Glu  
 195 200 205  
 Ser Phe Leu Leu Ala Leu His Met Ala Ala Glu Ala Gly Asn Pro Tyr  
 210 215 220  
 Phe Arg Leu Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His  
 225 230 235 240  
 Leu His Phe Gln Ala Tyr Tyr Leu Ala Val Pro Phe Pro Ile Glu Lys  
 245 250 255  
 Ala Pro Thr Arg Lys Ile Thr Thr Leu Asn Gly Gly Val Lys Ile Ser  
 260 265 270  
 Glu Leu Leu Asn Tyr Pro Val Arg Gly Leu Val Phe Glu Gly Gly Asn  
 275 280 285  
 Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asn Ala Val Ser Asp Ser Ser Ile Cys Leu  
 290 295 300  
 Gln Cys Asn Asn Ile Pro Tyr Asn Val Leu Ile Ser Asp Ser Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Ile Phe Leu Leu Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu Gly  
 325 330 335  
 Glu Val Ser Ser Glu Leu Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro Ala Val Trp  
 340 345 350  
 Glu Ile Ser Gly His Met Val Leu Lys Arg Lys Glu Asp Tyr Gln Glu  
 355 360 365  
 Ala Ser Glu Gly Asn Ala Trp Arg Leu Leu Ala Glu Val Ser Leu Ser  
 370 375 380  
 Glu Glu Arg Phe Glu Glu Val Lys Ala Leu Ile Phe Glu Ala Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Cys Ala Asp Asp Arg Ser Gly Ser Thr Ala Glu Asn Leu Leu Glu Glu  
 405 410 415  
 Pro Asp Asn Asp Pro Gln Ser Arg Glu Val Ala Asn Asp Ala Leu Ser  
 420 425 430  
 Lys Ala Ser His Arg Gly Met Val Pro Gly Lys Gln Glu Cys Leu Val  
 435 440 445  
 Gln His  
 450

<210> 6  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Malus sieboldii

<400> 6

Met Met Leu Arg Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Phe Ser Asn Tyr Gln  
 1 5 10 15

Lys Asp Glu Ala Glu Glu Gly Ala Arg Arg Val Glu Gly Cys Gly Arg  
 20 25 30

Asn Cys Leu Asn Gln Cys Cys Ile Pro Gly Ala Lys Leu Pro Leu Tyr  
 35 40 45

Ala Phe Lys Lys Arg Asn Val Asn Asn Gly Asp Thr Gly Val Pro Gly  
 50 55 60

His Asp Lys Arg Glu Pro Pro Val Ala Phe Leu Asp Ser Leu Leu Leu  
 65 70 75 80

Gly Glu Trp Glu Asp Arg Met Gln Arg Gly Leu Phe Arg Tyr Asp Val  
 85 90 95

Thr Ala Cys Glu Thr Lys Val Ile Pro Gly Gln Tyr Gly Phe Ile Ala  
 100 105 110

Gln Leu Asn Glu Gly Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Arg  
 115 120 125

Val Asp Lys Val Leu Gln Pro Phe Asp Ser Ser Lys Phe Asn Phe Thr  
 130 135 140

Lys Val Gly Gln Glu Glu Val Leu Phe Arg Phe Glu Ala Ser Glu Asp  
 145 150 155 160

Gly Glu Val His Phe Phe Pro Ser Ala Pro Ile Asp Val Glu Asn Ser  
 165 170 175

Pro Ser Val Val Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val  
 180 185 190

Leu Leu Ile Pro Arg Ile Phe Glu Arg Leu Pro Gln Arg Ile Asp Arg  
 195 200 205

Glu Ser Phe Leu Leu Ala Leu His Met Ala Ala Glu Ala Gly Ser Pro  
 210 215 220

Tyr Phe Arg Leu Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn  
 225 230 235 240

ES 2 543 130 T3

His Leu His Phe Gln Ala Tyr Tyr Leu Ala Val Thr Phe Pro Ile Glu  
245 250 255

Lys Ala Pro Thr Lys Lys Ile Ser Thr Leu Asn Ala Glu Val Lys Val  
260 265 270

Ser Glu Leu Leu Asn Tyr Pro Val Arg Gly Leu Phe Phe Glu Gly Gly  
275 280 285

Asn Thr Leu Glu Asp Leu Ser Tyr Thr Val Ser Asp Ala Cys Ile Cys  
290 295 300

Leu Gln Glu Asn Asn Val Pro Tyr Asn Val Leu Ile Ser Asp Cys Gly  
305 310 315 320

Lys Arg Ile Phe Leu Leu Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu  
325 330 335

Gly Glu Val Ser Ala Glu Val Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro Ala Val  
340 345 350

Trp Glu Ile Ser Gly His Met Val Leu Lys Arg Lys Lys Asp Tyr Asp  
355 360 365

Glu Ala Ser Asp Glu Asn Ala Trp Lys Leu Leu Ala Glu Val Ser Leu  
370 375 380

Ser Glu Glu Arg Phe Gln Glu Val Asn Ala Leu Ile Phe Glu Arg Ile  
385 390 395 400

Ala Ser Gly Asn Asn Gly Asn Glu Asn Leu Pro Glu Asp Pro Glu Val  
405 410 415

Lys Pro Arg Ser His Glu Glu Val Asp Ala Thr Ile Asn Lys Ser Ser  
420 425 430

Arg Ala Ala Met Val Gly Glu Thr Gln Glu Cys Ile Val Leu Gln  
435 440 445

<210> 7  
<211> 438  
<212> PRT.  
<213> Solanum tuberosum

<400> 7

Met Met Leu Lys Ile Lys Arg Val Pro Thr Leu Val Ser Asn Phe Gln  
1 5 10 15

Lys Asp Glu Ala Asp Glu Ile Gly Ala Arg Gly Ala Gly Cys Gly Arg  
20 25 30

Asn Cys Leu Arg Asn Cys Cys Leu Pro Gly Ser Lys Leu Pro Leu Tyr





ES 2 543 130 T3

Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Arg Val Asp Lys Val Leu  
 115 120 125  
 Gln Ser Phe Asp Gly Ser Lys Phe Asn Phe Thr Lys Val Gly Gln Glu  
 130 135 140  
 Glu Leu Leu Phe Gln Phe Glu Ala Gly Glu Asp Ala Gln Val Gln Phe  
 145 150 155 160  
 Phe Pro Cys Met Pro Ile Asp Pro Glu Asn Ser Pro Ser Val Val Ala  
 165 170 175  
 Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu Leu Ile Pro Arg  
 180 185 190  
 Val Leu Asp Cys Leu Pro Gln Arg Ile Asp His Lys Ser Leu Leu Leu  
 195 200 205  
 Ala Val His Met Ala Ala Glu Ala Ala Asn Pro Tyr Phe Arg Leu Gly  
 210 215 220  
 Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His Leu His Phe Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Tyr Tyr Leu Ala Met Pro Phe Pro Leu Glu Lys Ala Pro Thr Lys  
 245 250 255  
 Lys Ile Thr Thr Thr Val Ser Gly Val Lys Ile Ser Glu Leu Leu Ser  
 260 265 270  
 Tyr Pro Val Arg Ser Leu Leu Phe Glu Gly Gly Ser Ser Met Gln Glu  
 275 280 285  
 Leu Ser Asp Thr Val Ser Asp Cys Cys Val Cys Leu Gln Asn Asn Asn  
 290 295 300  
 Ile Pro Phe Asn Ile Leu Ile Ser Asp Cys Gly Arg Gln Ile Phe Leu  
 305 310 315 320  
 Met Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu Gly Glu Val Ser Pro  
 325 330 335  
 Glu Val Leu Glu Thr Gln Val Asn Pro Ala Val Trp Glu Ile Ser Gly  
 340 345 350  
 His Met Val Leu Lys Arg Lys Glu Asp Tyr Glu Gly Ala Ser Glu Asp  
 355 360 365  
 Asn Ala Trp Arg Leu Leu Ala Glu Ala Ser Leu Ser Glu Glu Arg Phe  
 370 375 380

Lys Glu Val Thr Ala Leu Ala Phe Glu Ala Ile Gly Cys Ser Asn Gln  
 385 390 395 400

Glu Glu Asp Leu Glu Gly Thr Ile Val His Gln Gln Asn Ser Ser Gly  
 405 410 415

Asn Val Asn Gln Lys Ser Asn Arg Thr His Gly Gly Pro Ile Thr Asn  
 420 425 430

Gly Thr Ala Ala Glu Cys Leu Val Leu Gln  
 435 440

<210> 9  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

Met Leu Leu Lys Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Val Ser Asn Tyr Gln  
 1 5 10 15

Lys Asp Glu Thr Val Glu Glu Gly Gly Cys Gly Arg Asn Cys Leu Ser  
 20 25 30

Lys Cys Cys Ile Asn Gly Ala Arg Leu Pro Leu Tyr Thr Cys Lys Asn  
 35 40 45

Leu Asp Lys Ser Val Gly Glu Asn Thr Glu Ser Pro Val Thr Phe Leu  
 50 55 60

Glu Ser Leu Val Ile Gly Glu Trp Glu Asp Arg Phe Gln Arg Gly Leu  
 65 70 75 80

Phe Arg Tyr Asp Val Thr Ala Cys Glu Thr Lys Val Ile Pro Gly Lys  
 85 90 95

Tyr Gly Phe Ile Ala Gln Leu Asn Glu Gly Arg His Leu Lys Lys Arg  
 100 105 110

Pro Thr Glu Phe Arg Val Asp Lys Val Leu Gln Pro Phe Asp Gly Asn  
 115 120 125

Lys Phe Asn Phe Thr Lys Val Gly Gln Glu Glu Leu Leu Phe Gln Phe  
 130 135 140

Lys Ala Ser Thr Asn Asp Asp Asp Ser Glu Ile Gln Phe Leu Ala Ser  
 145 150 155 160

Met Pro Leu Asp Ala Asp Asn Ser Pro Ser Val Val Ala Ile Asn Val  
 165 170 175

ES 2 543 130 T3

Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu Leu Ile Pro Arg Val Leu Asp  
 180 185 190

Cys Leu Pro Gln Arg Ile Asp His Lys Ser Leu Leu Leu Ala Leu Gln  
 195 200 205

Met Ala Ala Glu Ala Asp Asn Pro Tyr Phe Arg Leu Gly Tyr Asn Ser  
 210 215 220

Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His Leu His Phe Gln Ala Tyr Tyr  
 225 230 235 240

Leu Ala Met Gln Phe Pro Ile Glu Lys Ala Ser Ser Leu Lys Ile Thr  
 245 250 255

Thr Thr Asn Asn Gly Val Lys Ile Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Pro Val  
 260 265 270

Arg Gly Leu Leu Val Glu Gly Gly Asn Thr Ile Lys Asp Leu Ala Asp  
 275 280 285

Thr Val Ser Asp Ala Ser Val Cys Leu Gln Asn Asn Asn Ile Pro Phe  
 290 295 300

Asn Ile Leu Ile Ser Asp Ser Gly Lys Arg Ile Phe Leu Leu Pro Gln  
 305 310 315 320

Cys Tyr Ala Glu Lys Gln Ala Leu Gly Glu Val Ser Ser Thr Leu Leu  
 325 330 335

Asp Thr Gln Val Asn Pro Ala Val Trp Glu Met Ser Gly His Met Val  
 340 345 350

Leu Lys Arg Lys Glu Asp Tyr Glu Gly Ala Ser Glu Glu Lys Ala Trp  
 355 360 365

Arg Leu Leu Ala Glu Val Ser Leu Ser Glu Glu Arg Phe Arg Glu Val  
 370 375 380

Asn Thr Met Ile Phe Asp Ala Ile Gly Phe Ser Ser His Glu Glu Glu  
 385 390 395 400

Glu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Gln Asn Ser Met Asn Gly Gly Ser Phe  
 405 410 415

Thr Ile Val His Cys Pro Ser Val Lys Glu Glu Ala Val Ser Asn  
 420 425 430

<210> 10  
 <211> 438  
 <212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 10

Met Leu Thr Val Lys Arg Val Pro Thr Leu Val Ser Asn Tyr Gln Glu  
1 5 10 15

Asp Val Leu Glu Gly Asn Val Met Gly Cys Gly Arg Lys Cys Leu Gly  
20 25 30

Lys Cys Cys Met Pro Val Ser Val Leu Pro Leu Tyr Ala Phe Lys Asn  
35 40 45

Asp Asp Asn Glu Pro Ile Glu Asn Asp Val Gln Thr Leu Pro Glu Glu  
50 55 60

Glu Cys Gln Met Ser Phe Leu Asn Asp Leu Leu Leu Gly Leu Trp Glu  
65 70 75 80

Glu Arg Met Ser Gln Gly Leu Phe Arg Tyr Asp Val Thr Thr Cys Glu  
85 90 95

Thr Lys Val Ile Pro Gly Arg Cys Gly Phe Ile Ala Gln Leu Asn Glu  
100 105 110

Gly Arg His Leu Lys Lys Arg Pro Thr Glu Phe Cys Ile Asp Lys Val  
115 120 125

Leu Gln Pro Phe Asp Glu Asn Lys Phe Asn Phe Thr Lys Val Gly Gln  
130 135 140

Glu Glu Val Leu Phe Arg Phe Glu Pro Ser Thr Asp Tyr Lys Ala His  
145 150 155 160

Tyr Phe Ser Gly Met Arg Val Asn Ser Gly Ile Ser Pro Ser Ile Val  
165 170 175

Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu Leu Ile Pro  
180 185 190

Arg Val Leu Asp Cys Leu Pro Gln Arg Ile Asp Arg Asp Ser Phe Ala  
195 200 205

Ile Ala Leu His Phe Ala Arg Glu Val Ala Asp Pro Phe Phe Arg Val  
210 215 220

Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His Leu His Phe  
225 230 235 240

Gln Ala Tyr Tyr Leu Ser Val Pro Phe Pro Val Glu Lys Ala Pro Ile  
245 250 255

ES 2 543 130 T3

Gln Lys Ile Leu Ala Arg Lys Gly Leu Gly Gly Ala Gly Val Ile Val  
 260 265 270

Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Pro Val Arg Gly Phe Ala Phe Glu Gly Gly  
 275 280 285

Asn Gly Ser Thr Ala Arg Asp Leu Ser Asp Ala Val Val Asn Ser Cys  
 290 295 300

Ile Ser Leu Gln Asn Lys Asn Ile Pro Phe Asn Ile Leu Ile Ala Gln  
 305 310 315 320

Cys Gly Lys Lys Ile Phe Leu Leu Pro Gln Cys Tyr Ala Glu Lys Gln  
 325 330 335

Ala Leu Gly Val Val Asp Gln Glu Leu Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro  
 340 345 350

Ala Val Trp Glu Ile Ser Gly His Ile Val Leu Lys Arg Thr Lys Asp  
 355 360 365

Tyr Asn Asp Ala Ser Glu Glu Tyr Ala Trp Lys Leu Leu Ser Glu Val  
 370 375 380

Ser Ile Ser Glu Glu Arg Phe Glu Glu Val Lys Gly Tyr Ile Ser Glu  
 385 390 395 400

Ala Ala Asp Leu Gln Ala Asp Glu Asp Glu Asn Ile Asn Pro Glu Lys  
 405 410 415

Glu Ile Pro Asp Ser Pro Gly Pro Gln Val Ala Ser His Ile Pro Pro  
 420 425 430

Asp Cys Leu Val Leu Gln  
 435

<210> 11  
 <211> 438  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa

<400> 11

Met Glu Met Lys Leu Thr Ile Lys Arg Val Pro Thr Val Val Ser Asn  
 1 5 10 15

Tyr Gln Glu Asp Ala Ala Ala Thr Ala Gly Glu Arg Pro Arg Ala Gly  
 20 25 30

Cys Gly Arg Asp Cys Leu Gly Asp Cys Cys Leu Pro Asp Ser Lys Leu  
 35 40 45

Pro Leu Tyr Ala Phe Lys Ala Ser Pro Lys Lys Pro Ser Ser Gln Glu



ES 2 543 130 T3

325 330 335

Ala Leu Gly Glu Val Ser Gln Glu Leu Leu Asp Thr Gln Val Asn Pro  
 340 345 350

Ala Val Trp Glu Ile Ser Gly His Ile Val Leu Lys Arg Arg Ser Asp  
 355 360 365

Tyr Glu Glu Ala Ser Glu Ala Ser Ala Trp Arg Leu Leu Ala Glu Val  
 370 375 380

Ser Leu Ser Glu Glu Arg Phe Glu Glu Val Lys Ala Tyr Ile Phe Asp  
 385 390 400

Ala Ala Gly Leu Val Gln Ser Asp Glu Glu Glu Val Ser Glu Asp Glu  
 405 410 415

Asp Ala Thr Tyr Thr Pro Val Ser Ile Ala Pro Pro Ala Val Ala Glu  
 420 425 430

Gly Cys Leu Val Leu Gln  
 435

<210> 12  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> unidad de transferasa conservada 1  
 <400> 12

Ala Ile Asn Val Ser Pro Ile Glu Tyr Gly His Val Leu Leu Ile Pro.  
 1 5 10 15

<210> 13  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> unidad de transferasa conservada 2  
 <400> 13

Gly Tyr Asn Ser Leu Gly Ala Phe Ala Thr Ile Asn His Leu His Phe  
 1 5 10 15

Gln Ala Tyr

<210> 14  
 <211> 1800  
 <212> ADN  
 <213> Actinidia chinensis

<400> 14  
 gcggacgtgg cgccttgccg tccgaaggcg gtagccctc cgacctcctc ttctcgccg 60  
 gcggcgggtca cttcgctttc tccgtctact agcttattag gtttattctt acttagtgag 120  
 taattcgctc tattatagtt cgtaagttca tcaaagatct gttacttgat tcgtctttcg 180

ES 2 543 130 T3

ttgctcgagt cttggtgttt tttgcgtttt ctgagttcga gatgttgaag atcaagaggg 240  
 ttccgactgt tgtctccaat ttccaaaagg atgaggccga ggacggcgct cgatccggcg 300  
 gtggttgccg ccgaaactgc ctccagaagt gttgcattca aggggcaaag ctacctctgt 360  
 atgctttcaa gagggtgaaa gaggttggtg gtgaaaaggg tttgcttgcc gtcgacgacg 420  
 aagaggctcc tgttgctttc ttggattcac ttcttctcgg ggagtgggag gatcgtgtgc 480  
 agagaggact ctttcgctac gatgtcactg cttgcgaaac caaggttatt ccaggagagt 540  
 atggcttcat tgcgcagttg aacgagggtc gtcaccttaa gaagaggcca actgagtttc 600  
 gtggttgacaa ggtcctgcag cccttcgatg agagcaaatt caatttctact aaagtgggac 660  
 aggaagaggt gctgttccag tttgaagcaa gcgacgacaa tgaagtccag ttcttcccaa 720  
 atgcaccggt tgatgttgag aattctccca gtgttggtgc catcaatggt agtcctattg 780  
 aatatggtca tgaacttctg atccctcggg ttcttgaatg cctgcctcag aggattgaca 840  
 gggagagctt cttgcttget cttcacatgg cagcagaagc tggaaaccg tacttccgat 900  
 tgggttacia cagcttgggt gcatttgcca ctatcaatca cctacatttc caggcttatt 960  
 acttagctgt gccctttcct atcgagaagg ctcccactag gaagataact actctgaatg 1020  
 gtggggtgaa aatctctgat ctgctaaatt atccagtcag agggcttggt ttcgaggggtg 1080  
 gaaattctct ggaagatttg tccaatgccg tctctgattc cagcatttgc cttcaaggca 1140  
 acaacatacc ttacaatgtg cttatctccg attctggaaa gtgtatcttt ctcttaccgc 1200  
 agtgtacgc tgagaaacag gctcttgag aagtgagttc cgatcttctg gacacacaag 1260  
 tgaaccggc agtggtggaa atcagcggac atatggtttt gaagaggaag gaggactatg 1320  
 aggaggcgtc tgaaggaaat gcttggaggc tccttgctga ggtctccctt tcggaggaga 1380  
 ggttcgaaga agtcaaggca ttgatctttg aagccatctc ttgtgctgat gatagaagtg 1440  
 gcagcacggc tgagaacttg ctcgaggagc cagatgacaa tccacaatct cgcaaagtag 1500  
 cgaatgatgc ccttaacaaa ggctcccacc gaggtatggt gccagggag caagaatgcc 1560  
 tagttcagca ctgagaattg gggcatttga agaatttca gtggtttgtg tgcgtcttta 1620  
 attaaatag gtattactac tctctgggaa tttgcttggt aatgttaaac atccctaaat 1680  
 aaggcaact aggtttgcgt tgttgtgtt gttgtgttg ttgttcagt tgcttctgtt 1740  
 ctggggattt gctgtggtaa tctgttttta cttgtcgtt gtggcatat gtaaaaatac 1800

<210> 15  
 <211> 1593  
 <212> DNA  
 <213> Malus x domestica

<400> 15  
 ttgaggatca agagggttcc caccgtcgtt tcgaattacc agaaagatga ggcggaggaa 60  
 gttgctcgcc gcgtcggggg ctgtggccgc aactgcctta accaatgttg cattccaggt 120  
 gcaaaacttc cattgtatgc cttcaagaag ctgaacgtaa atgatggtga cacggggttg 180

ES 2 543 130 T3

ctaggacgtg agaaaagaga gcctcccgtt gcatttcttg actcactgct tctcggggag 240  
 tgggaggatc gcatgcagag agggctattt cgctatgatg tcaactgcttg tgaaccaag 300  
 gtgatcccag ggcaatttgg tttcatagcc cagctgaatg agggtcgcca tcttaagaag 360  
 cggccaacag agtttcgagt tgataaggtc ctccagccct ttgatggcag caagtttaac 420  
 ttcactaaag ttggacaaga ggaggttctg ttccagtttg aagccagcaa agatggtgaa 480  
 gttcagtttt tccccagcgc acccattgat gttgaaagt ctccgagcgt tgtggccatt 540  
 aatgtcagtc caattgaata tggccatgtg ctggtgattc ctcacattct tgagcgattg 600  
 cctcaaagga ttgaccggga aagcttcttg cttgcacttc acatggcggc tgaagcaggg 660  
 aatccttact ttcgattggg ttacaacagc ttgggtgcat ttgctaccat caatcacctt 720  
 cacttcagg cttactacct ggcggtgacc tttcccattg agaaggctcc taccaaaaaa 780  
 atatccactt tgaatgccga ggtgaaggtc tctgagcttc tgaattatcc agtcagaggt 840  
 cttgtttttg aggggtgaaa tactctgcaa gatttgtcaa acaccgtctc tgatgcctgc 900  
 atatgccttc aagagaacaa cataccttac aatgtcctta tctctgactc tggaaagcga 960  
 atctttctcg tgccacagtg ttatgctgag aaacaagctc ttggggaagt gagagcagag 1020  
 attctggata cacaggtgaa tccagctgtg tgggaaatta gtgggcatat ggtgctaaag 1080  
 aggaaaaagg actatgatga ggcgtcggat gaaaatgctt ggaagctcct ggcagaggtc 1140  
 tccctttctg aagaaaggtt cctagaagtg aatgctctta ttttcgaagg tattgcttcg 1200  
 ggtgataacg ggaatgaaaa cttgctcaag gatccagaag ttaagcctcg ttctcatgaa 1260  
 gaagtcaaca ccatcaacaa aagagtgcac tgttctgcag taaatgagca gatttgcgg 1320  
 gtgtttacaa tgtgaatcta ctattgccgt ttacgatttg ggttaatgtc tctacttttc 1380  
 ttggatgcta gccgatgcct aaataagcaa aactggtttt gcagcttttc attgtttgca 1440  
 gtgtgtttg catgtatact gcataaacac attgatctat tttaggggtg tttatggata 1500  
 tgtaaaatgc tttattgtgg tggtttcgtt tgtggctgaa taaaaggcca gtaggctcta 1560  
 ttatggggtc atagcttcac caaaaaaaaa aaa 1593

