

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 386**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10734631 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2451946**

54 Título: **Nuevos Polipéptidos de Hidroxifenilpiruvato Dioxigenasa, y métodos de uso**

30 Prioridad:

**22.01.2010 US 692552**  
**10.07.2009 US 224661 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.12.2015**

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)**  
**Schwarzwaldallee 215**  
**4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HAWKES, TIMOTHY ROBERT;**  
**LANGFORD, MICHAEL PHILLIP;**  
**VINER, RUSSELL COLIN;**  
**VERNOOIJ, BERNARDUS THEODORUS MARIA;**  
**DALE, RICHARD;**  
**SINGH, SHARDHA y**  
**KRAMER, VANCE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 555 386 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

Nuevos Polipéptidos de Hidroxifenilpiruvato Dioxigenasa, y métodos de uso.

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) que confieren resistencia o tolerancia a herbicidas a plantas, y a las secuencia de ácidos nucleicos que los codifican. Los métodos de la invención se refieren a la producción y uso de plantas que expresan estos polipéptidos de HPPD mutantes, y que son resistentes a herbicidas de HPPD.

**Antecedentes de la invención**

10 Las hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD) son enzimas que catalizan la reacción en la que para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esta reacción tiene lugar en presencia de hierro enlazado a enzima ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y oxígeno. Los herbicidas que actúan inhibiendo HPPD son bien conocidos, e incluyen isoxazoles, dicetonitrilos, tricetonas, y pirazolinatos (Hawkes "Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD) – The Herbicide Target". In *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 211-220). La inhibición de HPPD bloquea la biosíntesis de plastoquinona (PQ) a partir de tirosina. PQ es un cofactor esencial en la biosíntesis de pigmentos carotenoides que son esenciales para la fotoprotección de los centros fotosintéticos. Los herbicidas que inhiben la HPPD son blanqueadores móviles en el floema que provocan que los nuevos meristemas y hojas expuestos a la luz salgan blancos. En ausencia de carotenoides, la clorofila es fotodestruida y se convierte ella misma en un agente de fotodestrucción vía la fotogeneración de oxígeno singlete.

20 También se conocen métodos para proporcionar plantas que sean tolerantes a los herbicidas de HPPD. Estos métodos han incluido: 1) sobreexpresar la enzima HPPD para producir cantidades de enzima HPPD en la planta que sean suficientes con relación a un herbicida dado a fin de tener suficiente enzima funcional disponible para que la planta crezca prolíficamente a pesar de la presencia del herbicida; y 2) mutar una enzima HPPD particular en una enzima que sea menos sensible a la inhibición por los herbicidas. Se han descrito métodos para mutar 25 enzimas HPPD para la tolerancia mejorada a herbicidas de HPPD (véanse, *por ejemplo*, las Solicitudes PCT n<sup>os</sup> WO 99/24585 y WO 2009/144079), y algunas mutaciones particulares de las enzimas HPPD de la planta (*por ejemplo*, mutación de G422 en la secuencia de HPPD de *Arabidopsis*) son capaces supuestamente de proporcionar alguna medida de tolerancia a mesotriona y otros herbicidas tricetonicos. Sin embargo, la cinética de la enzima y los datos completos de la planta dados hasta ahora son insuficientes para concluir si los cambios 30 mutacionales dados a conocer confieren beneficios comercialmente significativos con respecto a la enzima o enzimas de tipo salvaje correspondientes.

Además, mientras que una enzima HPPD particular puede proporcionar un nivel útil de tolerancia a ciertos herbicidas inhibidores de HPPD, la misma HPPD puede ser bastante inadecuada para proporcionar niveles 35 comerciales de tolerancia a un herbicida diferente, más deseable, inhibidor de HPPD (véase, *por ejemplo*, Publicación de Solicitud de Patente U.S. n<sup>o</sup> 20040058427; Publicaciones PCT n<sup>os</sup> WO 98/20144 y WO 02/46387; véase también la Publicación de Solicitud de Patente U.S. n<sup>o</sup> 20050246800 que se refiere a la identificación y al marcaje de variedades de haba de soja como relativamente tolerantes a HPPD). Además, todavía no se han dado a conocer versiones mutadas de las HPPD procedentes de pastos de climas fríos con resistencia mejorada a herbicidas de tipo tricetona. Tales mutantes serían muy deseables, puesto que las HPPD procedentes de 40 pastos de climas fríos son preferibles a otros tipos (véase, *por ejemplo*, Solicitud PCT n<sup>o</sup> WO 02/46387 y Hawkes *et al.* 2001 en *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. Weeds* 2, 563). En consecuencia, se necesitan nuevos métodos y composiciones para conferir niveles comerciales de tolerancia a herbicidas de HPPD en las diversas cosechas y variedades de cosechas.