<210> 16  
 <211> 2201  
 <212> DNA  
 <213> Actinidia chinensis

<400> 16  
 ctctctctcc ctccctcttc tctatctata tatccccaa tctggcctct cctcacctca 60  
 cccccaaagt ctacacagaa tcaacccttc atctcacgca caggcctcca aaaccactt 120  
 cttctccaca atccagagtc ccagacacac ctcgagtggc cggagttgag agagagagag 180  
 agagagagag agattttctg cttcgatcgg gggtaaaacc cgggtgttga caagttgtag 240  
 acatcacggc tatattcggg gtttctcgtg ccctcataca tgtccggctc gtacgacgca 300  
 agggttgtgt agtcgagaga aacccttcgc cgcacggcgg acgtggcgcc ttgccgtctg 360  
 aaggcggtag cccctctgat ctctattcc tcgccggcgg cggtcacttc gctttctccg 420

ES 2 543 130 T3

tctactagct taataggttt attccttagtt agtgagtaaa tacgtcttac tatagttcgt 480  
aagattatcg aagatctggt gcttgattcg tctttcgtag ctcgagtctt ggtgtttttg 540  
cgttttctga gttcgagatg ttgaagatca agagggttcc gactggtggt tccaatttcc 600  
aaaaggatga ggccgacgac ggcgctcgat ctggcggtgg ttgcggccga aactgcctcc 660  
agaagtgttg cattcaaggg gcaaagctac ctctgtatgc tttcaagagg gtgaatgagg 720  
ttgttggtga aaaggggtgtg cttgcccctcg acaacgaaga ggctcctggt gctttcttgg 780  
attcacttct cctcggggag tgggaggatc gtgtgcagag aggactcttt cgttacgatg 840  
tcaactgctg cgaaaccaag gttattccgg gagagtatgg cttcattgag cagctgaacg 900  
agggtcgtca ccttaagaag aggccaactg agtttcgtgt tgataaggtc ctgcagccct 960  
tcgatgggag caaattcaac ttcactaaag ttggacagga agaggttctg ttccagtttg 1020  
aagcaagcaa cgacaacgaa gtccagttct tcccaaatgc acctgttgat gttgagaatt 1080  
ctcccagtgt tgtggccatc aatgtagtgc ctattgaata tggtcacgta cttctcatcc 1140  
cttcgattct tgaatgcctg cctcaaagga ttgacagga gagcttcttg cttgctcttc 1200  
acatggcagc agaagctgga aaccctact tccgattggg ttacaacagc ttgggtgcat 1260  
ttgccactat caatcacctt catttccagg cttattactt agccgtgccc ttcctatcg 1320  
agaaggctcc cactaggaag ataactactc tgaatgggtg ggtgaaaatc tctgagctgc 1380  
taaattatcc agtcaggggg cttgttttcg aggggtgaaa tactctggaa gatttgcca 1440  
atgccgtctc tgattccagc atttgcttc aaggcaaca cataccttac aatgtgctta 1500  
tctccgatc tggaaagcgt atctttcttt taccacagtg ttacgctgag aaacaggctc 1560  
ttggagaagt gagttctgag cttctggaca cacaagtga cccggcagtg tgggaaatca 1620  
gcgacatat ggttttgaag aggaaggagg actatgagga ggcgtctgaa ggaaatgctt 1680  
ggaggctcct tgctgaggtc tccctttcgg gggagagggt tgaagaagtc aaggcattga 1740  
tctttgaagc catctcttgt gctgatgata gaagcagcag cacagctgag aacttgcttg 1800  
aggagccaga tgacaatcct caatctcgtg aagaagcaaa tgatgccctt aacaaggct 1860  
cccactgtgg tatggtgccg ggaaagcaag aatgcctagt tcagcactga gaatttgggc 1920  
atgtgaagaa tgttcagtgg tttgtgtgca tctttaatta aataaggtag tactacgctg 1980  
tgggaatttg catgttcatg ttaattaaa taaggcaaac taggtttgag ttgttggtgt 2040  
tgttgctgct gctgctgctg ctgaagtgc ttctgttatg gcgacttgct ttcgtaatcg 2100  
cttttacttg tcccttctgg gcgtatgtaa aaatactatg tcgatttcgc tctcatgagc 2160  
taatgaatgc ttgtatgatt tggatttga aaaaaaaaa a 2201

<210> 17  
<211> 1894  
<212> DNA  
<213> Actinidia eriantha  
<400> 17

tctctccgtc cctctcaata gttgtctcca ttcgcagtaa aatcactaag gccgctcgtc 60  
 cctcagtgca caccacggcc cctccacagc cgcattcacc tctctctctc tctctctgct 120  
 ctatctatat atcccccaaa tctggcctct cttcacctca cccccaaaat ctacacaaaa 180  
 tcaatccttc atcatccaca tcggcctcca aaaccacct cttctccaca atccagacac 240  
 accttgagcg gctggcggtg agcgaataga tagatagata gagagatttt ctgcttcgat 300  
 cgggggtaaa acccgggtgt tgacaagtgt tagacatcac ggctatactc ggagtttctc 360  
 ggccgctcat acatgtccgg tctgtacgac gcaaggggtg tgtagtgcag agcaaccctt 420  
 cgccgcacgg aggacgtggc gccttgccgt ccgaaggcgg tagccccctc gacctcctct 480  
 tcctcgccgg cggcgggtcac ttcgctttct ccgctacta gcttattagg tttattctta 540  
 cttagtgagt aattcgtcct attatagttc gtaagtttat cgaagatctg ttacttgatt 600  
 cgtctttcgt tgctcgagtc ttgggtgttt tgctgtttct gagttcgaga tgttgaagat 660  
 caagaggggt ccgactgttg tttccaattt ccaaaggat gaggccgagg acggcgctcg 720  
 atccggcggg ggttgccggc gaaactgtct ccagaagtgt tgcattcaag gggcaaagct 780  
 acctctgtat gctttcaaga ggggtgaagg ggttggtggg gaaaagggtt tgcttaccgt 840  
 cggcgacgaa gaggctcctg ttgctttctt ggattcgtt cttctcgggg agtgggagga 900  
 tcgtgtgcag agaggactct ttcgctacga tgtcactgct tgccaaacca aggttattcc 960  
 gggagagtat ggcttcattg cgcagctgaa cgagggctct cacttaaga agaggccaac 1020  
 tgagtttcgt gttgataagg tcctgcagcc cttcgatgag agcaaattca acttactaa 1080  
 agttggacag gaagaggtgc tgttccagtt tgaagcaagc gtcgacaatg aagtccagtt 1140  
 tttcccaaat gcacctgttg atgttgagaa ttctcccagt gttgtggcca tcaatgttag 1200  
 tcctattgaa tatggcatg tacttctgat ccctcggatt cttgaatgcc tgcctcagag 1260  
 gattgacagg gagagcttct tgcttgetct tcacatggca gcagaagctg gaaaccgta 1320  
 ctccgattg ggttacaaca gcttgggtgc atttgccact atcaatcacc ttcatttcca 1380  
 ggcttattac ttagctgtgc ctttctctat agagaaggct ccactagga agataactac 1440  
 tctgaatggg ggggtgaaaa tctctgagct gctaaattat ccagtcagag ggcttgtttt 1500  
 cgaggggtga aattctctgg aagattgtc caatgccgtc tctgattcca gcatttgcct 1560  
 tcaatgcaac aacatacctt acaatgtgt tatctccgat tctggaaagc gcattcttct 1620  
 ctaccacag tgttatgctg agaaacaagc tcttgagaa gtgagttccg agcttctgga 1680  
 cacacaagt aaccggcag tgtgggaaat cagcggacat atggttttga agaggaagga 1740  
 ggactatcag gaggcgtctg aaggaaatgc ttggaggctc cttgctgagg tctcccttc 1800  
 ggaggagagg ttcgaagaag tcaaggcatt gatctttgaa gccatctctt gtgctgatga 1860  
 tagaagcggc agcacggctg agaacttgct cgag 1894

<210> 18  
 <211> 1941  
 <212> ADN

<213> Actinidia eriantha

<400> 18

```

gtttctcggc cgctcataca tgtccggctc gtacgacgca agggttgtgt agtcgagagc    60
aaccttcgc cgcacggagg acgtggcgcc ttgccgtccg aaggcggtag cccctccgac    120
ctcctcttcc tcgccggtgg cggtcacttc gctttctccg tctactagct tattaggttt    180
attcttactt agtgagtaat tcgtcctatt atagttcgta agtttatcga agatctgtta    240
cttgattcgt ctttcgttgc tcgagctttg gtgtttttgc gttttctgag ttcgagatgt    300
tgaagatcaa gagggttccg actgttgttt ccaatttcca aaaggatgag gccgaggacg    360
gcgctcgatc cggcgggtgg tgcggccgaa actgtctcca gaagtgttg cttcaagggg    420
caaagctacc tctgtatgct ttcaagaggg tgaaggagg tgttggtgaa aagggtttgc    480
ttgccgtcgg cgacgaagag gctcctgttg ctttcttgga ttcgcttctt ctcggggagt    540
gggaggatcg tgtgeagaga ggactctttc gctacgatgt cactgcttgc gaaaccaagg    600
ttattccggg agagtatggc ttcatcgcc agctgaacga gggtcgtcac cttaagaaga    660
ggccaactga gtttcgtgtt gataaggctc tgcagccctt cgatgagagc aaattcaact    720
tcactaaagt tggacaggaa gaggtgctgt tccagtttga agcaagcatc gacaatgaag    780
tccagttttt cccaaatgca cctgttgatg ttgagaattc tcccagtgtt gtggccatca    840
atgttagtcc tattgaatat ggtcatgtac ttctgatccc tcggattctt gaatgcctgc    900
ctcagaggat tgacagggag agcttcttgc ttgctcttca catggcagca gaagctggaa    960
acccttactt ccgattgggt tacaacagct tgggtgcatt tgccactatc aatcaccttc   1020
atctccaggc ttattactta gctgtgccct ttcctatcga gaaggctccc actaggaaga   1080
taactactct gaatggtggg gtgaaaatct ctgagctgct aaattatcca gtcagagggc   1140
ttgttttcga ggggtgaaat tctctggaag atttgtccaa tgccgtctct gattccagca   1200
tttgccctca atgcaacaac ataccttaca atgtgcttat ctccgattct gaaagcgca   1260
tctttctctt accacagtgt tatgctgaga aacaagctct tggagaagtg agttccgagc   1320
ttctggacac acaagtgaac ccggcagtgt gggaaatcag cggacatag gttttgaaga   1380
ggaaggagga ctatcaggag gcgtctgaag gaaatgcttg gaggctcctt gctgaggctc   1440
ccctttcgga ggagagggtc gaagaagtca aggcattgat ctttgaagcc atctcttgtg   1500
ctgatgatag aagcggcagc acagctgaga acttgctcga ggagccagat aacgatcctc   1560
aatctcgtga agtagcgaat gatgccctta gcaaagcctc ccaccgagg atggtgccag   1620
ggaagcaaga atgcctagtt cagcactgag aatgtggca tttgaagaat gttcagtggg   1680
ttgtatgcgt cttaattaa atatggtatt actactatct gggaaattgc ttgttaatgt   1740
taaatatccc taaataaggc aaactagggt tgcgttgttg ttgttgtgt tgttgttgaa   1800
gttgcttctg ttctggggat ttgctgttgt aatctgtttt tacttgtcgc ttgtgcccat   1860
atgtaaaaat actgtggatt tcactctcac gagctaata atgcttgtat gatttgggat   1920
tgtaatttca aaaaaaaaaa a                                           1941

```

<210> 19  
 <211> 2010  
 <212> ADN  
 <213> Malus sieboldii

<400> 19  
 caggttcgac gagttgtaga catcacggct atacacggag ctccctggcc gctcattcat 60  
 gtccgggctg tccgacgaaa gggttgtgta attgagagca acccttcgcc gcacggcggg 120  
 cgtggcgctt tgccttccga aggcggtagc ccctccgacc tgctcttctt ggctgggtggc 180  
 ggttctgcat cctctgtttt tctcttctgc ttatattagc ttttttagac tttcttggtt 240  
 agattcttag aagatcttag agattttttt cttctataaa gtgcacgagt agatcatatt 300  
 gttgttttcg ggggtttttg ggtttggtgg tgtttgattt tactgagaat taagaaaaaa 360  
 aaagggaaaa aaaagagagg gagaaagaag gggagggagc atgatgttga ggatcaagag 420  
 ggttcccacc gtcttttcga attaccagaa agatgaggcg gaggagggtg ctccgccgct 480  
 cgagggttgt ggccgcaatt gccttaacca atgttgcatc ccaggggcaa aacttcatt 540  
 gtatgccttc aagaagcgga acgtgaataa tggtgacacg ggtgtgcccg gacatgacaa 600  
 aagagagcct cccgttgctt ttcttgactc gctgcttctc ggggagtggg aggatcgcat 660  
 gcagagaggg ctatttcgct atgatgtcac tgcttgtaga accaaggatga tcccagggca 720  
 atatggtttc attgccagc tgaatgaggg tcgccatctt aagaagagac caactgagtt 780  
 tcgagttgat aaggtcctcc agccctttga tagcagcaag ttttaacttca ctaaagttgg 840  
 acaagaggag gttctattcc ggtttgaagc cagtgaagat ggtgaagttc actttttccc 900  
 tagtgcaccc attgatgttg aaaattctcc gagcgttggt gccattaatg tcagtcctat 960  
 tgaatatggc catgtgctgt tgattcctcg tatttttgag cgtttgccac aaaggattga 1020  
 ccgggaaagc ttcttgcttg cacttcacat ggcggctgaa gctgggagtc cttactttcg 1080  
 attgggttac aacagcttggt gtgcatttgc taccatcaat caccttcaact tccaggctta 1140  
 ctacttgccc gtgacctttc ccattgagaa ggctcctacc aagaaaatat ccactctgaa 1200  
 tgctgaggtg aaggtctctg agcttctgaa ctatcctgtc agaggtcttt tttttgaggg 1260  
 tggaaacact ctggaagatt tgtcttacac cgtctctgat gcctgcatat gccttcaaga 1320  
 aaacaacgta ccgtacaatg tccttatctc tgattgtgga aagcgaatct ttctcctgcc 1380  
 acagtgttat gctgagaaac aagctcttgg agaagtgagt gcagaggttc tggatacaca 1440  
 ggtgaatcca gcggtgtggg aaattagtgg gcatatggtc ttgaagagga aaaaggacta 1500  
 cgacgaggct tcagatgaaa atgcttgga gctcctggca gaggtttccc tttctgaaga 1560  
 gaggttccaa gaagtgaatg ctcttatttt cgaacgtatt gcttccgta ataatgggaa 1620  
 tgaaaatttg ccggaggatc cagaagtaa gcctcgttct catgaagaag tcgacgctac 1680  
 cattaacaaa agctcccgcg ctgctatggt tggtgagaca caagaatgca ttgttctgca 1740  
 gtaaattgagc agattgggtg gtgtttacaa tgtgaatcta gtattgcagt attcgatttg 1800

ES 2 543 130 T3

ggttaatgtc tgtacctttt attggatgct agccgatgcc taaataagca aaactggttt 1860  
 tgcatagtca gctgttcatg gtttgcagtg tttgtgtatt ctgcgtaaca acttcgatct 1920  
 atttgtttag ggtgctttat ggatacgtaa aatcccttgt ggttactatt gtgggtgaat 1980  
 aaatgttatt ttctgtgtaa aaaaaaaaaa 2010

<210> 20  
 <211> 1425  
 <212> ADN  
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 20  
 ttacgtacag ttctatctag tattctcttg attattcgaa gaaaaacaca aaaagatgat 60  
 gctcaagatt aagagggttc ctacacttgt ttctaacttt caaaaggatg aggctgatga 120  
 aattggtgct cgtggtgctg gttgtggccg gaattgcctc aggaattgct gccttccagg 180  
 ttcaaagctg ccaactgtatg gtttcaaaaa tttgagctac ggcaagtctg ttgccgccga 240  
 tgaacaaaag gaatctccga tcgactttct ggaatccctt gttcttgggg aatgggagga 300  
 tcgctcagcag aaaggcctct ttcgctatga tgcactgct tgcgaaacca aggtgattcc 360  
 tggagaatat ggtttcgttg ctcaactgaa tgagggagg cacctcaaga agaggccaac 420  
 tgagtttca gttgataagg tgctgcagcc ttttgatgga agcaagtca acttcactaa 480  
 ggttggacag gaagagttgc tctttcagtt tgaagcaagt gaggaagatg aagtccagct 540  
 ctatccaaat gcaccaattg atcctgagaa atctccaagt gtcattgcca tcaatgtcag 600  
 tcccattgag tacggacacg tgcctttgat ccctaaggtc cttgaatgcc ttccccagag 660  
 gatcgacagg gacagcttcc tgcttgatt gcacatggct gctgaagcag caaacccata 720  
 cttccgattg ggttacaaca gcttgggtgc atttgccacc atcaaccatc ttcacttcca 780  
 ggcttatttc ttggtgtgc aattccccat tgagaaggcc ccaactcaga agataaccgt 840  
 cactgatact ggagtgaaga tctcggagat gcttaattac ccagttcgag gtctcgtctt 900  
 tgaggggtga aatactttgg aggatttggc caatgtcgtc tcagattctt gcatttgtct 960  
 gcaagagaac aacatccctt acaatgtcct aatctccgat tcaggaaaaa ggatattcat 1020  
 tctcccacag tgctatgcag agaaacaagc tcttggagag gtcagcgtg aactcctcga 1080  
 cacccaagtc aatcctgctg tttgggagat tagtggacac atggcttga agaggaagga 1140  
 ggattatgag ggtgcaactg aggcaaatgc atggaggctt ctgccgagg tctcactctc 1200  
 tgaagcaagg ttccaagaag tgactgctct catctttgaa gctattagtc tcagtgttga 1260  
 agagaatgag aacgccaatg atggttctcc tgaggatcta gatgtcacac ctccacagcc 1320  
 catggaggag attgatgggt ctcacacca tagtaccatg gttcccgcct agggttttca 1380  
 cggcccagct ctggtgtttt atcgcattga tgatttcag aattt 1425

<210> 21  
 <211> 2043  
 <212> ADN  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 21  
 ggtatcatca aaaaacacct caaagaatta ttcattcagg catcttctca aatTTTTgtt 60  
 tgtgaaaaaa acccacatca aaagatctct catttattcg tttcgtttct gctgTTTTga 120  
 gtgtcgggtt cgTTTTagct gtaatctttt tttccggcgt tcgatttgaa aaaatccggg 180  
 gaacaggtga tcggaatcac ggctatacac gggatatacac ggggtgTTag ctcacatgtc 240  
 catattgtcc gacagaaggg ttgtttaatc gaaactaatc ctttgccgca cggaggacgt 300  
 ggagctctgc cgtctgaagg cggcagccct tccgatctcc tctttctcgc cggTggcggT 360  
 tccagcttta acttcttttc ctttaggttt taggagttag ggTTTgTTag TgTTTTtcc 420  
 tctttctttt tttggTgctc ttgaatcgtc tttttctTgg gggaagTTTT tctTTTTgct 480  
 cttcgaaatt TgtctTTTTt gagaatgttg aaaatcaaaa gagtccgac cgtTgtttcg 540  
 aactaccaga aggacgatgg agcggaggat cccgtcggct gtggacggaa ttgctcggc 600  
 gctTgttgcc ttaacggggc taggcttcca ttgtatgcat gtaagaatct ggtaaaatcc 660  
 ggagagaagc ttgtaatcag tcatgaggct atagagcctc ctgtagcttt tctcgagTcc 720  
 cttgttctcg gagagTggga ggataggttc caaagaggac tttttcgtcT tgatgtcact 780  
 gcctgcgaaa ccaaagttat cccggggaag tatggTTTTc ttgctcagct taacgagggt 840  
 cgtcacttga agaagaggcc aactgagTtc cgtgtagata aggtgttgca gtctTTtgat 900  
 ggcagcaaat tcaacttcac taaagTtggc caagaagagt tgctcttcca gttTgaagct 960  
 ggtgaagatg cccaagTtca gttcttccct tgcatgccta ttgaccctga gaattctccc 1020  
 agtgtTgttg ccatcaatgt tagtccgata gagtatggcc atgtgctgct gattctctgt 1080  
 gttctTgact gctTgcctca aaggatcgat cacaaaagcc tttTgctTgc agTtcacatg 1140  
 gctgctgagg ctgctaatec aacttcaga ctcggttaca acagctTggg TgctTTtgcc 1200  
 actatcaatc atctccactt tcaggcttat tactTggcca Tgcctttccc actggagaaa 1260  
 gtcctacca agaagataac taccactgtt agTggTgtca aaatctcaga gcttctaagt 1320  
 taccctgtga gaagTcttct cttTgaaggT ggaagctcta Tgcaagaact atctgatact 1380  
 gtttcagact gctgtgTTTg cttcaaaaac aacaacattc ctttcaacat tctcatctct 1440  
 gattgtggaa ggcagatctt cttaatgcca cagtgtTtag cagagaaaca ggctctaggt 1500  
 gaagtgagcc cggaggTatt ggaaacacaa gtgaaccag ccgtgtggga gataagTggt 1560  
 cacatggtac tgaagaggaa agaggattac gaaggTgctt cagaggataa cgcgtggagg 1620  
 ctctTgcgg aagcttctct gtcggaggaa aggtTtaagg aggttactgc tctcgccttt 1680  
 gaagccatag gttgtagtaa ccaagaggag gatctTgaag gaaccatagt tcatcagcaa 1740  
 aactctagTg gcaatgttaa ccagaaaagc aacagaacc atggaggTcc gatcacaat 1800  
 gggacggccg ccgagTgcct Tgtcctcag tgaacaatat ggtgactTgg TggTTTgtat 1860  
 gtataattaa aagcctaata aagcaaacTc tctTtTgagt TgcattTgaa gcttctTggt 1920  
 ttatgtatga TggtTgtggg cattTtTgTc ctagacttct ggttctTtTgt tttTtTtat 1980

gagtcgggtg ttatgaatta tatatgttct tcactaatat gattattatt tgtataaaaa 2040  
aag 2043

<210> 22  
<211> 1874  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22  
caaaatctca cacatcaaac acgtgaattt gctctctttc tggttcactc acctaccatt 60  
actataagtc tgaagagtg attgaaacc acctcgaaaa atctatcctt ttttttgttt 120  
tccttctccg gcgaatccc ggggagattg gtaatcggta atcacggcta ttacgggat 180  
aaagccacgg cctttgagct ttcattgtcca acgaaaggt tgtttaatca taactaatcc 240  
tttgctcac ggaggacgtg gagctctgcc gtctgaaggc ggcagtccct ccgatctctt 300  
cttctctgcc ggaggcggtt ccacaaatag ccactaacc taaccctttt tctaattagg 360  
tttttagttc ttagagtctt gtattaatct gttatttcga gattataata tttgtgagca 420  
atgttgttga agatcaaaag agttccaaca gttgtatcga attatcaaaa agatgagaca 480  
gttgaagaag gtggatgtgg tcggaattgt ctgagcaagt gttgcatcaa tggggcaaga 540  
cttcttttat atacctgcaa gaatcttgat aatccgtcg gagagaacac agaattctccg 600  
gtgacgttcc tcgaatcctt agttattgga gagtgggaag atcgtttcca aagaggctctt 660  
tttcgctatg atgtcaccgc ctgcgaaacc aagggtatac cggggaagta cggtttcatt 720  
gcgagctga atgaaggctg gcatctcaag aagagaccaa ccgagttccg tgttgacaaa 780  
gttcttcaac catttgatgg aaacaaattc aatttacta aagtgggtca agaagagttg 840  
cttttccagt ttaaagctag cactaatgat gatgatagtg aaattcagtt ctggcgagt 900  
atgcctctag acgetgataa ttctcctagc gtcggtgcaa tcaatgtgag tccgattgag 960  
tatgggcatg tgttgctgat tcctcgtgtt cttgattgct tacctcaaag gattgatcac 1020  
aaaagccttt tgcttctct tcaaatggcg gctgaagccg ataatccgta tttccgactt 1080  
ggatacaaca gtctaggcgc tttcgtacc attaaccatc ttcactttca ggcttactat 1140  
ttggcaatgc aattcccgat agagaaagct tcttcttga agatcactac caccaataat 1200  
ggcgtcaaaa tctctaaact cttgaattac cctgtgagag gtcttctagt tgaagggtgga 1260  
aacaccatta aagatctcgc agatactgta tcagacgcat ccgtttgtct tcagaacaac 1320  
aacattcctt tcaacattct catctctgac tctggcaaac gaatcttctt tctccctcag 1380  
tgttacgcag agaaacaggc tttaggagaa gtttagctcaa cgctattgga tacgcaagtg 1440  
aatccagcgg tttgggagat gagtggacac atggtgttga agaggaaaga agactatgaa 1500  
ggagcgtcag aagagaaggc atggaggtta ctagctgaag tttctttatc agaggagaga 1560  
ttcagagaag ttaacactat gatatttgat gccatcggtt ttagtagtca cgaagaagaa 1620  
gaagaagagg agcttgaaga gcagaattcg atgaatggtg gcagcttcac aatagtgcat 1680  
tgtccttcag tgaagaaga ggctgtctct aattgaggcg ctttataact aaaagcaaaa 1740

acataactgt cgtcgtgatt ttgcataact tgggttgac atttactgt tttgtagttt 1800  
 ttttcttttc ttcttggtt tgttacgtct ttgttcgaac ctttgaatc aataaaatcg 1860  
 aaatcgcccta attc 1874

<210> 23  
 <211> 2013  
 <212> ADN  
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 23  
 gattgaccaa aatacgtgtg caagagagag accaccggag caccaaacgc cacccaacaa 60  
 ccaccattc aattcttcta gaaaagaaca tcttctcaa aattatcgat gaaggatcgc 120  
 tctcagtaa ttgttcgtt atcctacaaa ttcaatcacg gctcttcttg aatcttctgt 180  
 ttgtattctc acaattcatc atcaccgcaa agtgttgacc cttaatcaa ctcttctggt 240  
 ggacgataag caccggacc cttccccca cggaggtagg ggtgcctcac ccgctgaagg 300  
 cggttgcccc tccgatctcc tcttctcgc cggcggcggg ccaattcttc ctttctctt 360  
 ttcttctcc taatrttctg tataagagt ttatttttga ttatccatcc aagaacagga 420  
 ccgatgttga ctgtaaagag ggtgcctaca ctggtttcca actatcaaga ggatgttctc 480  
 gaaggtaacg tcatgggtt tggccgcaag tgcctcggaa aatgctgcat gcctgtttca 540  
 gtacttctc tatatgcatt caagaatgat gataatgagc caattgaaa tgatgttcaa 600  
 acctgcctg aggaggagt tcagatgtca ttcttgaacg atttgttgtt gggcttatgg 660  
 gaggagcggg tgagccagg actatcttca tatgatgtga caacctgtga gacgaaggtc 720  
 attcctggga gatgtggtt tattgcgcaa ctgaatgagg ggcgccacct aaagaagcgc 780  
 ccaacagagt ttgcatgga taaggttctt cagcctttt acgagaacaa attcaacttt 840  
 accaaagtgg gccaggaaga agtgctttc aggtttgaac caagtaccga ctacaaggcc 900  
 cttactttt ccggcatgag agtaaacagt ggtatttcac ctagtattgt tgctatcaat 960  
 gtgagcccaa ttgagtatgg gcacgttctt ttgatactc gagttcttga ttgcttacct 1020  
 cagagaattg atcgtgatag ttttgcaatt gctctccatt ttgccagaga agtggcagat 1080  
 ctttctttta ggtaggtta taacagttt ggctctttt ctaccattaa ccacctccac 1140  
 tccaggcgt attacttgtc agtgccattt ccagttgaga aagcaccaat acagaaaata 1200  
 ctggcaagga agggctggg tgggtgctgga gtgattgtat ctaagttatt aaattacccc 1260  
 gtacgaggtt ttgcttttga gggaggaaat ggaagtactg cccgtgattt gtctgatgct 1320  
 gttgtgaatt cctgcatttc cttcagaat aaaaacatcc ctttcaacat tctcattgct 1380  
 cagtgtggaa agaagatttt tctgcttccc cagtgttatg cagagaagca agcactagga 1440  
 gttgtagacc aagagctcct ggacactcag gtgaaccctg ctgtatggga aattagtgga 1500  
 catatagtgc ttaagcgaac aaaggattac aatgatgcat cagaggaata tgcatggaaa 1560  
 cttcttctg aggtttccat atcagaggag agatttgaag aagtaaaggg ctatatttct 1620

gaagcagctg atctacaagc agatgaggat gaaaacatca atccagagaa ggaaattcca 1680  
gattctcctg. gtccgcaggt ggcctcacat attcctccag attgtttggt gttgcagtga 1740  
agaatthgtg gcttgctctt gcaagatcta ataaaagttt gaagtattat ctagtgtatg 1800  
gttgaaatth tgtgtgtttg tttttccagc atcttgtttg atgcatactg ttgtcttggt 1860  
tggaggttgat aatccccaaa tagtgttaaa cgtcatggct gcaagctgtg gtctttggca 1920  
ggattgttta cagtaccttt tttgttggtg ttttgactgt gctagcaaat gttcctaata 1980  
ataacaccag tgtaggacca aaaaaaaaaa aaa 2013

<210> 24  
<211> 2086  
<212> ADN  
<213> *Oryza sativa*

<400> 24  
accaccacca ccgtcgccgc cgccgcccgc tgagaagagg aagaggaaga ggggagattc 60  
cgccgcccgc gagaggtggg ggggagtggt ttgtgatcgt gaggagggtc ctcaccccta 120  
gacgggagag ttgaaaggcg gcaaagacgg cttagcgttga agcggtcggg cgcgccacag 180  
cagctgcgcc gccacgccc agtgggggag ccatcgcttc tccggcgagc gcgtccagcc 240  
cagccccgca cggcgcccgc ggggagcttc cctcggcccg cggcagcccc tctgacctcc 300  
tcttctctgc cggcgggcgt cgctctgag accgctcgcc cccccatcc accttctcta 360  
acatccaatc aacaaaaatc tttcgctgac ctgaccctga ccccgagaga gaggaaggaa 420  
ttgagattta atcatggaga tgaagctgac catcaagcgg gtgcccaccg tggtttccaa 480  
ctaccaggag gatgctgccg ccaccgcccg cgaacgcccc cgcgccggct gcgggagggg 540  
ttgcctcggg gattgctgct tgcccgattc caagcttccg ctgtatgctt tcaaggcgag 600  
tccgaaaaag ccgtcttcgc aggaggatgc ttccaacgat gatttcttg tcaatctcct 660  
gctcggcctg tgggaagaca ggatggcccg aggtttgttc cgatatgatg tcaactgectg 720  
tgagaccaag gttatcccag gcaaccttgg gtttgttgca caactgaatg aaggacgcca 780  
cctcaagaag cgccctactg aattccgctg ggaccgtgtg cttcaacctt ttgatgctgc 840  
caagttcaac ttcaccaaag ttggccagga ggaggtgctc ttccaatttg agaatggtgg 900  
tgggtgatgac agcttctttg tggagagctc cccaatcagt gttgctgatc gtgctcctaa 960  
tgttgttgca atcaatgtaa gcccaattga atatggccat gttcttctca tccccgtgt 1020  
actggaccgc ctgcctcaga ggattgacca ggagagcttc ttgcttgac tgacatggc 1080  
tgctgaagcc gcaagcccat acttcaggct tggctataat agtttgggtg cttttgcaac 1140  
catcaaccac ctccactttc aggcatacta cttgacagtg cttttccctg ttgagaaggc 1200  
agctaccaag aggattttcc ttgctgaggg cacaatgaat agtggagtaa aggtgtccaa 1260  
gctgatgaac taccctgtga ggggactggt ttttgaggga ggcaactcac tgagcgatct 1320  
ggccaatgtg gtttccagcg cttgtatctg gctgcaggac aacaatgtgc cttacaatgt 1380  
tcttatctct gactgcggca aaaagatctt cctcttccct cagtctatg ccgagaagca 1440

ggctctggga gaagtgagcc aggagctact ggacacgcag gttaaccag ctgtgtggga 1500  
 gatcagtggc cacatcgtgc tgaaacgaag gaggattac gaggaggcat cagaagcttc 1560  
 tgcgtggaga ctctcgcgtg aggtttccct gtcggaggaa cgcttcgagg aagtgaaggc 1620  
 ctacatcttt gatgccgctg gtctggttca gtccgacgag gaggaagtca gcgaagacga 1680  
 ggacgccacc tacacgcctg tctccattgc cctcctgct gtcgcggaag gctgcctcgt 1740  
 ccttcagtga gacggtagaa caggttgtcg gcctggtaaa gcgctgtgcc gccttcgtct 1800  
 tctcatcagt ctcttcagt cttcaccgcg tggtegccta gcttcgtcat agttatggtt 1860  
 gctggtcttt tataaggatc aatgtaatcg aactgcctgg agtcttgtgt ctgaacctgc 1920  
 atgctacttg ctctccctt cctgctgct ctgatattca gactctgcaa atattaagca 1980  
 gagaaactgt gaaactgttt gtattgtttg tgctgttgag cactggatct aatgtgatga 2040  
 acattgttaa taactacaca tcttcctga tctgtttgc tgtttt 2086

<210> 25  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 <213> Actinidia eriantha  
 <400> 25

Met Gly Ser Thr Gly Glu Ser Asn Tyr Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Pro Glu Ala Lys Leu Arg Ile Ser Ile  
 20 25 30  
 Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45  
 Gly Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60  
 Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Val Asp Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Thr Arg Val Asp His Val Phe  
 85 90 95  
 Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110  
 Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Leu Glu  
 115 120 125  
 Ala Ala Arg Val Asn Gly Ile Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Asp Thr Asn Val Ser Leu Lys



ES 2 543 130 T3

Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Pro Glu Ala Lys Leu Arg Ile Ser Ile  
 20 25 30  
 Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45  
 Gly Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60  
 Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Val Asp Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Thr Gly Val Asp His Val Phe  
 85 90 95  
 Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110  
 Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Leu Glu  
 115 120 125  
 Ala Ala Arg Val Asn Gly Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Asp Thr Asn Val Ser Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Asp Ala Trp Pro Ala Glu Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu Glu  
 165 170 175  
 Lys Leu Ala Thr Glu Glu Leu Cys Lys His Tyr Thr Lys Asp Phe Gly  
 180 185 190  
 Ile Glu Cys Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Phe Gly  
 195 200 205  
 Thr Trp Lys Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys  
 210 215 220  
 Thr Leu Thr Ser Thr Asp Arg Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Thr Arg Ser Phe Thr Phe Ile Asp Glu Cys Val Glu Gly Val Leu Arg  
 245 250 255  
 Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser Asp Glu  
 260 265 270  
 Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu Ile Val Leu Ser Phe Glu Asp  
 275 280 285

Lys Lys Leu Pro Ile His His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg Gly  
 290 295 300

Arg Asn Ser Asp Asn Thr Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp Ala Pro  
 305 310 315 320

Thr Met Lys Leu Lys Asp Gly Leu Arg Phe Thr Tyr Phe Trp Ile Lys  
 325 330 335

Glu Gln Leu Glu Lys Glu Lys Ala Gln Gly Ile Asp Leu Ser Thr Tyr  
 340 345 350

Gly Ser Ser Lys Val Val Gly Thr Gln Ala Pro Val Gln Leu Gly Ser  
 355 360 365

Leu Arg Ala Ala Asp Gly Lys Glu  
 370 375

- <210> 27
- <211> 376
- <212> PRT
- <213> Malus x domesticus

<400> 27

Met Gly Ser Thr Gly Glu Ile Lys Tyr Gly Ala Tyr Thr Tyr Glu Asn  
 1 5 10 15

Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Pro Ser Glu Lys Leu Arg Ile Ser Ile  
 20 25 30

Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45

Asn Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60

Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Ala Asp Leu Arg  
 65 70 75 80

Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Lys Asn Val Asp His Val Phe  
 85 90 95

Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110

Ser Val Ile Phe Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Val Glu  
 115 120 125

Ala Ala Arg Ile Asn Asp Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
 130 135 140

ES 2 543 130 T3

Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Glu Thr Asn Val Ser Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Asp Ala Trp Pro Ala Glu Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu Glu  
 165 170 175  
 Lys Leu Ala Thr Glu Glu Leu Cys Lys His Tyr Thr Lys Asp Phe Gly  
 180 185 190  
 Ile Glu Cys Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Phe Gly  
 195 200 205  
 Thr Trp Lys Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys  
 210 215 220  
 Thr Leu Thr Ala Thr Asp Lys Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Thr Arg Ser Phe Thr Phe Ile Asp Glu Cys Val Glu Gly Val Leu Arg  
 245 250 255  
 Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser Asp Glu  
 260 265 270  
 Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu Ile Val Leu Ser Phe Glu Asp  
 275 280 285  
 Lys Lys Leu Pro Ile Gln His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg Gly  
 290 295 300  
 Arg Asn Ser Asp Asn Thr Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp Ala Pro  
 305 310 315 320  
 Thr Met Arg Leu Lys Asp Gly Leu Arg Ile Thr Tyr Phe Trp Ile Lys  
 325 330 335  
 Glu Gln Ile Glu Lys Glu Lys Ala Gln Gly Ala Asp Leu Ser Val Tyr  
 340 345 350  
 Gly Ser Ser Lys Val Val Gly Thr Gln Ala Pro Val Gln Leu Gly Ser  
 355 360 365  
 Leu Arg Ala Ala Asp Gly Lys Glu  
 370 375

<210> 28  
 <211> 377  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 28

ES 2 543 130 T3

Met Gly Thr Thr Asn Gly Thr Asp Tyr Gly Ala Tyr Thr Tyr Lys Glu  
1 5 10 15

Leu Glu Arg Glu Gln Tyr Trp Pro Ser Glu Asn Leu Lys Ile Ser Ile  
20 25 30

Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
35 40 45

His Glu Gly His Tyr Val Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
50 55 60

Met Thr Glu Asp Met Phe Cys Asp Glu Phe His Leu Val Asp Leu Arg  
65 70 75 80

Val Met Glu Asn Cys Leu Lys Val Thr Glu Gly Val Asp His Val Phe  
85 90 95

Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
100 105 110

Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Ile Glu  
115 120 125

Ala Ala Arg Ile Asn Gly Ile Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
130 135 140

Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Glu Thr Thr Asn Val Ser Leu  
145 150 155 160

Lys Glu Ser Asp Ala Trp Pro Ala Glu Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu  
165 170 175

Glu Lys Leu Ala Thr Glu Glu Leu Cys Lys His Tyr Asn Lys Asp Phe  
180 185 190

Gly Ile Glu Cys Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Phe  
195 200 205

Gly Thr Trp Lys Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg  
210 215 220

Lys Ala Gln Thr Ser Thr Asp Arg Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly Leu  
225 230 235 240

Gln Thr Arg Ser Phe Thr Phe Ile Asp Glu Cys Val Glu Gly Val Leu  
245 250 255

Arg Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser Asp  
260 265 270

Glu Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu Met Val Leu Ser Phe Glu  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Leu Pro Ile His His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg  
 290 295 300  
 Gly Arg Asn Ser-Asp Asn Asn Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp Ala  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Met Arg Leu Lys Glu Gly Leu Arg Ile Thr Tyr Phe Trp Ile  
 325 330 335  
 Lys Glu Gln Ile Glu Lys Glu Lys Ala Lys Gly Ser Asp Val Ser Leu  
 340 345 350  
 Tyr Gly Ser Ser Lys Val Val Gly Thr Gln Ala Pro Val Gln Leu Gly  
 355 360 365  
 Ser Leu Arg Ala Ala Asp Gly Lys Glu  
 370 375  
 <210> 29  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 <213> Malpighia glabra  
 <400> 29  
 Met Glu Ser Ser Asp Gly Thr Asp Tyr Gly Ala Tyr Thr Tyr Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Pro Ser Glu Lys Leu Arg Ile Ser Ile  
 20 25 30  
 Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45  
 Ser Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60  
 Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Val Asp Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Lys Asp Ala Asp His Val Phe  
 85 90 95  
 Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110  
 Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Leu Glu  
 115 120 125  
 Ala Ser Arg Ile Ser Gly Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala



<400> 30

Met Gly Ser Ser Glu Lys Asn Gly Thr Ala Tyr Gly Glu Tyr Thr Tyr  
 1 5 10 15

Ala Glu Leu Glu Arg Glu Gln Tyr Trp Pro Ser Glu Lys Leu Arg Ile  
 20 25 30

Ser Ile Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Gly Ser His Ile Ala Arg Arg  
 35 40 45

Leu Lys Ser Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn  
 50 55 60

Glu His Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Val Asp  
 65 70 75 80

Leu Arg Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Asn Gly Val Asp His  
 85 90 95

Val Phe Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser  
 100 105 110

Asn His Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met  
 115 120 125

Leu Glu Ala Ala Arg Ile Asn Gly Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser  
 130 135 140

Ser Ala Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Glu Thr Asn Val Ser  
 145 150 155 160

Leu Lys Glu Ser Asp Ala Trp Pro Ala Glu Pro Gln Asp Ala Tyr Gly  
 165 170 175

Leu Glu Lys Leu Ala Thr Glu Glu Leu Cys Lys His Tyr Thr Lys Asp  
 180 185 190

Phe Gly Ile Glu Cys Arg Val Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro  
 195 200 205

Phe Gly Thr Trp Lys Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys  
 210 215 220

Arg Lys Ala Gln Thr Ser Thr Asp Arg Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly  
 225 230 235 240

Leu Gln Thr Arg Ser Phe Thr Phe Ile Asp Glu Cys Val Glu Gly Val  
 245 250 255

Leu Arg Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser  
 260 265 270

Asp Glu Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu Ile Ile Leu Ser Phe  
 275 280 285

Glu Asp Arg Glu Leu Pro Ile His His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val  
 290 295 300

Arg Gly Arg Asn Ser Asp Asn Thr Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp  
 305 310 315 320

Ala Pro Thr Met Lys Leu Lys Asp Gly Leu Arg Phe Thr Tyr Phe Trp  
 325 330 335

Ile Lys Glu Gln Ile Glu Lys Glu Lys Thr Gln Gly Val Asp Ile Ala  
 340 345 350

Gly Tyr Gly Ser Ser Lys Val Val Ser Thr Gln Ala Pro Val Gln Leu  
 355 360 365

Gly Ser Leu Arg Ala Ala Asp Gly Lys Glu  
 370 375

- <210> 31 ..
- <211> 350
- <212> PRT
- <213> Oryza sativa
- <400> 31

Met Ala Thr Lys Thr Lys Leu Arg Ile Phe Val Ala Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Phe Ile Gly Ser His Thr Ala Lys Arg Leu Lys Glu Glu Gly His Phe  
 20 25 30

Val Arg Val Ala Asp Trp Lys Arg Gln His Tyr Phe Glu Asp Ser Gln  
 35 40 45

Ile Cys Asp Glu Phe His Asp Val Asp Leu Arg Asp Leu Asn Asn Cys  
 50 55 60

Ile Lys Met Cys Glu Gly Met Asp Glu Val Tyr Asp Phe Ala Ala Asp  
 65 70 75 80

Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His Ser Val Ile Leu Tyr  
 85 90 95

Asn Asn Ile Met Ile Ser Phe Asn Met Val Glu Ala Ala Arg Arg Ser  
 100 105 110

Gly Ser Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ser Ser Ser Ala Cys Ile Tyr Pro  
 115 120 125

ES 2 543 130 T3

Glu Tyr Arg Gln Leu Glu Thr Ala Asn Pro Gly Leu Lys Glu Ser Asp  
 130 135 140

Ala Trp Pro Ala Gln Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu Glu Lys Leu Val  
 145 150 155 160

Thr Glu Glu Phe Cys Lys Tyr Tyr Asn Lys Asp Phe Gly Ile Glu Phe  
 165 170 175

Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro His Gly Thr Trp Lys  
 180 185 190

Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys Ala Leu Val  
 195 200 205

Cys Gly Asp Val Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly Glu Gln Thr Arg Ser  
 210 215 220

Phe Cys Tyr Ile Asp Asp Cys Val Glu Gly Val Leu Arg Leu Met Arg  
 225 230 235 240

Ser Asp Val Arg Glu Pro Ile Asn Ile Gly Ser Glu Glu Met Val Ser  
 245 250 255

Met Asn Asp Met Ala His Leu Val Leu Asp Phe Ala Gly Lys Lys Asp  
 260 265 270

Ser Thr Lys Leu His His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg Gly Arg  
 275 280 285

Asn Ser Asp Asn Thr Leu Ile Arg Glu Lys Leu Gly Trp Ala Pro Ile  
 290 295 300

Ile Asn Leu Lys Asp Gly Leu Lys Arg Thr Phe Asp Trp Ile Lys Ile  
 305 310 315 320

Gln Ile Glu Asn Glu Lys Ala Gln Gly Val Asp Val Ser Gln Tyr Ser  
 325 330 335

Gln Ser His Val Val Asn Gln Lys Pro Thr Asp Phe Thr Lys  
 340 345 350

<210> 32  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*  
 <400> 32  
 Met Ala Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Glu Glu  
 1 5 10 15

Tyr Trp Pro Glu Lys Lys Leu Lys Ile Cys Val Thr Gly Ala Gly Gly  
 20 25 30  
 Phe Ile Gly Ser His Leu Ala Lys Arg Leu Lys Glu Glu Gly His His  
 35 40 45  
 Val Val Ala Cys Asp Trp Lys Arg Asn Glu His Met Glu Glu Ala Met  
 50 55 60  
 Phe Cys Asp Glu Phe Ile Leu Ala Asp Leu Arg Leu Tyr Glu Asn Cys  
 65 70 75 80  
 Lys Lys Val Leu Glu Gly Cys Asp His Cys Phe Asn Leu Ala Ala Asp  
 85 90 95  
 Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His Ser Val Ile Phe Tyr  
 100 105 110  
 Asn Asn Val Met Ile Ser Phe Asn Met Met Glu Ala Met Arg Val Gln  
 115 120 125  
 Gly Val Thr Arg Cys Phe Tyr Ala Ser Ser Ala Cys Ile Tyr Pro Glu  
 130 135 140  
 Gly Thr Gln Leu Ser Thr Glu Met Gln Asp Gly Leu Lys Glu Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Ala Trp Pro Ala Gln Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu Glu Lys Leu Ala  
 165 170 175  
 Ser Glu Glu Val Tyr Lys His Tyr Gln Gln Asp Phe Gly Ile Gln Thr  
 180 185 190  
 Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Tyr Gly Thr Trp Lys  
 195 200 205  
 Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys Ala Ala Thr  
 210 215 220  
 Ala Glu Ser Glu Val Glu Met Trp Gly Asp Gly Lys Gln Thr Arg Ser  
 225 230 235 240  
 Phe Thr Tyr Ile Asp Asp Cys Val Glu Gly Ile Leu Arg Leu Thr Lys  
 245 250 255  
 Ser Asp Phe Ala Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser Asp Glu Met Ile Ser  
 260 265 270  
 Met Asn Asp Met Gln Ala Met Thr Leu Lys Phe Ala Gly Lys Asp Leu  
 275 280 285

Pro Ile Lys His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg Gly Arg Asn Ser  
 290 295 300

Asn Asn Glu Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp Ala Pro Ser Val Lys  
 305 310 315 320

Leu Ala Asp Gly Leu Lys Val Thr Phe Glu Trp Ile Ser Ser Lys Ile  
 325 330 335

Ala Glu Glu Lys Ala Lys Gly Val Asp Thr Ala Ala Ala Phe Gly Lys  
 340 345 350

Ser Thr Ile Cys Gly Thr Gln Ala Pro Thr Glu Leu Gly Gln Leu Arg  
 355 360 365

Ala Ala Asp Gly Asp Glu Lys Leu  
 370 375

- <210> 33
- <211> 403
- <212> PRT
- <213> Solanum tuberosum
- <400> 33

Met Gly Ser Ser Gly Gly Ile Asn Tyr Gly Ser Tyr Thr Tyr Glu Asn  
 1 5 10 15

Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Pro Ser Glu Lys Leu Arg Ile Ser Ile  
 20 25 30

Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45

Ser Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60

Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Ala Asp Leu Arg  
 65 70 75 80

Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Lys Gly Val Asp His Val Phe  
 85 90 95

Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110

Ser Val Ile Phe Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Met Glu  
 115 120 125

Ala Ala Arg Ile Asn Ser Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
 130 135 140

Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Glu Thr Asn Val Ser Leu Lys



ES 2 543 130 T3

<211> 376  
 <212> PRT  
 <213> Vitis vinifera

<400> 34

Met Gly Ser Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Gly Ala Tyr Thr Tyr Glu Glu  
 1 5 10 15

Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Gln Ser Glu Lys Leu Arg Ile Ser Ile  
 20 25 30

Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45

Thr Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60

Met Thr Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe Arg Leu Val Asp Leu Arg  
 65 70 75 80

Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Thr Gly Val Asp His Val Phe  
 85 90 95

Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110

Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Leu Glu  
 115 120 125

Ala Ser Arg Ile Asn Gly Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
 130 135 140

Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Glu Thr Asn Val Ser Leu Lys  
 145 150 155 160

Glu Ser Asp Ala Trp Pro Ala Glu Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu Glu  
 165 170 175

Lys Leu Ala Thr Glu Glu Leu Cys Lys His Tyr Thr Lys Asp Phe Gly  
 180 185 190

Ile Glu Cys Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Phe Gly  
 195 200 205

Thr Trp Lys Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys  
 210 215 220

Ala Leu Thr Ser Thr Asp Lys Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly Leu Gln  
 225 230 235 240

Thr Arg Ser Phe Thr Phe Ile Asp Glu Cys Val Glu Gly Val Leu Arg  
 245 250 255

Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser Asp Glu  
 .. 260 265 270

Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu Ile Val Leu Ser Phe Glu Asn  
 275 280 285

Lys Asn Leu Pro Ile His His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg Gly  
 290 295 300

Arg Asn Ser Asp Asn Thr Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp Ala Pro  
 305 310 315 320

Thr Met Lys Leu Lys Asp Gly Leu Arg Ile Thr Tyr Phe Trp Ile Lys  
 325 330 335

Glu Gln Ile Glu Lys Glu Lys Val Lys Gly Ile Asp Leu Ser Ile Tyr  
 340 345 350

Gly Ser Ser Lys Val Val Gly Thr Gln Ala Pro Val Gln Leu Gly Ser  
 355 360 365

Leu Arg Ala Ala Asp Gly Lys Glu  
 370 375

<210> 35  
 <211> 376  
 <212> PRT  
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 35

Met Gly Thr Ser Val Glu Thr Thr Tyr Gly Glu Tyr Thr Tyr Glu Asn  
 1 5 10 15

Leu Glu Arg Glu Pro Tyr Trp Pro Ser Glu Lys Leu Arg Val Ser Ile  
 20 25 30

Thr Gly Ala Gly Gly Phe Ile Ala Ser His Ile Ala Arg Arg Leu Lys  
 35 40 45

Thr Glu Gly His Tyr Ile Ile Ala Ser Asp Trp Lys Lys Asn Glu His  
 50 55 60

Met Ser Glu Asp Met Phe Cys His Glu Phe His Leu Val Asp Leu Arg  
 65 70 75 80

Val Met Asp Asn Cys Leu Lys Val Thr Lys Gly Val Asp His Val Phe  
 85 90 95

Asn Leu Ala Ala Asp Met Gly Gly Met Gly Phe Ile Gln Ser Asn His  
 100 105 110

ES 2 543 130 T3

Ser Val Ile Met Tyr Asn Asn Thr Met Ile Ser Phe Asn Met Met Glu  
115 120 125

Ala Ser Arg Ile Asn Ser Val Lys Arg Phe Phe Tyr Ala Ser Ser Ala  
130 135 140

Cys Ile Tyr Pro Glu Phe Lys Gln Leu Glu Thr Asn Val Ser Leu Lys  
145 150 155 160

Glu Ser Asp Ala Trp Pro Ala Glu Pro Gln Asp Ala Tyr Gly Leu Glu  
165 170 175

Lys Leu Ala Thr Glu Glu Leu Cys Lys His Tyr Asn Lys Asp Phe Gly  
180 185 190

Ile Glu Cys Arg Ile Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Phe Gly  
195 200 205

Thr Trp Lys Gly Gly Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys  
210 215 220

Ala Leu Thr Ser Thr Asp Lys Phe Glu Met Trp Gly Asp Gly Lys Gln  
225 230 235 240

Thr Arg Ser Phe Thr Phe Ile Asp Glu Cys Val Glu Gly Val Leu Arg  
245 250 255

Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly Ser Asp Glu  
260 265 270

Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu Ile Val Leu Ser Phe Asp Gly  
275 280 285

Lys Asn Leu Pro Ile His His Ile Pro Gly Pro Glu Gly Val Arg Gly  
290 295 300

Arg Asn Ser Asp Asn Thr Leu Ile Lys Glu Lys Leu Gly Trp Ala Pro  
305 310 315 320

Asn Met Lys Leu Lys Asp Gly Leu Arg Ile Thr Tyr Phe Trp Ile Lys  
325 330 335

Glu Gln Ile Glu Lys Glu Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Ser Thr Tyr  
340 345 350

Gly Ser Ser Lys Val Val Gly Thr Gln Ala Pro Val Glu Leu Gly Ser  
355 360 365

Leu Arg Ala Ala Asp Gly Lys Glu  
370 375

ES 2 543 130 T3

<210> 36  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> unidad epimerasa conservada 1

<400> 36

Val Leu Arg Leu Thr Lys Ser Asp Phe Arg Glu Pro Val Asn Ile Gly  
 1 5 10 15

Ser Asp Glu Met Val Ser Met Asn Glu Met Ala Glu  
 20 25

<210> 37  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> unidad epimerasa conservada 2

<400> 37

Gly Arg Phe His Asn Ile Tyr Gly Pro Phe Gly Thr Trp Lys Gly Gly  
 1 5 10 15

Arg Glu Lys Ala Pro Ala Ala Phe Cys Arg Lys  
 20 25

<210> 38  
 <211> 1384  
 <212> DNA  
 <213> Actinidia eriantha

<400> 38

agagagagag	agcattacat	agattcggta	ctcgaactct	ttcagaatgg	gaagcaccgg	60
tgaatctaac	tacggatcgt	acacctatga	gaaccttgag	agggaaacct	actggccgga	120
ggcgaagctc	cgcattctcca	taaccggagc	cggtgggttc	attgcctcac	acattgcaag	180
gcgactgaag	ggcgaggggc	attacatcat	tgcttctgac	tggaaagaaa	acgagcacat	240
gaccgaggac	atgttctgtc	acgaattcca	tcttgttgat	ctcaggggtga	tggacaactg	300
cttgaaagtc	acgaccagag	ttgatcatgt	gttcaatcct	gctgctgata	tgggtgggat	360
gggcttcatt	cagtccaatc	actcagtcac	tatgtataac	aacacaatga	tcagcttcaa	420
catgcttgaa	gctgctaggg	tcaatgggat	taagagggtc	ttttatgctt	ctagcgcttg	480
tatttacct	gaatttaagc	agttggacac	aaatgtgagc	ttgaaggaat	ctgatgcttg	540
gcccgtgag	cctcaagatg	cttatggttt	agagaagctt	gcaaccgagg	agttatgcaa	600
gcaactacacc	aaggactttg	gcattgaatg	taggattgga	cggtttcaca	acatctatgg	660
accttttgga	acctggaaa	gtgggagggg	gaaagcccct	gctgcattct	gcagaaagac	720
ccttacctcc	actgataggt	ttgagatgtg	gggagacggg	ctgcaaacc	gatctttcac	780
cttcattgat	gaatgtgtcg	aaggtgtcct	aagattgacg	aagtcagact	tcagagaacc	840
agtgaatatc	ggaagtgatg	agatggctag	catgaatgag	atggccgaga	tcgttctcag	900
cttcgagaac	aagaaactgc	ccatccatca	cattccgggc	ccagagggcg	tccgtggacg	960

ES 2 543 130 T3

aaactcggac aacaccctga ttaaggagaa gcttgggtgg gcccacta tgaaactgaa 1020  
 ggatgggctg agattcacat acttttgat caaggaacaa cttgagaaag agaaggctcg 1080  
 gggcatcgat ctgtcaactt atgggtcatc aaaagtgtg ggaacgcaag ccccagttca 1140  
 gttgggctct cttcgtgctg ctgatggcaa agaatgaagt ggataagacc gagcaggcta 1200  
 tccggtgaac ttgaggccga ggtttraattt atgattgttt tcgtgggatt tatgtacaag 1260  
 ggttgctggt taaattgcaa tctgctgttt cttctgcta taattgttat tgtacggcga 1320  
 aagatgccct actcttgat tccgtatctt gttgagagta ggcttctgtt gtaaaaaaaaa 1380  
 aaaa 1384

<210> 39  
 <211> 1388  
 <212> ADN  
 <213> Actinidia deliciosa

<400> 39  
 gtcttgagag agagagagag agagagagat ttactttggg agagcgaat ttatagctac 60  
 ggcactcgat ctctttcaga atgggaagca gcagtgaatc taactacgga tcgtacacct 120  
 atgagaacct cgagagggaa ccctactggc cggaggcgaa gctccgcac tccattaccg 180  
 gagccggtgg gttcattgcc tcgcacattg caaggcgact gaagggagag gggcattaca 240  
 tcattgcttc tgactggaag aaaaacgagc acatgaccga ggacatgttt tgtcacgagt 300  
 tccatctcgt tgatctcagg gtgatggaca actgcttgaa agtcaactacc ggagtcgatc 360  
 atgtgttcaa tcttgctgct gatatgggtg gtatgggatt cattcagtcc aaccactcgg 420  
 tcattatgta taacaacacg atgatcagct tcaacatgct tgaagcagct agggcfaatg 480  
 gtgttaagag gttcttttat gcttctagcg cttgtattta tcctgaattt aagcagttgg 540  
 aactaatgt gagcttgaag gagtctgatg cttggccgc tgagcctcaa gatgcttatg 600  
 gtttagagaa gcttgaacc gaggaattat gcaagcacta caccaaggat tttggcattg 660  
 aatgtaggat tggaggttt cataacattt atggacctt tggaaacatgg aaaggtggaa 720  
 gggagaaagc ccctgctgca ttctgcagaa agacccttac ctccactgat aggtttgaga 780  
 tgtggggaga cggctctgcaa acccgatctt tcaccttcat tgatgaatgt gtcgaagggtg 840  
 tcctaagatt gacaaaatca gacttcagag aaccagtga tataggaagc gatgagatgg 900  
 tcagcatgaa tgagatggc gagatcgttc tcagcttca ggacaagaag ctgcccattc 960  
 atcacattcc tggcccagag ggggtccgtg gtcgaaactc ggacaacacc ctgattaagg 1020  
 agaagcttgg gtgggccccca actatgaaac tgaaggatgg gctgagattc acatacttct 1080  
 ggatcaagga gcaacttgag aaagagaagg ctcagggcat cgatctgtca acttatggat 1140  
 cgtcaaaagt tgtgggaacg caagccccgg ttcagttggg ctctcttctg gctgctgatg 1200  
 gcaaagaatg aagcagataa gaatctgtcc agtgaatcg agggcaagg ttaatttatg 1260  
 attgttttag tgggatttat gcatatgggt tgtctttaa ttgcaatctg ctgtttcttt 1320

ctgccataat tattattgta cgtcgaaaga caccctgctc ttggatttcg tatcttaaaa 1380  
 aaaaaaaaaa 1388

<210> 40  
 <211> 1592  
 <212> ADN  
 <213> Malus x domesticus

<400> 40  
 atcatctatc ccctcgaacc caacttttgt ctatcatttt cttcttccca actcctcaaa 60  
 atcttcaaag ctccaaactt ttgctctttt cagaatggga agtacaggcg aaattaagta 120  
 tgggtcgtat acctatgaga acctcgagag ggagccttat tggccttctg aaaagctccg 180  
 aatttccatt accggggcag gtggttttat cgcctccac attgcccgga gattgaagaa 240  
 tgagggtcat tacattattg cttccgattg gaagaagaat gagcacatga ctgaagacat 300  
 gttctgccat gaattccatc ttgccgacct cagggtcatg gataattgct tgaaggttac 360  
 aaagaatggt gaccatgtgt tcaacctcgc agctgatatg ggcggaatgg gcttcattca 420  
 gtccaacat tctgtcatat ttataaaca taccatgatt agtttcaaca tggtcgaagc 480  
 tgctaggatc aatgacgtga agaggttttt ctatgcttct agtgcttgta tttaccctga 540  
 gtttaagcag ctggaaacca atgtcagctt gaaggagtct gatgcctggc ctgcagagcc 600  
 tcaagatgct tatggcctgg agaagcttgc aactgaggaa ttgtgcaagc actacaccaa 660  
 agactttgga atcgagtgcc gtattggaag gttccacaac atttatggcc cttttggaac 720  
 ctggaaaggt ggaagggaga aggctcctgc tgcgttttgc agaaagactc tcaactgccac 780  
 tgataagttt gagatgtggg gagatggact tcagaccga tccttcacct ttattgatga 840  
 atgtgtagaa ggtgtacttc ggttgacgaa gtcagacttc cgtgagccag tgaatattgg 900  
 aagtgatgag atggttagca tgaatgagat ggctgagatc gttcttagct ttgaggacaa 960  
 gaagctgccc atccagcaca ttcttgggcc agaggggtgtc cgtggtcgta actcagacaa 1020  
 cacactgatc aaagagaaac ttggttgggc tcctaccatg aggttgaagg atggtctgag 1080  
 aattacatac ttctggatca agaacagat tgagaaagag aaggcacaag gcgctgacct 1140  
 ctcggtgat ggctcatcta aggttgtggg aaccaagcc ccagttcaac ttggttcgct 1200  
 gcgtgctgct gatggcaaag aatgaaggtt ccgacaaaac tgcaccagaa aatatgatat 1260  
 ccagtagttc tggttatgat agcgcggcac attctatgtg cgtgaacaat aaggcgggaa 1320  
 gcttttgctc cgctcccgtt gtatatctag cttgttagtt aaatctgcca ccttaggatt 1380  
 gcctttgat tttgtttccc tacccttagc attattcagt ttatgagttc agttgatcgt 1440  
 ttataagatt ttttttcggg ttcaaatttc aatatcgacc tgtcccgaat gttgagaccg 1500  
 gctgtattca accggcgggc aatcggagat gtgctcgtct gagttatgct gttttatgct 1560  
 tgcaaaaatt gatctttggt aaaaaaaaaa aa 1592

<210> 41  
 <211> 1611

<212> ADN  
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 41  
 aataccaata ggagttggaa aactaaaaca acgagtggtg ttgctctctc catcttcctc 60  
 ttcattctct tctgttctct ctctataaat acaagtttac tcttcctctt cctcaaactc 120  
 ctgactcttc tctgcattat ctcttcgatc tctccaactc tccaaaacct tcctcagaat 180  
 ggaactacc aatggaacag actatggagc atacacatac aaggagctag aaagagagca 240  
 atattggcca tctgagaatc tcaagatata aataacagga gctggagggt tcattgcatc 300  
 tcacattgct cgtcgtttga agcacgaagg tcattacgtg attgcttctg actggaaaaa 360  
 gaatgaacac atgactgaag acatgttctg tgatgagttc catcttgttg atcttagggg 420  
 tatggagaat tgtctcaaag ttactgaagg agttgatcat gtttttaact tagctgctga 480  
 tatgggtggg atgggtttta tccagagtaa tcaactctg attatgtata ataatactat 540  
 gattagtttc aatatgattg aggctgctag gatcaatggg attaagagggt tcttttatgc 600  
 ttcgagtgct tgtatctatc cagagtttaa gcagttggag actactaatg tgagcttgaa 660  
 ggagtcagat gcttggcctg cagagcctca agatgcttat ggtttgaga agcttgctac 720  
 ggaggagttg tgtaagcatt acaacaaaga ttttggatt gagtgctgaa ttggaagggt 780  
 ccataacatt tatggctctt ttggaacatg gaaagggtgga agggagaagg ctccagctgc 840  
 tttctgtagg aaggctcaga ctccactga taggtttgag atgtggggag atgggcttca 900  
 gacccgttct tttacctta tcgatgagtg tgttgaagggt gtactcaggt tgacaaaatc 960  
 agatttccgt gagccggtga acatcggaag cgatgagatg gtgagcatga atgagatggc 1020  
 tgagatgggt ctgagcttg aggaaaagaa gcttccaatt caccacattc ctggcccgga 1080  
 aggtgttcgt ggtcgttaact cagacaacaa tctgatcaaa gaaaagcttg gttgggctcc 1140  
 taatatgaga ttgaaggagg ggcttagaat aacctcttc tggataaagg aacagatcga 1200  
 gaaagagaaa gcaaagggaa gcgatgtgtc gctttacggg tcatcaaagg tggttggaac 1260  
 tcaagcaccg gttcagctag gctcactccg cgcggtgat ggaagagat gaagttcacc 1320  
 aaagtataag tcaagctcaa atatggcctt ttaagttcag caaatgttt agatatattt 1380  
 ttaggtagct tcctattaaa aaagcaataa taagtgtttt ggattttggt tccttctatt 1440  
 ctgctaacc ttgtttatgt ttagttagaa aagtttgctt gcattgttaa gtctgttatc 1500  
 atattattgt ggtcctttca ttcacagtat gtatgtttat catcatagtc aagttgatgt 1560  
 cgtggtcctc tcacggacca gtacaagtaa gtggcttggt tttttcttg c 1611

<210> 42  
 <211> 1372  
 <212> ADN  
 <213> *Malpighia glabra*

<400> 42  
 aattatttga aagagatcac agtttcagga tggagagtag cgatggaact gattacggag 60  
 catacacata caaggagctt gagaggggaa cctactggcc ctgagaaaag cttcgaattt 120

ES 2 543 130 T3

cgattactgg tgctggtgga tttattgcct cgacatagc tcgtcgcttg aagagtgaag 180  
gccattatat tattgcttct gattggaaga agaatgagca catgactgaa gatatgttct 240  
gtcatgaatt ccatcttgtt gatctcaggg ttatggataa ttgcttgaag gttactaaag 300  
atgccgacca tgttttcaac cttgctgctg atatgggtgg aatgggtttc atccaatcaa 360  
atcattccgt catcatgtat aacaacacga tgatcagctt taacatgctt gaagcatcca 420  
gaatcagcgg agtcaagagg ttcttttatg cctctagtgc ttgcatctat cctgagttca 480  
agcaattgga aactaatgtg agcttgaagg agtctgatgc ctggccagct gagccgcaag 540  
atgcttacgg cttggagaag ctagctacag aagagttgtg caagcactat accaaagact 600  
tcggaattga atgccgtgtt ggaaggttcc ataacattta tggctctttt ggaacatgga 660  
aaggtggcag ggaaaaggca cctgctgctt tttgagaaa ggcgattacc tctgttgaca 720  
agtttgagat gtggggggat ggactacaaa cccgatcctt cacgtttatt gatgaatgcg 780  
tggaaggagt gcttagattg accaagtctg acttccgca gccagtgaac attggaagtg 840  
atgagatggt tagcatgaat gagatggctg aattgttct cagctttgag gacaagaagc 900  
ttcccatcca ccacattcct ggaccagaag gtgtccgagg tcgtaactcc gacaacactc 960  
taatcaaaga gaagcttggg tgggcaccta caatgaggtt gaaggatgga cttagaatta 1020  
catacttctg gatcaaggaa cagatcgaga aggagaaggc tcaaggaatc gatctcgcag 1080  
tttatggatc atcgaaagtg gtgggaaccc aagcaccggt tcaactgggt tctctccgtg 1140  
ccgcagacgg caaagaatga ggtggttgta agtgcaagca gattagtctt tgttgacgac 1200  
aagaaagccg aggttcattt ttaaataatga gatggctggc atatgttgc gcaataagtg 1260  
gtgttgattg tgttgaattt tcattgaggt tctgtgtgtg ctgtagcaat gttctttatt 1320  
tccttaatga tttgtactat gattgatatg aatgaggagt gaagcttcca tc 1372

<210> 43  
<211> 1212  
<212> ADN  
<213> Oryza sativa

<400> 43  
gatccctctc cgaccgacca agcgcgcct ccaagaatgg ggagctcgga gaagaacgga 60  
actgcttatg gcgagtacac ctatgctgaa ctggagaggg agcagtactg gccgtctgag 120  
aagctgagga tatcgatcac cggagctggt ggtttcattg gatcccacat tgctcgcctg 180  
ctgaagagcg aggggcatta catcatcgcc tccgactgga agaagaatga gcacatgact 240  
gaggacatgt tctgcatga gttccacctt gttgacctta gggctatgga caactgcctc 300  
aaggtcacca acggcgtcga ccatgtgttc aacctgccc ctgatatggg tggatgggg 360  
ttcattcagt ccaaccactc tgtgatcatg tacaacaaca ccatgatcag tttcaacatg 420  
ctcagggctg cacgtatcaa tgggtggaag aggttcttct atgcctcaag tgcatgcatt 480  
taccctgaat tcaagcagct tgaaactaac gttagcctga agaatctga tgcctggcct 540

ES 2 543 130 T3

gctgagcctc aagatgccta tggtttgag aagcttgcaa ctgaggagct ctgcaagcac 600  
 tacaccaagg actttggcat tgagtgccgt gttggccgct tccacaacat atatggcccc 660  
 tttggaacat ggaaagggtg ccgtgagaag gcaccagctg cattctgcag gaaggctcag 720  
 acttccactg acaggtttga gatgtgggt gatggcctcc agacccggtc cttcacattc 780  
 atagatgagt gtgttgaggg tgttctgagg ttgacaaagt cggacttccg tgagccagtg 840  
 aacattggaa gcgatgaaat ggtaagcatg aacgagatgg ctgaaatcat tctcagcttc 900  
 gaggataggg agctgccccat ccaccacatc cctggaccgg aggggtgtccg tggcccgtaac 960  
 tccgacaaca ccctcatcaa ggagaagctt ggctgggcac ccacaatgaa gctcaaggac 1020  
 gggtgaggt tcacctactt ctggatcaag gagcagatag agaaggagaa gacccagggc 1080  
 gtcgacatcg cgggttacgg ctcatccaag gtggtgtcca cccagggccc ggttcagctg 1140  
 ggctccctcc gtgctgccga tggcaaggag taatttcaaa gctgctacac catgaagatc 1200  
 aatcagctcc tc 1212

<210> 44  
 <211> 1053  
 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa*

<400> 44  
 atggcaacta aaactaaact ccgtattttc gtcgctgggtg gtggtggctt cattggtagt 60  
 cacactgcta agcgtctcaa ggaagagggg cacttcgtgc gcgtggctga ctggaagaga 120  
 caacactact ttgaggacag ccaaatatgc gacgagtcc atgacgtgga cttgctgat 180  
 ttgaacaatt gtattaagat gtgcgaaggc atggacgaag tctacgactt tgctgcagat 240  
 atgggcggtg tgggttttat tcaatccaac cactctgtta tcttgtaaa caatattatg 300  
 atcagcttca acatggtgga ggctgctcgt cgctctggtt ctgtcaagcg attcttctac 360  
 agctcctcag cttgcateta ccccgaatac cgtcaattgg aaactgcaa tcccggtttg 420  
 aaggagtctg atgcttgccc cgcgcaacct caagatgcct atggtcttga aaagctcgtt 480  
 accgaagagt tctgcaagta ctacaacaag gactttggca ttgagttccg cattggtcgc 540  
 ttcacaaca tctacggccc ccacggcact tggaaaggtg gtcgagagaa ggccccgct 600  
 gccttttgtc gcaaggccct ggtgtgcggc gatgtgttcg agatgtgggg tgacggcgaa 660  
 cagacgcgct cttctgcta cattgacgac tgcgtggagg gtgtgttgcg attgatgcgc 720  
 agcgatgtgc gcgagccgat caacattggc agcaggagaga tggtagcat gaacgacatg 780  
 gcacacctcg tgctcgactt tgcgggcaag aaggacagca ccaagttgca tcacattccg 840  
 ggacctgaag gtgtgcgcgg tcgtaacagc gacaacacc tcacccgca gaagttgggc 900  
 tgggctccta tcatcaattt gaaggacggc ttgaagcgca cttttgactg gatcaagatc 960  
 cagatcgaga acgagaaggc gcaaggagtc gatgtgtcgc agtacagcca atcacacgtc 1020  
 gtcaatcaga agcccactga cttcactaaa taa 1053