**Breve resumen de la invención**

45 Se proporcionan composiciones y métodos para conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD). Las composiciones incluyen secuencias nucleotídicas y de aminoácidos para polipéptidos de HPPD. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención son nuevas HPPD que derivan de plantas y que confieren resistencia o tolerancia, cuando se expresan de forma heteróloga en otras plantas, a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. Estas HPPD comprenden secuencias de 50 aminoácidos dispuestas en SEC ID NO: 2 y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91 ó 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 2 que muestra actividad enzimática de HPPD.

Las nuevas HPPD preferidas son igualmente aquellas que, en comparación con las enzimas HPPD de la técnica anterior, muestran tolerancia superior a uno o más tipos de herbicidas de HPPD, y en las que la tolerancia se caracteriza *in vitro* mediante el valor numérico del parámetro ( $k_{\text{off}} \times k_{\text{cat}} / K_{\text{m HPP}}$ ), y en el que  $K_{\text{off}}$  es la constante de velocidad que gobierna la velocidad de disociación del complejo de la enzima HPPD con el herbicida, y  $k_{\text{cat}} / K_{\text{m HPP}}$  es el índice de recambio catalítico dividido entre el valor de  $K_{\text{m}}$  para el sustrato HPP (4-hidroxifenil 55 piruvato).

En un aspecto adicional de la presente divulgación, también se proporciona por lo tanto un método *in vitro* para caracterizar y seleccionar las HPPD que confieren niveles superiores de tolerancia a herbicidas de HPPD basado en la medición y comparación de valores de  $k_{cat}/K_m$  HPPD y  $k_{off}$ , o equivalentes funcionales de estos parámetros.

5 En aspectos adicionales, los polipéptidos de la divulgación son HPPD mutantes catalíticamente activas que derivan de plantas, y que, con relación a la enzima similar no mutada, confieren niveles superiores de resistencia o tolerancia a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. En particular, estos polipéptidos de HPPD mutantes comprenden una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEC ID NOs: 15-19, en las que SEC ID NOs: 15-19 tienen una o más sustituciones de aminoácidos descritas según lo siguiente:

10 Con respecto a la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T) (SEC ID NO: 15), la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente E, D, G, C, N, Q, S, y A, y más particularmente E, C, A y D.

Con respecto a la secuencia G(I,V)LVD(R,K) (SEC ID NO: 16), la L se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente M, F, Y, I, A,W, y V, y más particularmente M.

15 Con respecto a la secuencia DH(V, I, M)VGN (SEC ID NO: 17), la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente L, A y I, y más particularmente L e I.

Con respecto a la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P) (SEC ID NO: 18), la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido, particularmente R, K, H, N, I, L, T, S y Q, y más particularmente R, I, L, H y K.

20 Con respecto a la secuencia CGFGKGN (SEC ID NO: 19), la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido. En ciertos aspectos, la segunda G se sustituye por una R, K, H, E, D, N, Q, A, S, T, y más particularmente R, S, T, H y K. En ciertos aspectos, la K se sustituye por una S y T, y más particularmente por una T.

25 En algunos aspectos, los polipéptidos son HPPD mutantes individualmente, doblemente, triplemente, cuádruplemente, quíntuplemente o séxtuplemente, que combinan más de una de las mutaciones anteriores en las diversas permutaciones (por ejemplo, 2+3, 2+4, 2+1; 3+4, 3+1; 4+1; 3+4+1, 2+3+4, 2+4+1, 2+3+1; 2+3+4+1; 1+2+3+4+5 etc.).

La HPPD mutante deriva de la especie *Alopecurus* y, más particularmente, deriva de uno o más de los polipéptidos de HPPD de SEC ID NO: 2.