ES 2 543 130 T3

<210> 45  
 <211> 1131  
 <212> ADN  
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 45  
 atggcggccg ccgggtacga attgcgcggg atttacggca cggaggagta ctggccggag 60  
 aagaagctga agatttgctg gacgggcgcg ggaggtttca tcgggtcgca tctcgcgaaa 120  
 cgattgaaag aggagggaca tcacgtcgtg gcgtgcgatt ggaagcgsaa tgaacacatg 180  
 gaagaggcga tgttctcgca tgagttcatt ttggctgatt tgaggctgta cgaaaactgt 240  
 aaaaaggttc tcgaggggtg cgaccactgc ttcaacctcg cggcggacat gggagggatg 300  
 ggattcattc agtccaacca ctccgtcatt ttctacaaca acgtgatgat ttccttcaat 360  
 atgatggaag cgatgcgggt gcagggcgtg acgcgatgct ttacgcgctc gagcgcgtgc 420  
 atctaccggg agggcacgca gttgagcacg gagatgcaag acgggttgaa ggaagcgagc 480  
 gcgtggccgg cgcagccgca agacgcgtat ggtctcgaaa agctcgcgag cgaggaagtg 540  
 tacaagcact accagcaaga ttttggattt cagacgcgca tcggtcgatt ccacaacatt 600  
 tacggtccgt acggcacgct gaagggcggg cgcgaaaagg cgccggcggc gttctgcccgt 660  
 aaggctgca cggtgaaag cgaagtcgaa atgtgggggt acggtaagca aacgcgctct 720  
 ttcacctaca tcgacgattg cgtcgaaggc atcttgcgct tcaccaagag cgacttgcgc 780  
 gagccggtga acatcggttc cgacgaaatg atctccatga acgatatgca agccatgacg 840  
 ttgaagttcg cgggcaagga cttgccaatc aagcatatc cgggtccgga aggtgtgccc 900  
 ggtcgcaact ccaacaacga actcatcaag gaaaagctcg gttgggccc gtctgtcaag 960  
 ctgcgagcgc gcttgaaggt tacgtttgag tggatctcga gcaagattgc cgaagagaag 1020  
 gccaaagggt ttgacaccgc cgccgctttc ggtaaagtcca ccatctgtgg cagcgaagcg 1080  
 ccgaccgaac tcggtcagtt gcgcgctgcg gacggcgagc aaaagctgta a 1131

<210> 46  
 <211> 1521  
 <212> ADN  
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 46  
 ttttctctg catactttta gagaatggga agctctgggt gtattaacta tggttcttac 60  
 acttatgaga atcttgagag ggaaccttac tggccatctg agaaactccg tatttccatt 120  
 actggggctg gaggatttat cgcttctcac attgctcgtc gtttgaagag cgagggccac 180  
 tacataattg cctccgattg gaagaagaat gagcacatga cagaggatat gttctgtcat 240  
 gagtttcate ttgcggtatc tagggttatg gataattgct tgaaggtaac aaaagggtgtt 300  
 gaccatgtct tcaatctcgc tgctgatatg ggtggcatgg gtttcattca gtccaaccac 360  
 tcggttatct tctataacaa cactatgatc agcttcaata tgatggaagc tgctaggatt 420  
 aacagtgtca aaaggttctt ctatgcatct agtgcttga tataccccga gttcaaacaa 480  
 ctgaaacaa atgtcagcct gaaagaagct gatgcttggc ctgcagagcc tcaagatgca 540

ES 2 543 130 T3

tacggcttgg aaaagcttgc cacagaagaa ctgtgcaaac attacaacaa ggattttgga 600  
attgaatgtc gtattggaag gttccataac atctatggac cttttggaac ttggaaggt 660  
ggaagggaaa aagctcctgc cgctttttgt agaaaagcac aaactgcaac ggataagttt 720  
gaaatgtggg gagatggact tcaaacacgt tcattcacct tcattgatga gtgtgttgaa 780  
ggggttctta gattgacaaa atccgacttc cgagagccag tgaacatagg aagtgatgag 840  
atggctcagca tgaatgagat ggctgagatg gttctcagct ttgaggacaa gaagcttgct 900  
gtccaacaca ttccaggccc agaaggcgtc cgtggctgca actcagacaa cacactgata 960  
aaagagaagc ttggttgggc tccaacaatg agattgaagg atggctgag aattacatac 1020  
ttctggatca aggagcagat cgagaaagag aaatctcaag gaggttgatac tgcaacctat 1080  
ggatcttcca aggtgggtggg cacccaagct ccagttgagc tagttccctt cgtgctgctg 1140  
atggcaagga ataagttcat tccttctgtc atcatttcaa ctggaagcca atccctctgc 1200  
tatgacattg ctgcattatg tattatggcg tcgtagaaga tigttaagt tctggtaatt 1260  
gttggtttt cttggtttta gtttgaacat gtcaatgtaa tctattacc cttggctttg 1320  
tgaaggggat gatagttaa tagtatattt atcagtcggt cgagaagatc tcaatgtgag 1380  
aattgaataa ctgccagtgg atcctctctt gttttttta cctagttcag gatccttctg 1440  
ttgatgatca tgtaatcaaa attttaactt tgtaagggtt tatatgtaag atttcattgc 1500  
aaagtaaaaa aaaaaaaaaa a 1521

<210> 47  
<211> 1211  
<212> ADN  
<213> Vitis vinifera

<400> 47  
cccttgagag cttcacatta tcttcttctt ctaaactctg agaatgggaa gtaacgatgg 60  
aaccacttat ggtgctgaca cctatgagga gcttgagagg gaaccatact ggcaatctga 120  
aaagctccgg atttcaatca ctgggtgctgg tggttttatt gcctctcaca ttgctcggcg 180  
tctgaagacc gagggccact acattattgc ttctgactgg aagaagaacg agcacatgac 240  
tgaagatatg ttctgtcatg aatttcgtct tgttgatctc agggatgatg ataactgctt 300  
gaaggtcact acaggagtgt accatgtggt taaccttgct gctgatatgg gtggaatggg 360  
gttcatccag tccaaccatt cagttattat gtacaataac acaatgatca gcttcaacat 420  
gcttgaggct tctaggatca atgggggttaa gaggttcttc tatgcctcta gtgcttgcac 480  
ctaccctgaa ttttaagcagt tggaactaa tgtgagcttg aaggagtctg atgcatggcc 540  
tgagagcct caagatgctt atggattgga gaaacttgct acggaggagt tgtgtaagca 600  
ctatacaaaa gactttggaa ttgaatgtcg tattggaaga ttccataaca tttatggacc 660  
ttttggaaca tggaaaggtg ggagagagaa ggctcctgct gctttttgcc gaaaggctct 720  
cacttcacc gacaagtttg aaatgtgggg agacggactt caaactcggt ctttcacctt 780

ES 2 543 130 T3

cattgatgaa tgtgtagaag gtgtcctcag gctgacaaag tcagacttcc gggagccagt 840  
 gaacattgga agtgatgaga tggttagcat gaatgagatg gccgagattg ttctcagctt 900  
 tgagaacaag aaccttccca tccatcacat tccaggccca gaggggtgtgc gtggtcgtaa 960  
 ctcagacaac aactgatca aagagaagct cggttgggct ccaacaatga aattgaagga 1020  
 tgggctgaga attacatact tctggatcaa ggaacagatt gagaaagaga aagttaaggg 1080  
 cattgatctg tctatttatg ggtcatccaa ggtgggtgggt acccaagccc cggttcagct 1140  
 aggctcactt cgtgctgctg atggcaaaga gtgaagctgt tgaggccaac agctctgcta 1200  
 gcttatgccca t 1211

<210> 48  
 <211> 1880  
 <212> ADN  
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 48  
 ggtatttact ataattatct tcaaccaaga aacccttca acttggaaat tattgagtag 60  
 ctctataaag atagagatct attaccaaaa aaaaacatca aaaaaataaa taaaaagcat 120  
 agcctcttgg cccttatcat ttttgagttt ctccatcttc gagacctta aagttcaagt 180  
 ttttcaagaa tgggaacttc tgttgaacc acttatggag aatacacata tgaaaacctt 240  
 gagagggagc cctactggcc ttcagagaag cttcgggtct ctattacagg tgctggtgga 300  
 tttattgcct cacacattgc gaggcgtctg aagactgagg ggcattacat tattgcttcc 360  
 gactggaaga agaatgagca catgtctgag gacatgtttt gtcattgagtt ccatcttggt 420  
 gatctcaggg tgatggataa ctgtttgaaa gtcacaaaag gagttgatca tgtgttcaat 480  
 ctcgctgctg atatgggagg tatgggcttc attcagtcga accactcggg gatcatgtat 540  
 aacaactacta tgatcagctt taacatgatg gaggcctcaa gaataaatag tgtaagagg 600  
 ttcttttatg catccagtgc ttgcatctac cctgaattta agcaattgga aactaacgtg 660  
 agcttaaagg agtctgatgc ttggcctgca gagcctcaag atgcttatgg cttagaaaag 720  
 ctagcaacag aggagttgtg taagcactac aacaaggact ttggaattga atgtcgcatt 780  
 ggccgtttcc ataacattta tggcccattt ggaacatgga aaggcggacg tgagaaagca 840  
 ccagcagctt tttgtagaaa agccctcact tccactgaca aattcgagat gtggggagat 900  
 ggaaagcaaa ctcgatcttt caccttcatt gatgagtgty ttgaaggtgt cctgaggtta 960  
 acaaaatccg acttcagaga gcctgtgaac atcggaagtg atgagatggt aagcatgaat 1020  
 gagatggcag agatagtcct cagctttgat ggcaagaacc ttccgatcca tcacattcca 1080  
 ggaccagagg gtgtgctggtg tcgaaactct gacaacactc tcatcaagga aaagcttggc 1140  
 tgggctccta atatgaagtt gaaggatggg ttgaggatta cgtatttctg gataaaggaa 1200  
 caaattgaga aagagaaggt gaaggggtgcc gatgtgtcca cttatggatc atccaaagtt 1260  
 gtgggaacac aagctccagt tgaattaggc tccctccgtg ctgccgatgg caaagagtga 1320  
 agtatagatg aagccaagtg attatcattc ggtatgact atggccatct gttagttcca 1380

ES 2 543 130 T3

ccatgttttg	ttcgcgtgga	atgtttactt	attattgata	tatctatata	ttacgcgcta	1440
aagcagtcct	ttttcccca	catccctca	ttgcacctac	caaataatac	tcaagagatg	1500
tggtagtcca	gtaatgcttg	cattttgtga	tttctttttg	ctacctcaat	gcatttggtg	1560
tattctctga	gttttgtatg	agacaatagc	catttgctat	cgatctatca	ttttcttgct	1620
cctcgactct	gtaacattac	actgtctttg	ctgcaatacc	agtgttcaat	gttcaaateg	1680
cgatgacaac	aaaataacta	cattggtaga	gctacctaga	tgttgtaata	gtgggaggta	1740
gtagtaagta	tctgatgaaa	tagttgaggc	gatctaaact	cattcatctc	tactcgtgta	1800
tgcttagaga	tataccgttg	atacattata	tatacgtatc	aatatattac	atatacatat	1860
tgtccaaaaa	aaaaaaaaaa					1880

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir en una célula vegetal o planta con ascorbato aumentado relativo a una planta de control adecuada no incluyendo una planta con una mutación quede como resultado ascorbato disminuido, comprendiendo el método transformación de una célula vegetal o planta con un polinucleótido que codifica que un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de SEC ID N° 1 a 11, o una variante del polipéptido, en el que la variante presenta la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, y en el que la variante comprende al menos uno de:
- 5 a) la secuencia de aminoácidos: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12),
- b) la secuencia de aminoácidos: GYNSLGAFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13) y
- 10 c) una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la célula vegetal o planta se transforma con un polinucleótido que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de SEC ID N° 1 a 11.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula vegetal o planta se transforma también con polinucleótido que codifica una GDP-D-Manosa epimerasa.
- 15 4. Un método para producir una célula vegetal o planta con contenido en ascorbato aumentado, comprendiendo el método la transformación de una célula vegetal o planta con:
- a) un polinucleótido que codifica una GDP-D-Manosa epimerasa que comprende al menos uno de:
- i) la secuencia de aminoácidos : AADMGGMGFIQSNHSVI (SEC ID N° 36),
- 20 ii) la secuencia de aminoácidos: GTWKGGREKAPAAFCK (SEC ID N° 37),
- iii) una secuencia con al menos 70% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de SEC ID N° 25 a 35 y
- iv) la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de SEC ID N° 25 a 35 y
- b) un polinucleótido que codifica una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa que comprende al menos uno de:
- 25 i) la secuencia de aminoácidos: AINVSPIEYGHVLLIP (SEC ID N° 12),
- ii) la secuencia de aminoácidos: GYNSLGAFATINHLHFQAY (SEC ID N° 13),
- iii) una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencias para un polipéptido con la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11 y
- iv) la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 11.
- 30 5. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia con al menos 78% de identidad para la secuencia según una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 7, en el que el polipéptido es una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa.
6. Un polipéptido aislado con la actividad de una GDP-L-Galactosa Guaniltransferasa, que comprende una secuencia con al menos 78% de identidad de secuencias para una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de la SEC ID N° 1 a 7.
- 35 7. Una construcción genética que comprende al menos un polinucleótido según la reivindicación 5.
8. Una célula huésped modificada para comprender al menos un polinucleótido según la reivindicación 5 o la construcción según la reivindicación 7.
9. La célula huésped según la reivindicación 8 modificada genéticamente adicionalmente para expresar una GDP-D-Manosa epimerasa.
- 40 10. La célula huésped según la reivindicación 8 ó 9 que es una célula vegetal.
11. Una planta, progenie o propágulo de la misma, que comprende la célula vegetal según la reivindicación 10.

FIGURA 1

		75	
1			
At4g26850	(1)	-MLKIKRVEPTVVSNSYKQDDGAEDP---VGGGRNCLGACCLNGARLELYACKNDVKS-GEKLVISHAIEPPVAFLL	
At5g55120	(1)	MLEKI KRVPPTVVSNSYKQDDGAEDP---GGGRNCLSKCCNGARLEPEYTCNKLD---K--SVG-ENTESPVTFLL	
319998_KAZD	(1)	-MLKIKRVPPTVVSNSYKQDDGAEDGARSGGGGGRNCLQKCCIQGAKAQLPYAFKRWKEVWGEKGLLAVDDEAPVAFLL	
AT5G18200	(1)	-----NTSESHASDRGG---GDGDSMVENQSPPE---LR	
Mm_74150758	(1)	-MAVPHHLEQETSILLPPDPEDWEK---QGIPDFVYGOEDLVGKEVQWSRDSPSA-----VDT-----V-PLSRE	
		150	
At4g26850	(71)	ESLVLGEVEDRFRGGLFYDYDTACETKVIIGKGYEVAQNEGHLKKRPTFRVDKVIQSEFDG---SKENFTKV	
At5g55120	(65)	ESLVLGEVEDRFRGGLFYDYDTACETKVIIGKGYEVAQNEGHLKKRPTFRVDKVIQSEFDG---NKFNFTKV	
319998_KAZD	(75)	DLLLGEVEDRFRGGLFYDYDTACETKVIIGKGYEVAQNEGHLKKRPTFRVDKVIQSEFDG---SKENFTKV	
AT5G18200	(27)	KDPYTNRVIIFSPARAKPTDFKSKSPONPKPSSCPFCIGEQCAEELFRVDPDHDENWKLRIENLYPALSR	
Mm_74150758	(60)	DSAIRSARQRLLEGLFYRYLEDLQTOILGSGVGEVAQNEGHLKKRPTFRVDKVIQSEFDG---EQFNFNKI	
		225	
At4g26850	(142)	GOEELLFQFEAG---EDAQVQFFPCMPIDPEN-SPSVVAINVSEYSHVLLFPRVLDCLPQRIDHKSLLLAVHM	
At5g55120	(136)	GOEELLFQKASTNDDESEIQELASMPLDADN-SPSVVAINVSEYSHVLLFPRVLDCLPQRIDHKSLLLALQM	
319998_KAZD	(146)	GOEELVFQFEAS---DDNEVQFFPNARVDVEN-SPSVVAINVSEYSHVLLFPRVLDCLPQRIDRESFLLALHM	
AT5G18200	(102)	NLETQSTQPEYG---TSRTIVGFGFHDVIESPVHSIQLSDDPVGIDIDILAYKKR---INQIA	
Mm_74150758	(130)	RPGEVLFMRMORE-----PKGPATPKQEDDVLVINVSLEWHVLLVLPAPAQGLPQRILLPGVLRVGLLEA	
		300	
At4g26850	(213)	AAEAANPYFRLGYNSLGAFTINLIFQAYYLAMPFFLEKAPTAKKITTVVSGVKISELLSYEVKRSLLFEGGSSMQ	
At5g55120	(210)	AAEADNPYFRLGYNSLGAFTINLIFQAYYLAMPFFLEKASLKITTNNGVKISKLLNYPVKGLLVEGGNTIK	
319998_KAZD	(217)	AAEAGNPYFRLGYNSLGAFTINLIFQAYYLAMPFFLEKAPTRKITTNGGVKISDILLNYPVGLVFEGGNSLE	
AT5G18200	(161)	QHDSINYIQVFNQGSAGSMSISQ---MMLVWVPPVSSRLDGT---KDYFEETGKCCLCEAKSKHE	
Mm_74150758	(194)	VLLSLHPGFRVGFNSLGGLSVNLHLHCYILHPLRVEGAPSTPDPKGCILHLIQALPAPGFLFYTSGGPPDLE	
		HIT Triad	
		301	
At4g26850	(288)	ELSDTVSDCCVCLQNNNIPFNILISDCG-----ROIFLMPQYAEKQALGEVSPVLETVQVNPVAVWEISGHMVLK	
At5g55120	(285)	DLADTVSDASVCLQNNNIPFNILISDSG-----KRIFLLPQCYAEKQALGEVSSLELDTQVNPVAVWEMSGHMVLK	
319998_KAZD	(292)	DLNVAVSDSSICLQNNNIPYNVLISDSG-----KCFILLPQCYAEKQALGEVSSDLDPTQVNPVAVWEISGHMVLK	
AT5G18200	(227)	VIDESSHFVSVAPAAATYFEIWTIPKD-----HSSHFHLLDDVKAVDVGGLKMLQKIAKQLNDPPYNYMIHT	
Mm_74150758	(269)	VLIIRVCRADYDLSDRELAHNIIVTRGAPPGPTSSSTSDLSGIRVILWLRKSSFGIKESGAFNVALCELAGHLFVK	

At4g26850	(358)	376	376	450
At5g55120	(355)			
31998_KAZD	(362)			
AT5G18200	(297)			
Mm_74150758	(344)			
		451	464	
At4g26850	(433)			
At5g55120	(427)			
31998_KAZD	(437)			
AT5G18200	(352)			
Mm_74150758	(387)			

RKEDYEGASEDNARLLAEAS SEEREKQVTAALAEALGCSNQEEDELEGTIVHQQSSSGNVNQSNRTHGGPITN  
 RKEDYEGASEEKAWRLLAES SEERFREVTMFFDAIGFSSHEEEEEEELEEQNSMNGGS---FTIVHCPSVKE  
 RKEDYEAASEGNARLLAEVS SEERFEVKAALIFEAISCADDRSGSTAENILEEPDDNPQSRKVANDALNKGSH  
 SP-----LKVTESQPYTHWFLOIVPQLSGVGGFEIGTCYINPMPEDVAKVMREVSLT-----  
 TSQDFSSLTFAAAVALIQDCLPETOAGEVRAAIVALMAQEEL-----

FIGURA 2

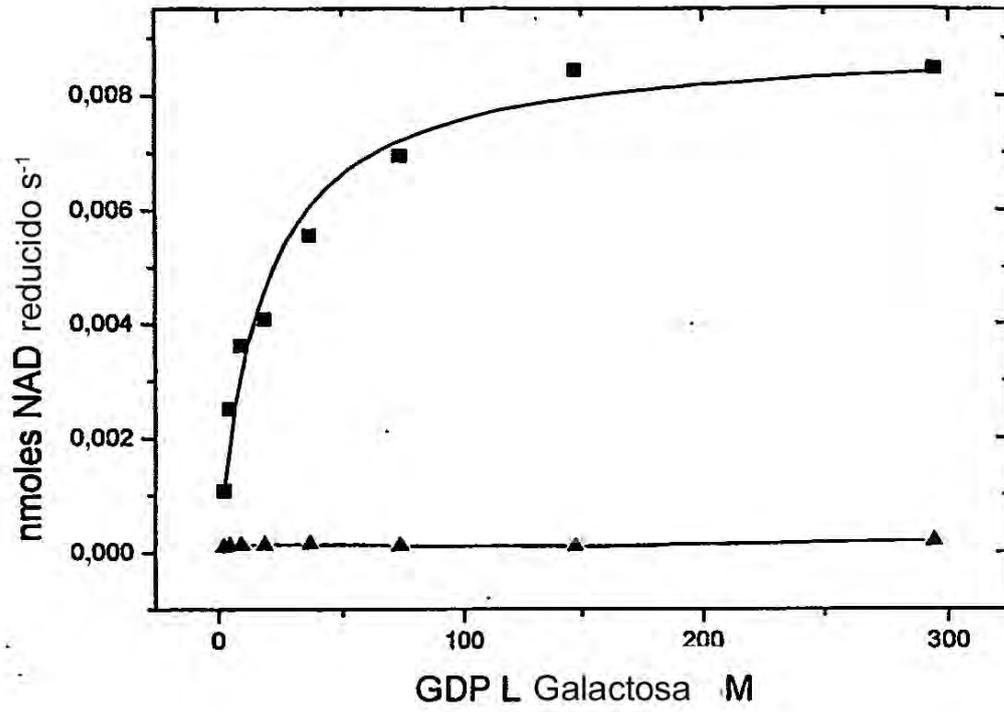
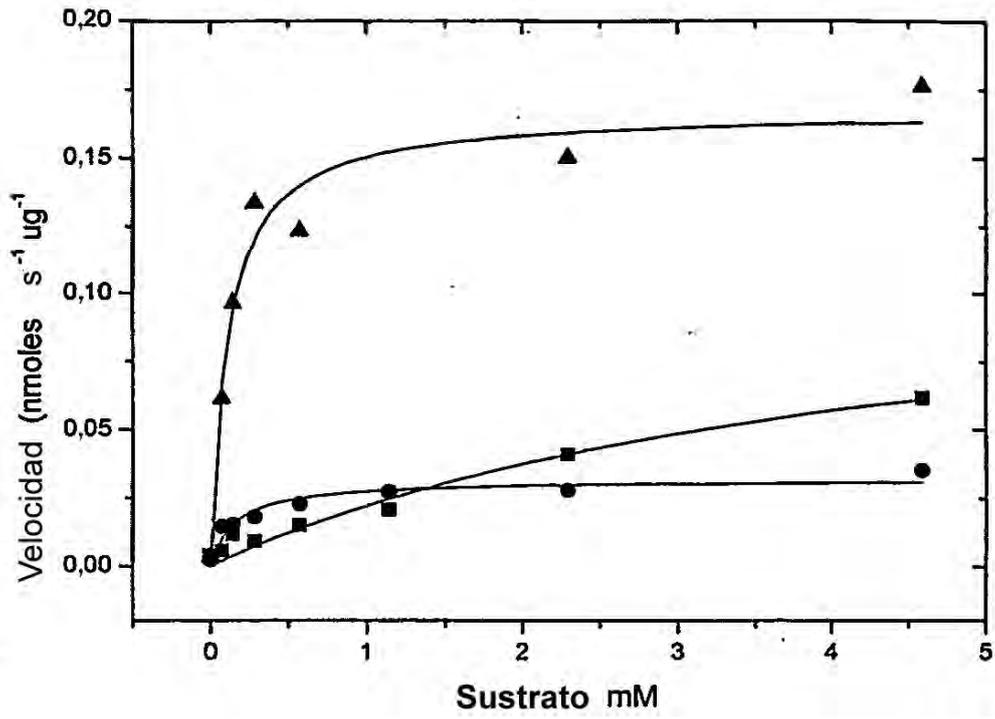