30 Los polipéptidos de HPPD y polipéptidos de HPPD mutantes ejemplares según la invención corresponden a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 2 y variantes y fragmentos de las mismas. Además, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias polinucleotídicas que codifican estos polipéptidos de HPPD mutantes particulares de la invención, *por ejemplo*, SEC ID NO: 54. Las composiciones también incluyen casetes de expresión que comprenden un promotor enlazado de forma operable a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de HPPD de la invención, sola o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables.

35 También se proporcionan plantas, células vegetales y semillas transformadas que comprenden un casete de expresión de la invención.

40 Las composiciones de la invención son útiles en métodos dirigidos a conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas, particularmente resistencia o tolerancia a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. En realizaciones particulares, los métodos comprenden introducir en una planta al menos un casete de expresión que comprende un promotor enlazado de forma operable a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de HPPD de la invención. Como resultado, el polipéptido de HPPD se expresa en la planta, y puesto que la HPPD se selecciona basándose en que es menos sensible a herbicidas que inhiben HPPD, esto conduce a que la planta presente resistencia o tolerancia sustancialmente mejorada a herbicidas que inhiben HPPD.

45 En otros aspectos, también se divulgan métodos para el ensayo, caracterización, identificación y selección de las HPPD de la actual invención.

#### Breve resumen de las varias vistas de los dibujos

La Figura 1 representa datos procedentes de las determinaciones de  $K_m$  y  $V_{max}$  del polipéptido de HPPD derivado de *Avena* correspondiente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1.

50 La Figura 2 representa datos procedentes de experimentos de intercambio de inhibidores a la temperatura del hielo para determinar los valores de la constante de disociación ( $k_{off}$ ) que gobiernan la disociación del complejo de estructura B (mesotriona) con el polipéptido de HPPD que corresponde a A) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 1 y B) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 41.

La Figura 3 muestra una representación del vector binario 17900 para la transformación de haba de soja, que confiere resistencia a HPPD con un gen de HPPD de avena optimizado con un codón de dicotiledónea que

codifica SEC ID NO: 49. Este vector binario también contiene marcadores seleccionables PAT dobles para la selección de glufosinato.

La Figura 4 muestra una representación del vector binario 17901 para la transformación de haba de soja que confiere resistencia a HPPD con un gen de HPPD de avena optimizado con un codón de dicotiledónea que codifica SEC ID NO: 50, y que también confiere tolerancia a glifosato (marcador seleccionable).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos dirigidos a conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD). Las composiciones incluyen secuencia de aminoácidos para polipéptidos de HPPD nativos y mutantes que tienen actividad enzimática de HPPD, y sus variantes y fragmentos. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de HPPD mutantes de la invención. Se proporcionan además métodos para conferir a las plantas resistencia o tolerancia a herbicidas, particularmente resistencia o tolerancia a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD. También se divulgan métodos para controlar de forma selectiva malas hierbas en un campo en un lugar de cosecha, y para el ensayo, caracterización, identificación y selección de las HPPD mutantes de la actual invención que proporcionan tolerancia a herbicidas.

En el contexto de la presente invención, las expresiones hidroxifenil piruvato de dioxigenasa (HPPD), 4-hidroxifenil piruvato de dioxigenasa (4-HPPD) y p-hidroxifenil piruvato de dioxigenasa (p-HPPD) son sinónimas.

“Herbicidas de HPPD” son herbicidas que son blanqueadores, y cuyo sitio principal de acción es HPPD. Muchos son bien conocidos y se describen aquí en otra parte y en la bibliografía (Hawkes “Hydroxyphenylpyruvate Dioxigenase (HPPD) – The Herbicide Target”. En *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 211-220; Edmunds “Hydroxyphenylpyruvate dioxigenase (HPPD) Inhibitors : Triketones”. En *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 221-242). Como se usa aquí, la expresión “herbicidas de HPPD” se refiere a herbicidas que actúan directa o indirectamente para inhibir HPPD, en la que los herbicidas son blanqueadores, y en la que la inhibición de HPPD es al menos parte del modo de acción del herbicida sobre las plantas.