FIGURA 3



**FIGURA 4**

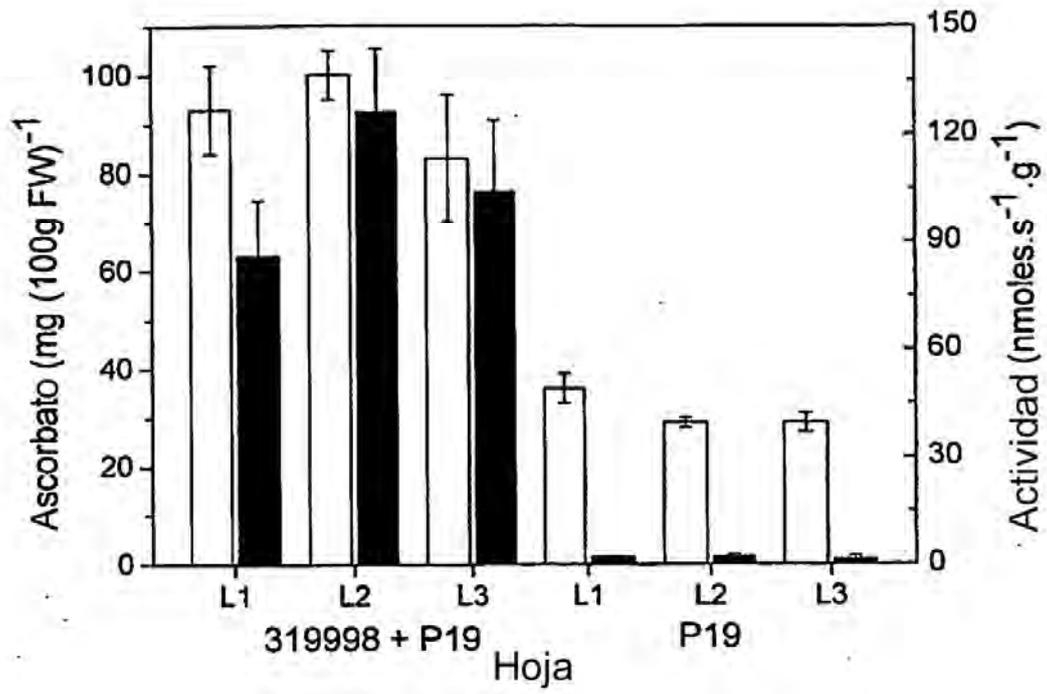


FIGURA 5

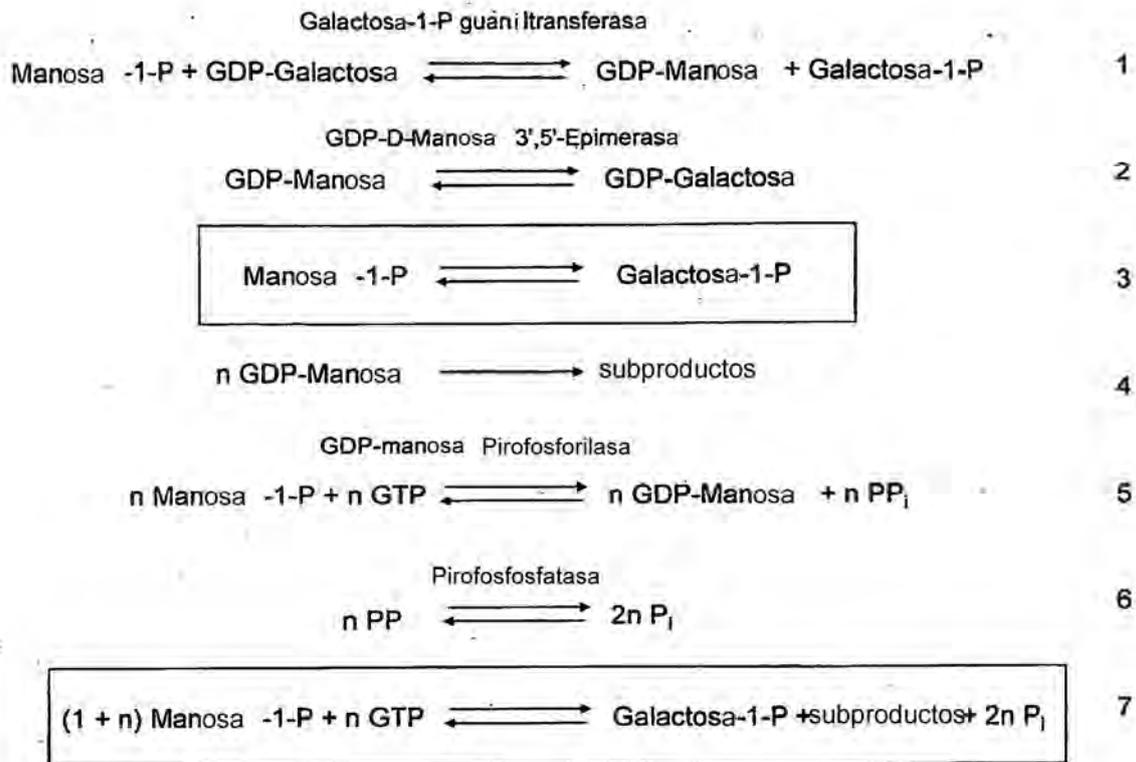


FIGURA 6

75	244893_Ac	(1)	---MLKIKRVPTVVSNFQKDEADGARS	GGGRNCLQKCCIQGAKLPL	YAFKRVNEVVGEKGVIALDNEEAPV
	24547_Ae	(1)	---MLKIKRVPTVVSNFQKDEADGARS	GGGRNCLQKCCIQGAKLPL	YAFKRVKEVVGEKGLLTVGDDEEAPV
	276582_Ae	(1)	---MLKIKRVPTVVSNFQKDEADGARS	GGGRNCLQKCCIQGAKLPL	YAFKRVKEVVGEKGLLAVGDDEEAPV
	319998_Ac	(1)	---MLKIKRVPTVVSNFQKDEADGARS	GGGRNCLQKCCIQGAKLPL	YAFKRVKEVVGEKGLLAVDDDEEAPV
	82552_Md	(1)	---LRLEKRVPTVVSNFQKDEAEVARRV	GGGRNCLQKCCIQGAKLPL	YAFKRVNVDGDTGLIGREKREPPV
	At4g26850	(1)	---MLKIKRVPTVVSNFQKDDGAEEDP	GGGRNCLGACCLNGARLPL	YACKNLVKSGEKL-VISHAEIAPPV
	At5g55120	(1)	---MLLKLKRVPTVVSNFQKDEVTVE	GGGRNCLSKCCINGAKPL	YTCNKLDKSVG-----ENTESEPV
	BT013858_Le	(1)	---MLTVKRVPTVVSNFQEDVLEGN	VMCGGRKCLGKCCMPVSV	PLPYAFKNDNDNEPIENDVQTLPEEECCQV
	315905_Ms	(1)	---MLRIKRVPTVVSNFQKDEAEEGARRV	KCGGRNCLNQCIPGAKLPL	YAFKRVNVDGDTGVPGHDKREPPV
	os12g0190000	(1)	MEMKLTIKRVPTVVSNFQEDAAATAGER	PRAGCGRDCLGDCIPDCKL	PLPYAFKASPKKPS-----SQEDASND
	Contig_St	(1)	---MMLKIKRVPTVVSNFQKDEADELIGARG	AGCGRNCLRNCCIPGSKL	PLPYGFKNLVSYGKS---VAADETKESPV
	Consenso	(1)	MLKIKRVPTVVSNFQKDEABEGAR	GGGRNCLQKCCIQGAKL	PLPYAFKRL GE GVLA E EEARV
					150
	244893_Ac	(72)	AFLDSLGLGEWEDRVRGLFRYDV	TACETKVI	PGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	24547_Ae	(72)	AFLDSLGLGEWEDRVRGLFRYDV	TACQTKVI	PGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	276582_Ae	(72)	AFLDSLGLGEWEDRVRGLFRYDV	TACETKVI	PGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	319998_Ac	(72)	AFLDSLGLGEWEDRVRGLFRYDV	TACETKVI	PGEYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	82552_Md	(71)	AFLDSLGLGEWEDRMQGLFRYDV	TACETKVI	PGQGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	At4g26850	(68)	AFLDSLGLGEWEDRFORGLFRYDV	TACETKVI	PGYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	At5g55120	(62)	TFLESVIGEWEDRFORGLFRYDV	TACETKVI	PGYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	BT013858_Le	(69)	SFLNDLLGLWEERMSQGLFRYDV	TTTCTETKVI	PGRCGFIAQLNEGRHLKRRPTEFCIDKVLQ
	315905_Ms	(72)	AFLDSLGLGEWEDRMQGLFRYDV	TACETKVI	PGYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	os12g0190000	(70)	EFFVNLGLGEWEDRMARGLFRYDV	TACETKVI	PGNLGVAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	Contig_St	(70)	DFLESVIGEWEDRQKGLFRYDV	TACETKVI	PGYGFVAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
	Consenso	(76)	AFLDSLGLGEWEDRMQGLFRYDV	TACETKVI	PGYGFIAQLNEGRHLKRRPTEFRVDKVLQ
					225
	244893_Ac	(147)	QEEVLFQFEAS---NDNEVQFFPNAP	VDVEN-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPSI
	24547_Ae	(147)	QEEVLFQFEAS---VDNEVQFFPNAP	VDVEN-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPRI
	276582_Ae	(147)	QEEVLFQFEAS---IDNEVQFFPNAP	VDVEN-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPRI
	319998_Ac	(147)	QEEVLFQFEAS---DDNEVQFFPNAP	VDVEN-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPRI
	82552_Md	(146)	QEEVLFQFEAS---KQGEVQFFPSAPI	DVES-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPHIL
	At4g26850	(143)	QEEVLFQFEAG---EDAQVQFFPCMP	IDPEN-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPRV
	At5g55120	(137)	QEEVLFQFKASTNDDSEIQFLASMP	LADN-SPSVVA	INVSPVIEYGHVLLIPRV
	BT013858_Le	(144)	QEEVLFQFEAS---TDYKAHYFSG	MRVNSGI-SPSIVA	INVSPVIEYGHVLLIPRV
	315905_Ms	(147)	QEEVLFQFEAS---EDGEVHF	FPSAPI	DVEN-SPSVVA

osl2g0190000 (145) QEEVLQFQFENG---GGDSSFFVESSPISVADRANVAINVSPIEYGHVLLIPRVLDRLPQRIDQESFLIALHMA  
 Contig\_St (145) QEEVLQFQFEAS---EHEVQVLYENAPIDPEK-SPSVAINVSPIEYGHVLLIPKVECLPQRIDRDSFLIALHMA  
 Consenso (151) QEEVLQFQFEAS D EVQFFP APIDVEN SPSVAINVSPIEYGHVLLIPRILECLPQRIDRESFLLALHMA  
 300

244893\_AC (218) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 24547\_Ae (218) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 276582\_Ae (218) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 319998\_AC (218) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 82552\_Md (217) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 At4g26850 (214) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 At5g55120 (211) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 BT013858\_Le (215) REVADEPFRVGYNSLGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 315905\_Ms (218) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 osl2g0190000 (217) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 Contig\_St (216) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN---GGVKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 Consenso (226) AEAGNPYFRLGYNLSGAFATINHLHFQAYYLAVPFPPIEKAPTRKITTIN GGKISELLNYPVRGLVFEFEGG  
 301

244893\_AC (289) --TLEDLSNAVSDSSICLQGNIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSSSELLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 24547\_Ae (289) --SLEDLSNAVSDSSICLQGNIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSSSELLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 276582\_Ae (289) --SLEDLSNAVSDSSICLQGNIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSSSELLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 319998\_AC (289) --SLEDLSNAVSDSSICLQGNIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSSSELLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 82552\_Md (288) --TLDLSNTVSDACICLQENIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVRAEILDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 At4g26850 (285) --SMQELSDTVSDCCVCLQNNIPENILISDCGRQIFLMPQCYAEKQALGEVSPVLETOVNPVAVWEISGHMVLK  
 At5g55120 (282) --TIKDLADTVSDAVCLQNNIPENILISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSTILLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 BT013858\_Le (290) GSTARDLSDAVNSCISLQNKIPENILIAQCGKIFLIPQCYAEKQALGVVDQELLDTOVNPVAVWEISGHMVLK  
 315905\_Ms (289) --TLEDLSYTVSDACICLQENIPYNVLISDCGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSAEVLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 osl2g0190000 (292) --SLSDLANVSSACIWLQDNNIPYNVLISDCGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSOELLDTOVNPVAVWEISGHMVLK  
 Contig\_St (287) --TLEDLANVSDSICLQENIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSAEVLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 Consenso (301) TLEDLSN VSDSICLQ NNIPYNVLISDSGKRIFFLLPQCYAEKQALGEVSSSELLDTQVNPVAVWEISGHMVLK  
 376

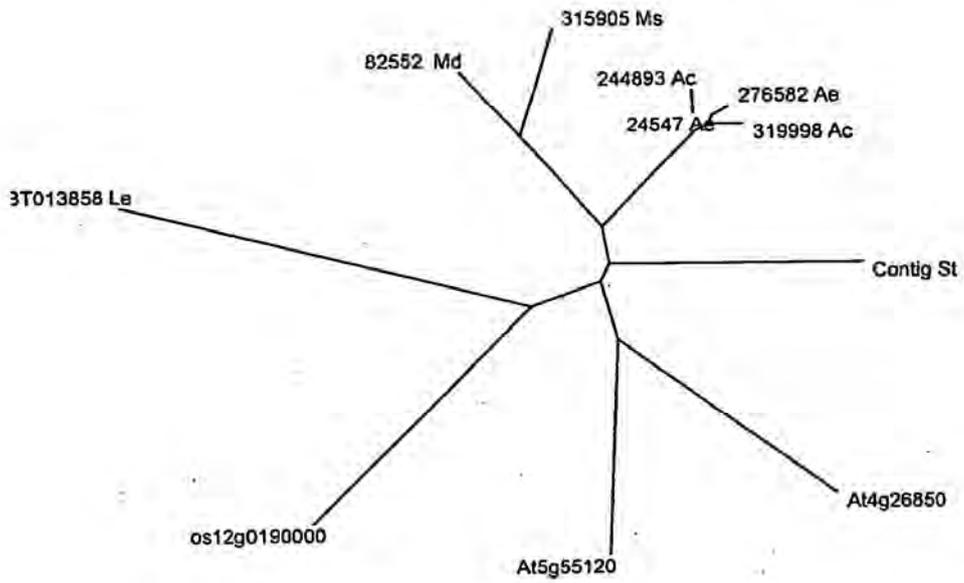
244893\_AC (362) RKEDYEAASEGNARWLLAEVLSGERFEEVKALIFEAI\$CADDRSSSTAENLLEEPDNP-QSREANDALNKGS  
 24547\_Ae (362) RKEDYQEA\$EGNARWLLAEVLSSEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLE-----  
 276582\_Ae (362) RKEDYQEAASEGNARWLLAEVLSSEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLEEPDNP-QSREVANDALSKAS  
 319998\_AC (362) RKEDYEAASEGNARWLLAEVLSSEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLEEPDNP-QSRKVANDALNKGS  
 82552\_Md (361) RKEDYEAASEGNARWLLAEVLSSEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLEEPDNP-QSRKVANDALNKGS  
 At4g26850 (358) RKEDYEGASEDNARWLLAEVLSSEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLEEPDNP-QSRKVANDALNKGS  
 At5g55120 (355) RKEDYEGASEEKARWLLAEVLSSEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLEEPDNP-QSRKVANDALNKGS  
 BT013858\_Le (365) RTKDYNDASEEYAWKLLSEVSI\$SEERFEEVKALIFEAI\$CADDRSGSTAENLLEEPDNP-QSRKVANDALNKGS

315905_Ms	(362)	RKKDYDEASDENAWKLLAEVSLSEERFQEVNALIIFERJASGNNGN----ENLPEDPEVKP-RSHEEVDATINKSS
os12g0190000	(365)	RRSDYEEASEASEAWRLLAEVSLSEERFEEVKAYIFDAAGLVQSDEEEVSEDEDATYTPVSIAPPVAEGCLVLQ-
Contig_St	(360)	RKEDYEGATEANAWRLLAEVSLSEARFQEVTLIFEAISSLVTEENENANDGSPEDLDVTPPQPMEEID---GSHT
Consenso	(376)	RKEDYEEASEGNWRLLAEVSLSEERFEEVKALIFEAIS A D ENLLEE D P S L.
	451	465
244893_Ac	(436)	HCGMVPGKQECVLVQH
24547_Ae	(416)	-----
276582_Ae	(436)	HRGMVPGKQECVLVQH
319998_Ac	(436)	HRGMVPGKQECVLVQH
82552_Md	(430)	HCSAVNEQICRVETM
At4g26850	(431)	TNGTAAECLVLQ----
At5g55120	(425)	KEEAVSN-----
BT013858_Le	(439)	-----
315905_Ms	(432)	RAAMVGETQECIVLQ
os12g0190000	(439)	-----
Contig_St	(432)	HSTMVPA-----
Consenso	(451)	V

FIGURA 7

244893_Ac	24547_Ae	276582_Ae	315905_Ms	319998_Ac	82552_Md	A14g26850	A15g55120	BT013858_Le	Contig_St	os12g0190000
	96	96 99	79 82 78	96 98 97 78	80 84 80 89 79	70 75 70 69 70 70	74 77 74 71 74 73 76	63 66 64 63 63 62 59 62	78 79 77 74 76 75 72 72 62	67 70 68 67 68 68 65 65 64 67
244893_Ac	24547_Ae	276582_Ae	315905_Ms	319998_Ac	82552_Md	A14g26850	A15g55120	BT013858_Le	Contig_St	os12g0190000
	96	96 99	79 82 78	96 98 97 78	80 84 80 89 79	70 75 70 69 70 70	74 77 74 71 74 73 76	63 66 64 63 63 62 59 62	78 79 77 74 76 75 72 72 62	67 70 68 67 68 68 65 65 64 67

FIGURA 8



0.1





82552_AARA_NNT	(336)	GAATGAGGGTGGCCATCTTAAGAAGCGGCCAACAGAGTTTCGAGTTGATAAAGGTCCTCCAGCCCTTTTGAT	1237
244893_KAIA	(966)	GGGAGCRAAATCAACTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGGTTCTGTTCCAGTTTGAAGCAAG-----	1168
24547_KUFA	(1058)	GAGAGCRAAATCAACTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGGTTGCTGTTCCAGTTTGAAGCAAG-----	
276582_KAJB_Ae	(705)	GAGAGCRAAATCAACTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGGTTGCTGTTCCAGTTTGAAGCAAG-----	
315905_ABOC	(812)	AGCAGCAAGTTAACTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGGTTCTATTCCGGTTTGAAGCCAG-----	
319998_KAZD	(630)	GAGAGCRAAATCAATTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGGTTGCTGTTCCAGTTTGAAGCAAG-----	
At4g26850	(901)	GGCAGCAAAATCAACTTCACTAAAGTTGGCAAGAGAGTTGCTCTTCCAGTTTGAAGCTGG-----	
At5g55120	(799)	GGAAACAATCAATTTCACTAAAGTTGGTCAAGAAGAGTTGCTTTTCCAGTTTAAAGCTAGCAGCTAATG	
BT013858_tomato	(823)	GAGACAAATCAACTTTACCAAAGTTGGCCAGGAAGAGTGTCTTTTCAGGTTTGAACCAAG-----	
NM_001072870_Os	(836)	GCTGCCAAGTTCAACTTCACTAAAGTTGGCCAGGAGGTTGCTCTTCCAAATTCAGAAATGG-----	
Patata VTC2 contig de ESTs	(458)	GGAGCAAGTTCAACTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGTTGCTCTTCCAGTTTGAAGCAAG-----	
82552_AARA_NNT	(406)	GGCAGCAAGTTTAACTTCACTAAAGTTGGACAGGAAGAGGTTCTGTTCCAGTTTGAAGCCAG-----	1307
244893_KAIA	(1028)	-CAACGCAACGAAGTCCAGTTCTTCCAAATGCACCTGT---TGATGTTGAGAATTCCTCCAGTGTGTGT	
24547_KUFA	(1120)	-CGTCGACAAATGAAGTCCAGTTTTCCTCCAAATGCACCTGT---TGATGTTGAGAATTCCTCCAGTGTGTGT	
276582_KAJB_Ae	(767)	-CATCGCAATGAAGTCCAGTTTTCCTCCAAATGCACCTGT---TGATGTTGAGAATTCCTCCAGTGTGTGT	
315905_ABOC	(874)	-TGAAGATGGTGAAGTCCAGTTTTCCTCCAGTGCACCCAT---TGATGTTGAGAATTCCTCCAGTGTGTGT	
319998_KAZD	(692)	-CGACGCAATGAAGTCCAGTTCTTCCAAATGCACCCGGT---TGATGTTGAGAATTCCTCCAGTGTGTGT	
At4g26850	(963)	-TGAAGTGCCTCAAGTCCAGTTCTTCCCTTGCATGCCAT---TGACCTGAGAATTCCTCCAGTGTGTGT	
At5g55120	(869)	ATGATGATAGTGAATTCAGTTCTTGGGAGTATGCCCTCT---AGACGCTGATAATTCCTTAGCGTCTGT	
BT013858_tomato	(885)	-TACCGACTACAAAGGCCATTAATTTCCGGCATGGAGT---AAACAGTGGTATTCACCTAGTATTTGT	
NM_001072870_Os	(898)	-TGGTGGTATGACAGCTTCTTTGTGGAGACTCCCAATCAGTGTGTGTCGTCCTCCCTAAATGTTGT	
Patata VTC2 contig de ESTs	(520)	-TGAGGACATGAAGTCCAGTCTATCCAAATGCACCAAT---TGATCCTGAGAATTCCTCCAGTGTGCAT	
82552_AARA_NNT	(468)	-CAAAGATGGTGAAGTTCAGTTTTCCTCCAGCCACCCAT---TGATGTTGAGAATTCCTCCAGGCGTGTGT	1377
244893_KAIA	(1094)	GGCCATCAATGTTAGTCTTATTTGAATATGTCACGTACTTCTCATCCCTTCGATTCCTTGAATGCCTGCCCT	
24547_KUFA	(1186)	GGCCATCAATGTTAGTCTTATTTGAATATGTCATGTACTTCTGATCCCTCGGATTCCTTGAATGCCTGCCCT	
276582_KAJB_Ae	(833)	GGCCATCAATGTTAGTCTTATTTGAATATGTCATGTACTTCTGATCCCTCGGATTCCTTGAATGCCTGCCCT	
315905_ABOC	(940)	TGCCATTAATGTCAGTCTTATTTGAATATGTCATGTACTTCTGATCCCTCGGATTCCTTGAATGCCTGCCA	
319998_KAZD	(758)	GGCCATCAATGTTAGTCTTATTTGAATATGTCATGTACTTCTGATCCCTCGGATTCCTTGAATGCCTGCCCT	
At4g26850	(1029)	TGCCATCAATGTTAGTCTCGGATTTGAGTATGGCCATGTGTGCTGATTTCCCTCGTGTCTTGAATGCCTGCCCT	
At5g55120	(936)	TGCAATCAATGTTAGTCTCGGATTTGAGTATGGCCATGTGTGCTGATTTCCCTCGTGTCTTGAATGCCTGCCCT	
BT013858_tomato	(951)	TGCTATCAATGTTAGTCTCGGATTTGAGTATGGCCATGTGTGCTGATTTGATACCTCGGATTCCTTGAATGCCTGCCCT	
NM_001072870_Os	(967)	TGCAATCAATGTTAGTCTCGGATTTGAGTATGGCCATGTGTGCTGATTTCCCTCGTGTCTTGAATGCCTGCCCT	
Patata VTC2 contig de ESTs	(586)	TGCCATCAATGTTAGTCTCGGATTTGAGTATGGCCATGTGTGCTGATTTGATACCTCGGATTCCTTGAATGCCTGCCCT	