Como se usa aquí, las plantas que son sustancialmente “tolerantes” a un herbicida presentan, cuando se tratan con dicho herbicida, una curva de dosis/respuesta que está desplazada a la derecha cuando se compara con la mostrada por plantas similares no tolerantes sometidas de forma similar. Tales curvas de dosis/respuesta tienen en el eje x representada gráficamente la “dosis”, y en el eje y tienen representado gráficamente el “porcentaje de exterminio o daño”, “efecto herbicida”, etc. Las plantas tolerantes necesitarán típicamente al menos dos veces tanto herbicida como las plantas similares no tolerantes, a fin de producir un efecto herbicida dado. Las plantas que son sustancialmente “resistentes” al herbicida presentan pocas lesiones, si las presentan, necróticas, líticas, cloróticas u otras lesiones, o, al menos, ninguna que impacte significativamente sobre el rendimiento, cuando se someten al herbicida a concentraciones y tasas que se emplean típicamente por la comunidad agrícola para exterminar malas hierbas en el campo.

Como se usa aquí, “plantas similares no transgénicas” son plantas que son similares o iguales a las plantas transgénicas, pero que no contienen un transgén que confiera resistencia a herbicidas.

Como se usa aquí, el término “conferir” se refiere a proporcionar una característica o rasgo, tal como tolerancia o resistencia a herbicidas, y/u otros rasgos deseables, a una planta.

Como se describe aquí en otra parte, el término “heterólogo” significa procedente de otra fuente. En el contexto de ADN, “heterólogo” se refiere a cualquier ADN “no propio” extraño, incluyendo aquél procedente de otra planta de la misma especie. Por ejemplo, en la presente solicitud, un gen de HPPD de haba de soja que se expresó de forma transgénica nuevamente en una planta de haba de soja todavía se describiría como ADN “heterólogo”.

El artículo “un” y “una” se usan aquí para referirse a uno o más de uno (es decir, hasta al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos. A lo largo de la memoria descriptiva, la palabra “que comprende”, o variaciones tales como “comprende” o “comprender”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas señalados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Una variedad de términos adicionales se definen o se caracterizan de otro modo aquí.

### Secuencias de HPPD

Las composiciones de la invención incluyen polinucleótidos y polipéptidos de HPPD nativos y mutantes, aislados o sustancialmente purificados, así como células hospedantes que comprenden los polinucleótidos de HPPD. Específicamente, la presente invención proporciona polipéptidos de HPPD que tienen actividad enzimática de HPPD, y que confieren resistencia o tolerancia en plantas a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD, y

sus variantes y fragmentos. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de HPPD nativos y mutantes de la invención.

Los polipéptidos de HPPD mutantes de la presente invención tienen cambios de aminoácidos en una o más posiciones con relación a la secuencia de tipo salvaje de partida de la que derivan, y presentan tolerancia mejorada a uno o más herbicidas inhibidores de HPPD. Las enzimas HPPD que presentan tolerancia mejorada a un herbicida de HPPD lo pueden hacer en virtud de presentar, con relación a la enzima de partida no mutada similar:

- a) un valor de  $K_m$  más bajo para el sustrato natural, 4-hidroxifenilpiruvato;
- b) un valor de  $k_{cat}$  más elevado para convertir 4-hidroxifenilpiruvato en homogentisato;
- c) un menor valor de la constante de velocidad aparente,  $k_{on}$ , que gobierna la formación de un complejo de enzima:herbicida inhibidor de HPPD;
- d) un valor incrementado de la constante de velocidad,  $k_{off}$ , que gobierna la disociación de un complejo de enzima:herbicida inhibidor de HPPD; y/o
- e) como resultado de cambios en uno o ambos de c) y d), un valor incrementado de la constante de equilibrio  $K_i$  (también denominada  $K_d$ ), que gobierna la disociación del complejo de enzima:herbicida inhibidor de HPPD. Las secuencias de ADN que codifican tales HPPD mutadas mejoradas se usan en la provisión de plantas, cosechas, células vegetales y semillas de HPPD de la actual invención que ofrecen tolerancia o resistencia mejorada a uno o más herbicidas de HPPD en comparación con plantas similares que expresan igualmente la enzima de partida no mutada.

Se encuentra aquí que incrementos en el valor de  $k_{off}$  son de valor particular a la hora de mejorar la capacidad de una HPPD para conferir resistencia a un herbicida de HPPD, mientras que, al menos en el intervalo por encima de  $5000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , los cambios en  $k_{on}$  tienen un impacto relativamente pequeño. Así, por ejemplo, los compuestos B y C presentan valores de  $K_d$  similares con respecto a la HPPD de SEC ID NO: 1, pero valores de  $k_{off}$  que son alrededor de un 10 veces diferentes con respecto a B y C. En consecuencia, las plantas transgénicas que expresan la HPPD de SEC ID NO: 1 presentan una resistencia superior al compuesto B que al compuesto C.

De este modo, se seleccionan HPPD preferidas como aquellas que, en comparación con otras enzimas HPPD, presentan tolerancia superior a uno o más tipos de herbicida de HPPD, y en las que la tolerancia se caracteriza *in vitro* mediante el valor numérico del parámetro ( $k_{off} \times k_{cat} / K_m \text{ HPP}$ ), y en las que  $k_{off}$  es la constante de velocidad que gobierna la velocidad de disociación del complejo de la enzima HPPD con el herbicida, y  $k_{cat} / K_m \text{ HPP}$  es el índice de recambio catalítico dividido entre el valor de  $K_m$  para el sustrato HPP (4-hidroxifenilpiruvato).

De este modo, se divulga un método *in vitro* para caracterizar y seleccionar las HPPD que confieren niveles superiores de tolerancia a herbicidas de HPPD basados en la medición y comparación de los valores de  $k_{cat} / K_m \text{ HPP}$  y  $k_{off}$ , o equivalentes funcionales de estos parámetros.

Se seleccionan mutaciones dirigidas al sitio de genes que codifican las HPPD para codificar cambios de aminoácidos seleccionados de aquellos enumerados aquí, ya sea individualmente o, preferiblemente, en combinación. Los genes que codifican tales formas mutantes de las HPPD son útiles para obtener plantas de cosechas resistentes a herbicidas que inhiben HPPD. Los genes de HPPD así modificados son especialmente adecuados para uso en plantas transgénicas a fin de conferir tolerancia o resistencia a herbicidas en las plantas de las cosechas. En una realización preferida, las HPPD derivan de plantas.

En la técnica se conocen muchas secuencias de HPPD, y se pueden usar para generar secuencias mutantes de HPPD haciendo sustituciones de aminoácidos que corresponden a las descritas aquí. Por ejemplo, una secuencia de HPPD conocida o sospechosa se puede inspeccionar para determinar la presencia de los motivos de aminoácidos SEC ID NOs: 15-19 y los cambios correspondientes descritos aquí realizados. Como alternativa, en el caso de las HPPD que no derivan de plantas, se pueden realizar cambios equivalentes a aquellos indicados aquí en base a alineamientos de secuencias y similitud con los motivos especificados aquí. Como alternativa, la secuencia a mejorar mediante mutación se puede alinear, por ejemplo, con SEC ID NO: 1 usando herramientas de alineamiento de secuencias estándar, y se pueden realizar las correspondientes sustituciones de aminoácidos descritas aquí con respecto a SEC ID NO: 1 en las posiciones correspondientes en la secuencia de referencia.

En realizaciones particulares, las composiciones de la invención comprenden un polipéptido de HPPD mutante que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con SEC ID NO: 2, en la que el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD, y en las que el polipéptido contiene una o más sustituciones que corresponden a las posiciones de aminoácidos enumeradas en la columna 1 de la Tabla 1.

Tabla 1. Mutaciones de HPPD ejemplares

Posición de aminoácido mutable con relación a SEC ID NO: 1	Sustitución o adición
217	A, I, L,
326	R, K, H, N, I, L, T, S, Q

339	E, D, G, C, N, Q, S, A, L
358	M, F, Y, I, A, W, V
408	R, K, H, E, D, N, Q, A, S, T
411	S, T

En diversas realizaciones, un aminoácido en una o más posiciones dados en la columna 1 se sustituye por cualquier otro aminoácido. En otra realización, el polipéptido comprende una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos que corresponden a la sustitución o sustituciones o supresión o supresiones de aminoácidos dados en la columna 2 de la Tabla 1. En aún otra realización, el polipéptido comprende una o más sustituciones que corresponden a una variante conservativa de los aminoácidos dados en la columna 2 de la Tabla 1.

Por ejemplo, el polipéptido puede comprender una mutación que corresponde a la posición del aminoácido 339 de SEC ID NO: 1, en la que el aminoácido se sustituye por un glutamato o una sustitución conservativa de glutamato.