82552_AARA_NNT	(534)	GGCCATTAATGTCAGTCCAAATTGAATAAGGCCCATGTGCTGTTGATTCTCCACATTTCTTGAGCGAATGCCT	1447
244893_KAIA	(1164)	CAAAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	1378
24547_KUFA	(1256)	CAGAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
276582_KAJB_Ae	(903)	CAGAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
315905_ABOC	(1010)	CAAAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
319998_KAZD	(828)	CAGAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
At4g26850	(1099)	CAAAGGATCGATCACAAAAGCCCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
At5g55120	(1006)	CAAAGGATTGATCACAAAAGCCCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
BT013858_tomato	(1021)	CAGAGAAATTGATCGTGATAGTTTGGCAATTGCTTCCATTTTGGCAGAGAAAGTGGCAGATCCCTTCTTTA	
NM_001072870_Os	(1037)	CAGAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
Patata VTC2 contig de ESTs	(656)	CAGAGGATCGAAGGGACAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	
82552_AARA_NNT	(604)	CAAAGGATTGACAGGGAGAGCTTCTTGCTTGCCTTACATGGCAGCAGAAAGCTGGAAACCCCGTACTTCC	1448
244893_KAIA	(1234)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGCCACTATCAATCACCTTCATTTCCAGGCTTATTACTTAGC	1517
24547_KUFA	(1326)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGCCACTATCAATCACCTTCATTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
276582_KAJB_Ae	(973)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGCCACTATCAATCACCTTCATTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
315905_ABOC	(1080)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGCCACTATCAATCACCTTCATTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
319998_KAZD	(898)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGCCACTATCAATCACCTTCATTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
At4g26850	(1169)	GACTCGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGCCACTATCAATCACCTTCATTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
At5g55120	(1076)	GACTTGGATACAACAGCTTAGGGCTTTCGTAACCAATTAACCAATCTCACCTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
BT013858_tomato	(1091)	GGGTAGGTTATAACAGTTTGGGGCTTTTGGTACCAATTAACCACTTCCACTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
NM_001072870_Os	(1107)	GGCTTGGCTATAATAGTTTGGGTGCATTTGGCCACTTTCGTAACCAATTAACCACTTCCACTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
Patata VTC2 contig de ESTs	(726)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGGCCACTTTCGTAACCAATTAACCACTTCCACTTCCAGGCTTATTACTTAGC	
82552_AARA_NNT	(674)	GATTGGGTTACAACAGCTTGGGTGCATTTGGCCACTTTCGTAACCAATTAACCACTTCCACTTCCAGGCTTATTACTTAGC	1518
244893_KAIA	(1304)	CGTGCCCTTCCCTATCGAGAAGGCTCCCACTAGGAAGATAACT	
24547_KUFA	(1396)	TGTGCCCTTCCCTATAGAGAAGGCTCCCACTAGGAAGATAACT	
276582_KAJB_Ae	(1043)	TGTGCCCTTCCCTATCGAGAAGGCTCCCACTAGGAAGATAACT	
315905_ABOC	(1150)	CGTGACCCTTCCCTATGAGAAGGCTCCCACTAGGAAGATAACT	
319998_KAZD	(968)	TGTGCCCTTCCCTATCGAGAAGGCTCCCACTAGGAAGATAACT	
At4g26850	(1239)	CATGCCCTTCCCACTGGAGAAAGCTCCCACTAGGAAGATAACT	
At5g55120	(1146)	AATGCATTTCCCGATAGAGAAGCTTCTTCCCTGAAAGATAACT	
BT013858_tomato	(1161)	AGTGCCATTTCCAGTTGAGAAAGCAACCAATACAGAAATACTGGCAAGGAGGGCTGGGTGGTGGCTGGA	
NM_001072870_Os	(1177)	AGTGCCATTTCCCTGTTGAGAAGGCACTCCCACTAGGAAGATAACT	
Patata VTC2 contig de ESTs	(796)	TGTGCATTTCCCACTTGGAGAAGGCTCCCACTAGGAAGATAACT	

	82552_AARA_NNT	(744)	CGTGACCTTCCCATTTGAGAAAGGCTCCTACCAAAAAAATAATCC-----ACTTTGAAATGCCGGAG 1588
	244893_KAIA	(1362)	GTGAAAATCTCTGAGCTGCTAAATATATCCAGTCAGGGGGCTTGTTTTCCGAGGGTGGAAAAT-----ACTC
	24547_KUFA	(1454)	GTGAAAATCTCTGAGCTGCTAAATATATCCAGTCAGAGGGCTTGTTTTCCGAGGGTGGAAAAT-----TCCTC
5	276582_KAJB_Ae	(1101)	GTGAAAATCTCTGAGCTGCTAAATATATCCAGTCAGAGGGCTTGTTTTCCGAGGGTGGAAAAT-----TCCTC
	315905_ABOC	(1208)	GTGAAGGTCTCTGAGCTCTGAACTATCCAGTCAGAGGGCTTGTTTTCCGAGGGTGGAAAAT-----ACTC
	319998_KAZD	(1026)	GTGAAAATCTCTGAGCTGCTAAATATATCCAGTCAGAGGGCTTGTTTTCCGAGGGTGGAAAAT-----TCCTC
	At4g26850	(1297)	GTCAAAAATCTCAGAGCTTCTAAGTACCCCTGTGAGAAAGTCTTCTCTTTGAAGGTGGAAAGC-----TCFA
	At5g55120	(1204)	GTCAAAAATCTCTAAGTACCCCTGTGAGAAAGTCTTCTCTTTGAAGGTGGAAAGC-----ACCA
10	BT013858_tomato	(1231)	GTGATTTGATCTAAGTTATTAATTAACCCCTGACGAGGTTTGGTTTTGAGGGGAGAAAATGGAAGTACTG
	NM_001072870_Os	(1247)	GTAAAGGTGTCCAAGCTGATGAACCTGACGAGGTTTGGTTTTGAGGGGAGAAAATGGAAGTACTG
	Palata VTC2 contig de ESTs	(854)	GTGAAGATATCGGAGATGCTTAATTAACCCAGTTCGAGGTTCTCGTCTTTGAGGGTGGAAAAT-----ACTT
	82552_AARA_NNT	(802)	GTGAAGGTCTCTGAGCTTCTGAATATATCCAGTCAGAGGGCTTGTTTTCCGAGGGTGGAAAAT-----ACTC 1658
15	244893_KAIA	(1426)	TGGAAGATTTGTCCAATGCCGCTCTGATTCAGATTCAGCATTTGSCCTTCAAGSCAACACATACCTTACAATGT
	24547_KUFA	(1518)	TGGAAGATTTGTCCAATGCCGCTCTGATTCAGATTCAGCATTTGSCCTTCAATGCAACACATACCTTACAATGT
	276582_KAJB_Ae	(1165)	TGGAAGATTTGTCCAATGCCGCTCTGATTCAGATTCAGCATTTGSCCTTCAATGCAACACATACCTTACAATGT
	315905_ABOC	(1272)	TGGAAGATTTGTCTTACACCCGCTCTGATTCAGATTCAGCATTTGSCCTTCAAGAAAACAAACGTCACCGTACAATGT
	319998_KAZD	(1090)	TGGAAGATTTGTCCAATGCCGCTCTGATTCAGATTCAGCATTTGSCCTTCAAGSCAACACATACCTTACAATGT
	At4g26850	(1361)	TGCAAGAATCTATCTGATACTGTTTCAGACTGCTGTTTGGCTTCAAAACAACACATTCCTTTCAACAT
	At5g55120	(1268)	TTAAAGATCTCGCAGATACTGATAGAGCGCATCCGTTTGTCTTCAGAAACAACACATTCCTTTCAACAT
20	BT013858_tomato	(1301)	CCCGTGAATTTGTCTGATGCTGTTGGAATCTCTGCAATTTCCCTTCAGAAATAAAAACATCCCTTTCAACAT
	NM_001072870_Os	(1311)	TGAGCGATCTGGCCATGTGGTTTCCAGCGCTGTATCTGGCTGCAGGACAAACAATGTGCCTTACAATGT
	Palata VTC2 contig de ESTs	(918)	TGGAGGATTTGGCCAAATGTCGTCACAGATTTGCAATTTGCTCGAAGGAAACAACATCCCTTACAATGT
25	82552_AARA_NNT	(866)	TGCAAGATTTGTCAAAACACCCGCTCTCTGATGCTGCATATGSCCTTCAAGGAAACAACATACCTTACAATGT 1728
	244893_KAIA	(1496)	GCATTATCTCCGATTTCTGGAAAAGCGTATCTTTCTTTTACCACAGTGTACGCTGAGAAAACAGGCTCTTTGGA
	24547_KUFA	(1588)	GCATTATCTCCGATTTCTGGAAAAGCGTATCTTTCTTTTACCACAGTGTATGCTGAGAAAACAAGCTCTTTGGA
	276582_KAJB_Ae	(1235)	GCATTATCTCCGATTTCTGGAAAAGCGTATCTTTCTTTTACCACAGTGTATGCTGAGAAAACAAGCTCTTTGGA
	315905_ABOC	(1342)	CCATTATCTGATTTGTGGAAAAGCGTATCTTTCTTTTACCACAGTGTATGCTGAGAAAACAAGCTCTTTGGA
	319998_KAZD	(1160)	GCATTATCTCCGATTTCTGGAAAAGTGTATCTTTCTTTTACCAGTGTCTACCGTACGCTGAGAAAACAAGCTCTTTGGA
	At4g26850	(1431)	TCTCATCTCTGATTTGTGGAAAGCGTATCTTTTAAATGCCACAGTGTTCAGGACAAACAAGGCTCTAGGT
	At5g55120	(1338)	TCTCATCTCTGACTCTGGCAAACGAAATCTTCTTCTTCTCCCTCAGTGTTCAGGACAAACAAGGCTTTAGGA
	BT013858_tomato	(1371)	TCTCATTTGCTCAGTGTGGAAAAGAAATTTTCTGCTTCCCAGTGTTCAGGACAAACAAGGCTCTAGGA
	NM_001072870_Os	(1381)	TCTTATCTCTGACTCTGGCAAACGAAATCTTCTTCTTCTCCCTCAGTGTTCAGGACAAACAAGGCTCTAGGA
35	Palata VTC2 contig de ESTs	(988)	CCTAATCTCCGATTTCAAGAAAAGGAAATTAATTCATTTCTCCACAGTGTTCAGGACAAACAAGGCTCTTTGGA 1797

82552_AARA_NNT	(936)	CCTTATCTCTGACTCTGGAAAGGGAATCTTCTCTGCGCCACAGTGTTATGCTGAGAAACAAGCTCTTGGG	1867
244893_KAIA	(1566)	GAAGTGAGTTCTGAGCTTCTGGACACAACAAGTGAACCCGGCAGTGTGGGAAATCAGCGGACATATGGTTT	1798
24547_KUFA	(1658)	GAAGTGAGTTCCGAGCTTCTGGACACAACAAGTGAACCCGGCAGTGTGGGAAATCAGCGGACATATGGTTT	
276582_KAJB_Ae	(1305)	GAAGTGAGTTCCGAGCTTCTGGACACAACAAGTGAACCCGGCAGTGTGGGAAATCAGCGGACATATGGTTT	
315905_ABOC	(1412)	GAAGTGAGTGCABAGGTTCTGGATACACAGGTGAATCCAGCCGGTGTGGGAAATAGTGGGCATATGGTCT	
319998_KAZD	(1230)	GAAGTGAGTTCCGATCTTCTGGACACAACAAGTGAACCCGGCAGTGTGGGAAATCAGCGGACATATGGTTT	
At4g26850	(1501)	GAAGTGAGCCCGGAGGTTATGGAAACAACAAGTGAACCCAGCCGTTGGGAGATAAGTGGTCCACATGGTAC	
At5g55120	(1408)	GAAGTTAGCTCAACGCTATTGGATACGCAAGTGAATCCAGCGGTTTGGGAGATGAGTGGACACATGGTGT	
BT013858_tomato	(1441)	GTTGTAGACCAAGAGCTCCTGGACACTCAGGTGAACCCCTGCTGTATGGGAAATAGTGGACATATAGTGC	
NM_001072870_Os	(1451)	GAAGTGAGCCAGGAGCTACTGGACACAGCAGGTAAACCCAGCTGTGTGGGAGATCAGTGGCCACATCGTGC	
Patata VTC2 contig de ESTs	(1058)	GAGGTACGCTGAACCTCCTCGACACCCCAAGTCAATCCTGCTGTGGGAGATAGTGGACACATGGTCT	
82552_AARA_NNT	(1006)	GAAGTGAGACAGAGATCTGGATACACAGGTGAATCCAGCTGTGTGGGAAATAGTGGGCATATGGTGC	1868
244893_KAIA	(1636)	TGAAGGGAAGGAG-GACTATGAGGAGGCGTCTGAAGGAAATGCTTGGAGGCTCCTTGTGAGGCTCTCCC	1937
24547_KUFA	(1728)	TGAAGGGAAGGAG-GACTATCAGGAGGCGTCTGAAGGAAATGCTTGGAGGCTCCTTGTGAGGCTCTCCC	
276582_KAJB_Ae	(1375)	TGAAGGGAAGGAG-GACTATCAGGAGGCGTCTGAAGGAAATGCTTGGAGGCTCCTTGTGAGGCTCTCCC	
315905_ABOC	(1482)	TGAAGGGAAGGAG-GACTACGACGAGGCTCAGATGAAATGCTTGGAAAGTCTCCTGGCAGAGGTTTCCC	
319998_KAZD	(1300)	TGAAGGGAAGGAG-GACTATGAGGAGGCGTCTGAAGGAAATGCTTGGAGGCTCCTTGTGAGGCTCTCCC	
At4g26850	(1571)	TGAAGGGAAGGAG-GATTACGAAGGTTCTCAGAGGATAACCGGTGGAGGCTCCTTGCAGGAGCTCTC	
At5g55120	(1478)	TGAAGGGAAGGAG-GACTATGAAGGAGGCTCAGAAAGAGGCAAGGCTTACTAGCTGAAGTTTCTT	
BT013858_tomato	(1511)	TTAAGCBAACAAG-GATTACAATGATCAGAGGAAATATGCCATGGAAACTTCTTCTGAGGTTTCCA	
NM_001072870_Os	(1521)	TGAA-ACGAAAGGAGTATACGAGGAGGATCAGAAGCTTCTCGGTGGAGACTCCTCGCTGAGGTTTCCC	
Patata VTC2 contig de ESTs	(1128)	TGAAGGGAAGGAG-GATTATGAGGTTSCAACTGAGGCAATGCATGGAGGCTTCTCGCCGAGGCTCTC	
82552_AARA_NNT	(1076)	TAAAGGGAAGGAG-GACTATGATGAGGCGTCCGATGAAATGCTTGGAAAGTCTCCTGGCAGAGGCTCTCCC	1938
244893_KAIA	(1705)	TTTCGGGGAGAGGTTTGAAGAAGTCAAGGCTATGATCTTTGAAGCCATCTCTTGTGCT-GATGAT-AGA	2007
24547_KUFA	(1797)	TTTCGGGAGAGAGGTTTGAAGAAGTCAAGGCTATGATCTTTGAAGCCATCTCTTGTGCT-GATGAT-AGA	
276582_KAJB_Ae	(1444)	TTTCGGGAGAGAGGTTTGAAGAAGTCAAGGCTATGATCTTTGAAGCCATCTCTTGTGCT-GATGAT-AGA	
315905_ABOC	(1551)	TTTCTGAAGAGAGGTTCCAAAGATGATGATGCTTATTTTCGACGTAATGCTTCCGGT-AATAAT-GGG	
319998_KAZD	(1369)	TTTTCGAGGAGAGGTTTGAAGAAGTCAAGGCTATGATCTTTGAAGCCATCTCTTGTGCT-GATGAT-AGA	
At4g26850	(1640)	TGTCGGAGGAAGGTTTAAAGGAGTACTGCTCTCGCCCTTGAAGCCATAGGTTGATGAT-AACCA--AGA	
At5g55120	(1547)	TATCAGAGGAGATTCAGAGAAGTTRACAOTATGATTTTGTATGCCATCGGTTTATGAT-AGTCA--CGA	
BT013858_tomato	(1580)	TATCAGAGGAGATTTGAAGRAAGTAAAGGCTATATTTCTGAAGCAGCTGATC-T-----ACAAGCAGA	
NM_001072870_Os	(1590)	TGTCGGAGGAGGCTTGGAGGAGTGAAGGCTACATCTTTGATGCGGCTGGTCTGGTTCAGTCCCGACGA	
Patata VTC2 contig de ESTs	(1197)	TCCTCTGAGCAAGGTTCCAAAGATGACTGCTCTCATCTTTTGAAGCTATTAGTCTCAGT-GTTGAAGAGA	

82552_AARA_NNT	(1145)	TTTCTGAAGAAAGGTTCCCTAGAAGTGAATGCTCTTATTTTCGAAGGTAATGCTTCGGGT-GATAACGGGA	2077
244893_KAIA	(1773)	AGCAGCAGCAC-----AGCTGAGAACTTGGCTGAGGAGCCAGATGACAATCCTCAATCTC--GTGA-AGAA	2008
24547_KUFA	(1865)	AGCGGAGCAC-----GGCTGAGAACTTGGCTGAG	
276582_KAJB_Ae	(1512)	AGCTGAGAACTTGGCTGAGGAGCCAGATAACGATCCCTCAATCTC--GTGA-AGTA	
315905_ABOC	(1619)	AA-----TGAAAATTTGCCGGAGGATCCAGAAAGTTAAGCCTCGTCTC--ATGA-AGAA	
319998_KAZD	(1437)	AGTGGCAGCAC-----GGCTGAGAACTTGGCTGAGGAGCCAGATGACAATCCTCAATCTC--GCAA-AGTA	
At4g26850	(1707)	GGAGGATCT-----TGAAGGAACCATAGTTCATCAGCAAAACTCTAGTGGCAATGTTA--ACCAGAAAA	
At5g55120	(1614)	AGAAGA-----AGAAGNAGAGGAGCTTGAAGAGCAGNAATTC-----GAT-----	
BT013858_tomato	(1644)	TGAGGA-----TGAAAACATCAATCCAGAGAAGGAAATCCAGATTCCTCTGGTCC-----GCA	
NM_001072870_Os	(1660)	GGAGGAAGTCAGCGAAGACGAGGACGCCACCTACACGCCCTGTCTCCATTTGCCCTCCTGCTGTCGGCGGAA	
Patata VTC2 contig de ESTs	(1266)	ATGAGAACGCC-----A-ATGATGGTCTCTCTGAGGATCTAGATGTCACACCTCCACAGC---CCATGGAG	
82552_AARA_NNT	(1214)	AT-----GAAAACITGGCTCAAGGATCCAGNAGTCCAGNAGTAAAGCCTGGTCTC---A--TGAA	2147
244893_KAIA	(1836)	GCAAAATGATGCCCTTAACAAAGGCTCCCACTCTGTATGGTGCCTGGGAAAGCAAGAATGCCTAGT-TCAG	2078
24547_KUFA	(1895)	-----	
276582_KAJB_Ae	(1575)	GCGAATGATGCCCTTAGCAAAGCCTCCACCGAGGTATGGTGCCAGGAAAGCAAGANTGCCTAGT-TCAG	
315905_ABOC	(1670)	GTCGACGCTACCAATTAACAAAAGCTCCCGGCTGCTATGGTGGTGAGACACAAGAATGCAATGT-TCTG	
319998_KAZD	(1500)	GCGAATGATGCCCTTAACAAAAGGCTCCACCGAGGTATGGTGCCAGGAAAGCAAGAATGCCTAGT-TCAG	
At4g26850	(1769)	GCAACAGAACCCATGGAGGTCGGATCACAAAATGGGACGGCCGCG-----GAGTGCCTTGT-CCIT	
At5g55120	(1653)	GA-----ATGGTGGCAGCTTCACAAAT-----AGTGCATTTGT-CCIT	
BT013858_tomato	(1698)	GG-----TGGCCTCACAATATTCCTCCAGATTTGTTGGTGTGCAGTGAAGAATTTGGCTTGTCTCTTG	
NM_001072870_Os	(1730)	GGCTGCCCTCGTCCCTCAGTGAGACGGTAGAACAGGTTGTCGGCCTGGTAAAGCCTGTGCCGCTTCGGTC	
Patata VTC2 contig de ESTs	(1328)	GAGATTGA-----TGGGTCTCACACCCCATAGTACCATGGTTCC-----CGCCTAGGGTTTT	
82552_AARA_NNT	(1261)	GAAG-----TCAACACCCATCAACAATA-----GAGTGCATTTGT-TCTG	2148
244893_KAIA	(1905)	CACTGAGAAATTTGGG-CATTTGAAGAATGTTCACTGGTTTGTGT	2191
24547_KUFA	(1895)	-----	
276582_KAJB_Ae	(1644)	CACTGAGAAATTTGGG-CATTTGAAGAATGTTCACTGGTTTGTGT	
315905_ABOC	(1739)	CAGT---AAATGAGC-AGATTTGGTGGGTGTTACAA-TGTGAAT	
319998_KAZD	(1569)	CACTGAGAAATTTGGG-CATTTGAAGAATGTTCACTGGTTTGTGT	
At4g26850	(1828)	CAGT--GAAC-----AATATGGTGAAT---TGTTGGTTTGTAT	
At5g55120	(1688)	CAGT--GAAG-----AAGAGGCTGTCTC--TAATGAGGCGCT	
BT013858_tomato	(1762)	CAAGATCTAATAAA--AGTTTGAAGTATTAATCTAGTGTATGGTT	
NM_001072870_Os	(1800)	TTCTCATCAGTCTTCTCAGTCTTACCCCGCTGTCGCTAGCT	
Patata VTC2 contig de ESTs	(1379)	CACGGCCCAAG-----CTCTGGTGTTTTATCCGCAATGATGATT	

82552\_AARA\_NNT (1298) CAGT--AAATGAGCAGATTGTCTGGGTGTTTAAACAATGTGAAAT

FIGURA 10

	244893_ Ac	24547_ A e	276582_ Ae	315905_ Ms	319998_ Ac	A14g2685 0	A15g5512 0	BT013858_ Le	Os12g0190 00	Contig-St	82552_ Md
244893_Ac		95	95	73	95	65	64	57	57	74	72
24547_Ae			100	79	98	68	68	62	62	75	81
276582_Ae				74	97	68	67	60	60	73	73
315905_Ms					74	67	67	59	59	71	87
319998_Ac						67	66	60	61	73	74
A14g26850							74	56	58	69	68
A15g55120								58	59	69	67
BT013858_Le									57	63	60
Os12g019000										64	60
Contig-St											
82552_Md											73





Actinidia deliciosa 198296_KALA	Actinidia eriantha 169164	Actinidia eriantha 169164	Arabidopsis thaliana AT5G28840	Malpighia glabra DQ229167	Malus pumila 108403_AAOA	Ostreococcus lucimarinus XM_001422193	Solanum tuberosum DQ268848	Vitis vinifera EF554358	Lycopersicon esculentum BT013590	Oryza sativa AB193582	Oryza sativa AB235855
100	98	90	93	94	69	83	94	92	92	92	64
	100	90	92	94	69	82	94	94	92	91	64
		100	91	91	70	81	92	92	91	90	65
			100	94	69	84	95	92	92	93	64
				100	69	86	94	94	93	90	64
					100	62	69	70	70	69	62
						100	83	84	84	82	58
							100	95	95	92	64
								100	100	90	64
										100	64
											100

FIGURA 12

FIGURA 13

158  
 89  
 108403 (88) TTT--CAGAAATGGGAAGTACAAGCGGAAAATTAAGTATGGTGGTAFACCTATGAGAACCTCGAGAGGGAGC  
 169164 (41) TT---CAGAAATGGGAAGCACCGGTGAATCTAACACACGATCGTACACTATGAGAACCTTGAAGGGAAAC  
 198296 (75) TT---CAGAAATGGGAAGCAGCAGTGAATCTAACACACGATCGTACACTATGAGAACCTCGAGAGGGAAAC  
 At5g28840 (80) TTCTCAGAAATGGGAACCTACCAATGGAAACAGACTATGGAGCATACACATACAAAGGAGCTAGAAAGAGAGC  
 159  
 108403 (156) CTTATTGGCCCTCTGAAAAGCTCCGAAATTCATACCGGGGAGGTGGTTTATCGCCCTCCACATTTGC  
 169164 (108) CCTACTGGCCGGAGGCGAAGCTCCGATCTCCATAACCGGAGCCGGTGGGTTCATTTGCCCTCACACATTTGC  
 198296 (142) CCTACTGGCCGGAGGCGAAGCTCCGATCTCCATAACCGGAGCCGGTGGGTTCATTTGCCCTCGCACATTTGC  
 At5g28840 (150) AATATTGGCCCACTGAGAACTCAAGATATCAATAACAGGAGCTGGAGGTTTCATTTGCATCTCACATTTGC  
 229  
 108403 (226) CCGGAGATTGAAGAAATGAGGGTCATTACATTAATGCTTCCGATTTGGAAGAAGAAATGAGCACATGACTGAA  
 169164 (178) AAGGCGACTGAAGGGCGAAGGCAATACATCATTTGCTTCTGACTGGAAAGAAAACGACACATGACCCGAG  
 198296 (212) AAGGCGACTGAAGGGAGAGGGGCAATACATCATTTGCTTCTGACTGGAAAGAAAACGACACATGACCCGAG  
 At5g28840 (220) TCGTCGTTTGAAGCACGAAGGTCATTACGTGATTTGCTTCTGACTGGAAAGAAATGAAACACATGACTGAA  
 299  
 108403 (296) GACATGTTCTGCCAATGAATCCATCTTTGCCGACCTCAGGGTCATGGATAAATGCTTGAAGGTTCACAAAGA  
 169164 (248) GACATGTTCTGTCCAGAAATCCATCTTTGTTGATCTCAGGGTGAATGGCAACTGCTTGAAGAAGTCAAGCCCA  
 198296 (282) GACATGTTTGTCCAGAGTTCCATCTCGTTGATCTGAGGGTGAATGGCAACTGCTTGAAGAAGTCACTACCG  
 At5g28840 (290) GACATGTTCTGTGATGAGTTCCATCTTTGTTGATCTTAGGTTAATGGAGAAATGCTCAGAAAGTTACTGAAG  
 369  
 108403 (366) ATGTTGACCATGTGTTCAACCTCGCAGCTGATATGGGGGAAATGGGCTTTCATTCAGTCCAAACCATTTCTGT  
 169164 (318) GAGTTGATCATGTGTTCAATCTTCAATCTGCTGATATGGGTGGGATGGGCTTTCATTCAGTCCAAATCACTCAGT  
 198296 (352) GAGTCGATCATGTGTTCAATCTTCAATCTGCTGATATGGGTGGGATGGGATTCATTCAGTCCAAACCATTCGGT  
 At5g28840 (360) GAGTTGATCATGTTTTTAACTTAGCTGCTGATATGGGTGGGATGGGTTTTATCCAGAGTAAATCACTCTGT  
 439  
 108403 (436) CATATTTTATAACAAATACCATGATTAGTTTCAACATGGTCCGAGCTGCTAGGATCAATGACGTGAAGAGG  
 169164 (388) CATTATGTATAAACACACAAATGATCAGCTTCAACATGCTTGAAGCTGCTAGGGTCAATGGTATTAAGAGG  
 198296 (422) CATTATGTATAAACACACGATGATCAGCTTCAACATGCTTGAAGCAGCTAGGGTCAATGGTATTAAGAGG  
 At5g28840 (430) GATTATGTATAATAATACTATGATTAGTTTCAATATGATTTAGGCTGCTAGGATCAATGGGATTAAGAGG  
 509  
 108403 (506) TTTTCTATGCTTCTAGTGTGTTTACCCCTGATTTAACCCCTGATTTAAGCAGCTGGAAACCA---ATGTCAGCTTGA  
 169164 (458) TTCTTTTATGCTTCTAGCGCTTGTATTTACCCCTGAATTTAAGCAGTTGGACACAA---ATGTGAGCTTGA  
 198296 (492) TTCTTTTATGCTTCTAGCGCTTGTATTTATCCCTGAATTTAAGCAGTTGGACACTA---ATGTGAGCTTGA  
 At5g28840 (500) TTCTTTTATGCTTCTAGTGTGTTTATCCAGAGTTTAAAGCAGTTGGAGACTACTAATTTGTGAGCTTGA

108403 579 648  
 (573) AGGAGTCTGATGCC TGGCC TGCAGAGCCTCAAGATGCTATAGGCTGGAGAAGCTTGC AAC TGAGGAATT  
 169164 (525) AGGAATCTGATGCT TGGCCCGCTGAGCCTCAAGATGCTATAGGCTTATAGAGAAGCTTGC AAC CCGAGGAGTT  
 198296 (559) AGGAGTCTGATGCT TGGCCCGCTGAGCCTCAAGATGCTATAGGCTTATAGAGAAGCTTGC AAC CCGAGGAGTT  
 At5g28840 (570) AGGAGTCAGATGCT TGGCC TGCAGAGCCTCAAGATGCTATAGGCTTATAGAGAAGCTTGC AAC CCGAGGAGTT  
 649 718  
 108403 (643) GTGCAAGCACTACACCAAGACTTTGGAATCGAGTGCCTGATGGAAAGTTCCACAACAATTTATGGCCCT  
 169164 (595) ATGCAAGCACTACACCAAGGACTTTGGCAATGAATGTAGGATGGACGGTTTCCACAACAATCTATGGACCT  
 198296 (629) ATGCAAGCACTACACCAAGGATTTGGCAATGAATGTAGGATGGAAAGTTTCCACAACAATTTATGGACCT  
 At5g28840 (640) STGTAAGCATTACAACAAGATTTGGTATTGAGTGTGGAATGGAAAGTTCCACAACAATTTATGGTCTCT  
 719 788  
 108403 (713) TTTGGAACTGGAAAGGTGGAAGGAGAAAGGCTCCTGCTGGCTTTTGAGAAAGACTCTCAC TGGCCACTG  
 169164 (665) TTTGGAACTGGAAAGGTGGAGGGAGAAAGCCCTGCTGCATTTGAGAAAGACCCCTTACCTCCACTG  
 198296 (699) TTTGGAAACATGGAAGGTGGAAGGAGAAAGCCCTGCTGCATTTGAGAAAGACCCCTTACCTCCACTG  
 At5g28840 (710) TTTGGAAACATGGAAGGTGGAAGGAGAAAGGCTCCAGCTGCTTTCTGTAGGAAGGCTCAGACTTCCACTG  
 789 858  
 108403 (783) ATAAAGTTTGAGATGTGGGAGATGGACTTCAGACCCGATCCTTCACTTATTGATGAATGTGTAGAAAGG  
 169164 (735) ATAGGTTTGAGATGTGGGAGACGGTCTCAAAACCCGATCTTTCACTTATGATGAATGTGTGTGAAAGG  
 198296 (769) ATAGGTTTGAGATGTGGGAGACGGTCTCAAAACCCGATCTTTCACTTATGATGAATGTGTGTGAAAGG  
 At5g28840 (780) ATAGGTTTGAGATGTGGGAGATGGGCTTCAGACCCGCTTCTTTTACCTTATCGATGATGTGTGTGAAAGG  
 859 928  
 108403 (853) TGTACTTCGGTTGACGAAAGTCAGACTTCCGTTGAGCCAGTGAATATGGAAAGTGAATGAGATGGTTAGCATG  
 169164 (805) TGTCCTAAGATTGACGAAAGTCAGACTTCAGAGAACCAAGTGAATATGGAAAGTGAATGAGATGGTCAGCATG  
 198296 (839) TGTCCTAAGATTGACAAAATCAGACTTCAGAGAACCAAGTGAATATGGAAAGTGAATGAGATGGTCAGCATG  
 At5g28840 (850) TGTACTCAGGTTGACAAAATCAGATTTCGGTTGAGCCGGTGAACATCGGAAAGCGATGAGATGGTGAGCATG  
 929 998  
 108403 (923) AATGAGATGGCTGAGATGCTTCTTAGCTTTGAGGAAGAAGCTGCCCATCCAGCACATTCCTGGGCCAG  
 169164 (875) AATGAGATGGCCGAGATGCTTCTCAGCTTCAGAAACAAGAAACTGCCATCCATCACATTCGCGGGCCAG  
 198296 (909) AATGAGATGGCCGAGATGCTTCTCAGCTTCGAGGACAAGAACTGCCATCCATCACATTCCTGGGCCAG  
 At5g28840 (920) AATGAGATGGCTGAGATGGTCTCAGCTTTGAGGAAAAGAAAGCTTCCAAATCACCACATTCCTGGGCCGG  
 999 1068  
 108403 (993) AGGGTGTCCGTCGTAACCTCAGACAACACACTGATCAAAAGAAAACCTTGGTTGGGCTCCCTACCATGAG  
 169164 (945) AGGGCTCCGTCGACGAAACTCGGACAACACCTGATTAAGGAGAAAGCTTGGTGGGCCCCCAACTATGAA  
 198296 (979) AGGGGTCCGTCGAAACTCGGACAACACCTGATTAAGGAGAAAGCTTGGTGGGCCCCCAACTATGAA  
 At5g28840 (990) AAGGTGTTCCGTCGTAACCTCAGACAACAACTGATCAAAAGAAAAGCTTGGTTGGGCTCCCTAAATATGAG  
 1069 1138

108403	(1063)	GTGAAGGATGGTCTGAGAAATTACATATACTTCTGGATCAAGGAACAGATTGAGAAAGAGAAAGGCACAAGGC
169164	(1015)	ACTGAAGGATGGCTGAGATTACATACTTTTGGATCAAGGAACAACTTGAGAAAGAGAAAGGCTCGGGGC
198296	(1049)	ACTGAAGGATGGCTGAGATTACATACTTCTGGATCAAGGAGCAACTTGAGAAAGAGAAAGGCTCAGGGC
At5g28840	(1060)	ATTGAAGGAGGGGCTTAGAATAACCTACTTCTGGATAAAGGAACAGATCGAGAAAGAGAAAGCAAAAGGGA
		1139
108403	(1133)	GCTGACCTCTCGGTGTAJGGCTCATCTAAGGTGTGGGAACCCCAAGCCCCAGTTCAACTTGGTTCGCTGC
169164	(1085)	ATCGATCTGTCAACTTATGGGTCAATAAAGTTGTGGGAACGCAAGCCCCAGTTCAGTTGGGCTCTCTTC
198296	(1119)	ATCGATCTGTCAACTTATGGATCGTCAAAAGTTGTGGGAACGCAAGCCCCGGTTCAGTTGGGCTCTCTTC
At5g28840	(1130)	AGCGATGTGTGCTTACGGGTCATCAAAGGTGGTTGGAACTCAAGCACCCGGTTCAGCTAGGCTCACTCC
		1209
108403	(1203)	GTGCTGCTGATGGCAAAGAATGAAG
169164	(1155)	GTGCTGCTGATGGCAAAGAATGAAG
198296	(1189)	GTGCTGCTGATGGCAAAGAATGAAG
At5g28840	(1200)	GCGCGGCTGATGGAAAAGAGTGAAG
		1233

**FIGURA 14**

	108403	169164	198296	At5g28840
108403	100	78	77	71
169164		100	94	74
198296			100	74
At5g28840				100

FIGURA 15

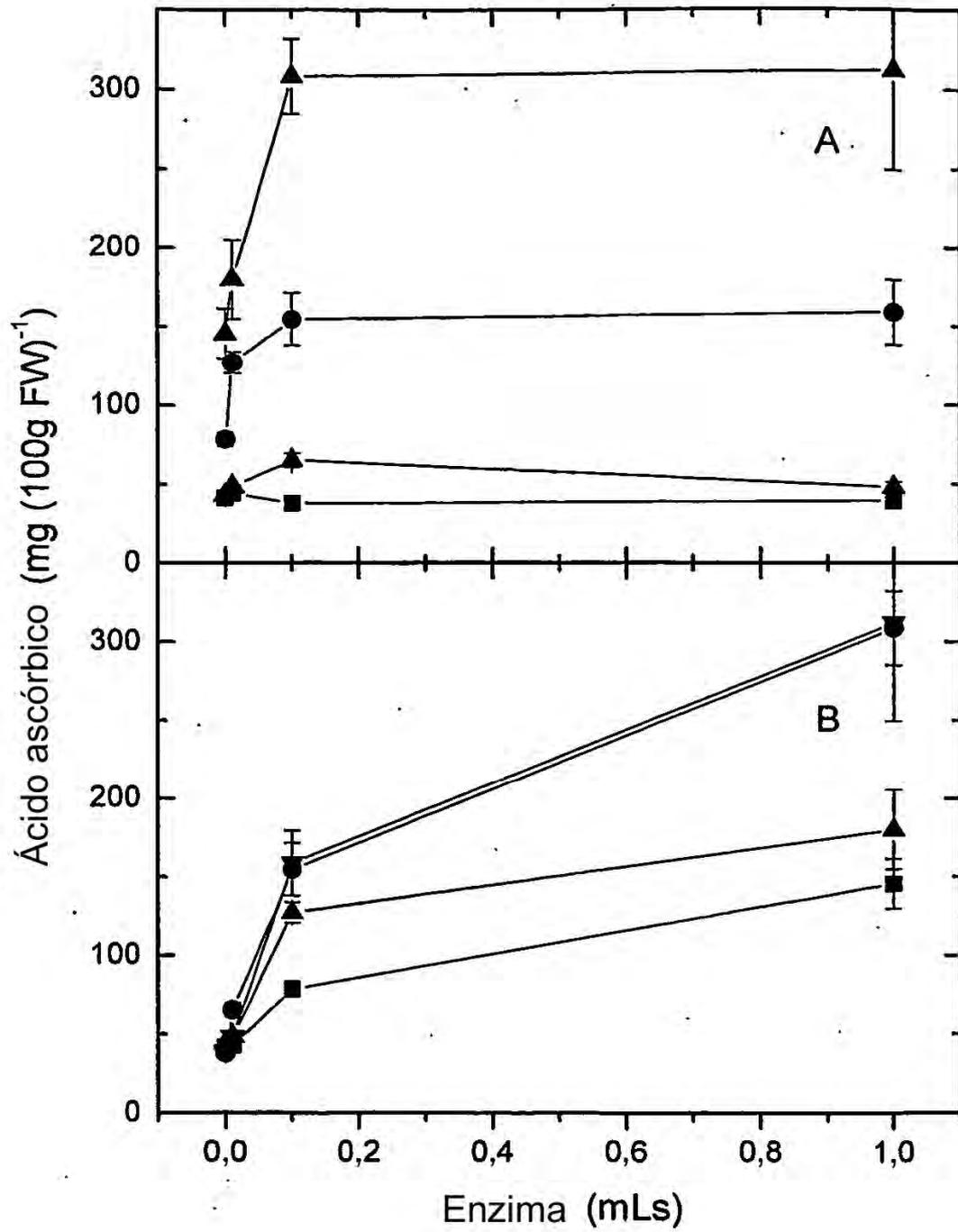


FIGURA 16

transferasa EST	descripción	especie	Vector	Agrobacterium (169164)	Epimerasa añadida (169164)	hoja	mg asc/100g	relativo a P19 control	promedio sobre todas hojas	asc rel a control promedio P19
ninguna	control				no	1	33,8	1,0	35,4	1,0
ninguna	epimerasa control 169164	A. eriantha	pGreen	GV3101	si	3	36,0	1,0		
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	no	1	40,6	1,2	42,1	1,2
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	2	41,8	1,2		
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	no	3	43,8	1,2		
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	1	91,1	2,7	150,2	4,2
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	2	144,6	4,0		
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	3	214,9	5,9		
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	1	152,8	4,5	303,9	8,6
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	2	306,3	8,5		
319998	transferasa	A. chinensis	pGreen	GV3101	si	3	452,5	12,4		
319998	transferasa	A. chinensis	pHex2s	EHA105	no	1	104,3	3,1	166,3	4,7
319998	transferasa	A. chinensis	pHex2s	EHA105	no	2	130,5	3,6		
319998	transferasa	A. chinensis	pHex2s	GV3101	no	3	264,3	7,2	153,5	4,3
142730	transferasa	manzana	pGreen	GV3101	no	1	90,2	2,7		
142730	transferasa	manzana	pGreen	GV3101	no	2	130,1	3,6		
142730	transferasa	manzana	pGreen	GV3101	no	3	240,2	6,6	48,6	1,4
142730	transferasa	manzana	pGreen	GV3101	no	1	46,5	1,4		
142730	transferasa	manzana	pGreen	GV3101	no	2	46,2	1,3		

142730	transferasa	manzana	pGreen	GV3101	si	3	53,3	1,5	75,7	2,1
						1	57,5	1,7		
						2	75,0	2,1		
						3	94,6	2,6		
BTO13858	transferasa	Tomate	pGreen	GV3101	no	1	64,9	1,9	57,6	1,6
						2	64,1	1,8		
						3	43,9	1,2		
BTO13858	transferasa	Tomate	pGreen	GV3101	si	1	59,5	1,8	78,2	2,2
						2	90,5	2,5		
						3	84,7	2,3		

FIGURA 17

Transferasa EST	descripción	especies	Vector	Agrobacterium (169164)	Epimeras añadidas	hoja	mg asc/100g control	relativo a P19 control	promedio sobre todas las hojas	asc rel a promedio control P19
319998	transferasa	His marcado control para His marcado	319998 pGreen	GV3101		hojas combinadas	134,1	2,5		
ninguna	P19 control				ninguna	hojas combinadas	54,2			
Ninguna	P19 + epimerasa de control de kiwi				169164	1	32,4	1,0	28,0	1,0
						2	28,3	1,0		
						3	23,4	1,0		
						1	37,7	1,2	29,4	1,1
						2	22,2	0,8		
						3	28,3	1,2		
Ninguna	P19 + epimerasa de control de manzana				108403	1	34,7	1,1	28,0	1,0
						2	28,0	1,0		
						3	21,2	0,9		
319998	transferasa	kiwi	pgreen	GV3101	ninguna	1	116,4	3,6	77,4	2,8
						2	75,7	2,7		
						3	40,2	1,7		
319998	transferasa + KF epimerasa	kiwi	pgreen	GV3101	169164	1	162,8	5,0	152,3	5,4
						2	198,8	7,0		
						3	95,2	4,1		
319998	transferasa + manzana epimerasa	kiwi	pgreen	GV3101	108403	1	95,3	2,9	78,7	2,8

319998	transferasa	kiwi	ninguno	2	79,3	2,8	
			pgreen GV3101 resistente a bar	3	61,5	2,6	
				1	94,1	2,9	85,8
				2	106,2	3,8	3,1
				3	57,3	2,4	
							8,0
319998	transferasa + KF epimerasa	kiwi	169164	1	249,7	7,7	223,9
			pgreen GV3101 resistente a bar	2	207,9	7,4	
				3	214,0	9,2	
319998	transferasa + manzana epimerasa	kiwi	108403	1	169,6	5,2	123,1
			pgreen GV3101 resistente a bar	2	101,1	3,6	4,4
				3	98,5	4,2	

**FIGURA 18**

Línea	Número sensible	Número resistente	Número Chi esperado estadístico	Significativo a nivel 5%?	Significativo a nivel 1%?	insertos
1	18	142	40	12,1		
2	8	59	16,75	4,6	VERDADERO	FALSO
3	5	12	4,25	0,13	FALSO	FALSO
5	12	162	44	22,8	VERDADERO	VERDADERO
6	41	167	52	2,3	FALSO	FALSO un inserto
7	7	112	30	17,4	VERDADERO	VERDADERO
8	4	22	6,5	0,96	FALSO	FALSO un inserto
9	0	130	33	32,5	VERDADERO	VERDADERO >2 insertos
10	0	47	11,75	11,8	VERDADERO	VERDADERO
11	7	315	81	67,1	VERDADERO	VERDADERO
12	3	121	31	25,3	VERDADERO	VERDADERO
13	7	82	22	10,5	VERDADERO	VERDADERO
14	17	171	47	19,1	VERDADERO	VERDADERO
16	17	199	54	25,4	VERDADERO	VERDADERO
17	0	6	1,5	1,5	FALSO	contaminado
18	2	62	16	12,3	VERDADERO	VERDADERO
19	18	320	85	52,3	VERDADERO	VERDADERO
20	0	189	47	47,3	VERDADERO	VERDADERO >2 insertos
21	0	187	47	46,8	VERDADERO	VERDADERO >2 insertos
25	13	110	31	10,2	VERDADERO	VERDADERO
26	7	234	60	47,1	VERDADERO	VERDADERO
33	22	335	89	50,7	VERDADERO	VERDADERO

34	5	12	4,25	0,13	FALSO	FALSO
37	5	284	72	62,6	VERDADERO	VERDADERO
38	2	83	21,25	17,4	VERDADERO	VERDADERO
39	1	0	0,25	2,25	FALSO	FALSO
40	5	105	27,5	18,4	VERDADERO	VERDADERO
41	22	208	58	21,9	VERDADERO	VERDADERO
43	6	23	7,25	0,22	FALSO	FALSO
44	46	155	50	0,4	FALSO	FALSO
46	1	155	39	37,0	VERDADERO	VERDADERO

contaminado

un inserto

FIGURA 19

Línea	# plantas	media		media		
		ASC si ASC < 60-	# con ASC < 60	ASC si ASC > 80	# con ASC > 80	
2	6	.44		4	186	1
6	8			0	176	8
8	11	39		9	213	1
16	10	29		.7	174	2
21	5	38		2	149	3
34	9	50		6	152	2
37	4	48		4		0
40	10	49		2	92	3
41	3	42		1	84	1
43	1	47		1		0
44	10	40		7	170*	2
fexl	8	51 ( $\pm 3$ )		8		0
wt8	8	52 ( $\pm 4$ )		7		0

FIGURA 20

Linea	media ASC si ASC < 50	SE	media ASC si ASC > 80	SE	max ASC	total #	# resistente a Kn	# con resistente ascorbato > 80	# asc < 50
control pHEX	50	2			60	20	20	0	8
control P	53	2			70	11	11	0	5
2,1	41	2	122	21	154	11	11	3	7
2,7	42	1			48	12	12	0	12
6,19	43	2	140	12	184	12	12	6	3
6,21	44	2	101	7	124	10	10	5	4
8,12	42	2			65	12	12	0	8
8,7	34	4	95		132	11	11	2	10
16,2	47	1	146	24	216	12	12	4	6
16,20	48		128		128	9	9	1	1
21,2	45	2	107	7	119	10	10	3	5
34,5			132	15	210	9	9	7	0
40,10	37	2			49	11	11	0	11
44,1	42	1			64	11	11	0	4
44,12	46	1	100	3	105	11	11	3	5

44.2	49	0	164	23	204	11	11	2	4
44.3	41	1		53	12	12	12	0	11
44.4	31	10	105	105	11	11	11	1	4

FIGURA 21

<i>Arabidopsis</i>	conc Ascorbato	expresión de qPCR
línea transgénica	mg/100g FW	319998
2-1 10	30	0
2-1 11	130	8000
6-21 3	124	1500
6-21 5	41	0
34-5 3	55	0
34-5 5	133	4500
34-5 6	147	6500
34-5 8	118	6000
40-10 7	33	0
44-4 7	105	8500
44-12 4	105	5500
44-12 6	41	4500
phex6	45	0
wt6	48	0

FIGURA 22

Número muestra	319998 PCR	concentración ascorbato (mg/100g FW)	ascorbato relativo
1	-	31	0,9
2	-	39	1,2
3	-	29	0,9
4	-	35	1,1
5	+	29	0,9
6	+	28	0,8
7	+	38	1,1
8	+	52	1,6
9	+	29	0,9
10	+	53	1,6
11	+	29	0,9
12	+	33	1,0

FIGURA 23

EST	especies	F/min/ul	nmol/min/ul	ug proteína/ul	nmoles/s/mg proteína	nmoles/s/nmol	instrumento
73032	A deliciosa	4822	2,135	4,19	0,509	9,21	nuevo
142730	manzana	2043	0,905	2,80	0,323	5,84	nuevo
315905	manzana silvestre	81	0,036	0,25	0,144	2,61	nuevo
319998	kiwi	11097	2,824	*			antiguo
A15g55120	arabidopsis	2534	1,122	2,96	0,379	6,86	
BT013858	Tomate	82	0,036	0,28	0,129	2,33	
Patata	patata	894	0,396	0,58	0,685	12,39	
No adición	bg	-1	0,000				antiguo
Pet30	control vector vacío	0	0,000	0,12	-0,001	-0,02	nuevo

\*proteína no disponible pero en Laing et al. 2007, la actividad fue 0,35 nmoles/mg/s.