Los términos “polipéptido”, “péptido”, y “proteína” se usan aquí de forma intercambiable para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los polipéptidos de la invención se pueden producir a partir de un ácido nucleico descrito aquí, o mediante el uso de técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, se puede producir una proteína truncada de la invención mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante de la invención en una célula hospedante apropiada, o, como alternativa, mediante una combinación de procedimientos *ex vivo*, tal como digestión con proteasas y purificación.

En consecuencia, la presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos de HPPD mutantes que tienen actividad enzimática de HPPD, y que confieren resistencia o tolerancia en plantas a ciertas clases de herbicidas que inhiben HPPD, y sus variantes y fragmentos. En general, la invención incluye cualquier secuencias polinucleotídica que codifique cualquiera de los polipéptidos de HPPD mutantes descritos aquí, así como cualquier secuencias polinucleotídica que codifique polipéptidos de HPPD que tienen una o más sustituciones conservativas de aminoácidos con relación a los polipéptidos de HPPD mutantes descritos aquí. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los cinco grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: Alifático: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I); Aromático: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); Que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C); Básico: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácido: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q).

En una realización, la presente invención proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con SEC ID NO: 2, en la que la secuencia de aminoácidos de HPPD deriva de una planta, en la que el polipéptido tiene actividad enzimática de HPPD, y en la que el polipéptido contiene una o más sustituciones, adiciones o supresiones como se discute *más abajo*.

En otra realización, la presente invención proporciona una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 54.

Como se usa aquí, “ácido nucleico” incluye la referencia a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma mono- o bicatenaria, y, excepto que se limite de otro modo, engloba análogos conocidos (*por ejemplo*, ácidos nucleicos peptídicos) que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales por cuanto se hibridan a ácidos nucleicos monocatenarios de manera similar a oligonucleótidos de origen natural.

Como se usan aquí, los términos “que codifica” o “codificado”, cuando se usan en el contexto de un ácido nucleico específico, significa que el ácido nucleico comprende la información necesaria para dirigir la traducción de la secuencia nucleotídica en una proteína específica. La información mediante la cual una proteína es codificada se especifica mediante el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (*por ejemplo*, intrones) con regiones traducidas del ácido nucleico, o puede carecer de tales secuencias no traducidas que intervienen (*por ejemplo*, como en ADNc).

La invención divulga composiciones de polinucleótidos o de proteínas aislados o purificados. Un polinucleótido o proteína “aislado” o “purificado”, o una porción biológicamente activa de los mismos, está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su entorno de origen natural. De este modo, un polinucleótido o proteína aislado o purificado está esencialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. De forma óptima, un polinucleótido “aislado” está libre de secuencias (óptimamente secuencias que codifican proteínas) que flanquean de forma natural el polinucleótido (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del que

deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el polinucleótido aislado puede contener menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencia nucleotídica que flanquea de forma natural el polinucleótido en ADN genómico de la célula de la que deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de actividades enzimáticas que interfieren, y que es capaz de ser caracterizada con respecto a sus propiedades catalíticas, cinéticas y moleculares, incluye preparaciones bastante brutas de proteína (por ejemplo producidas recombinantemente en extractos celulares) que tienen menos de alrededor de un 98%, 95%, 90%, 80%, 70 %, 60% o 50% (en peso seco) de proteína contaminante, así como preparaciones purificadas adicionalmente por métodos conocidos en la técnica para que tengan 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, o 1% (en peso seco) de proteína contaminante.

Las proteínas de la invención se pueden alterar de diversas maneras, incluyendo sustituciones, supresiones, truncamiento, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son conocidos generalmente en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes y fragmentos de secuencias de aminoácidos de las proteínas de HPPD de mutantes mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones polinucleotídicas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; patente U.S. n° 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York), y las referencias citadas allí. En el modelo de Dayhoff *et al.* (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) se puede encontrar una guía en cuanto a sustituciones apropiadas de aminoácidos que a menudo no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés. Pueden ser óptimas las sustituciones conservativas, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares.

Los polinucleótidos de la invención también se pueden usar para aislar secuencias correspondientes procedentes de otros organismos, particularmente otras plantas. De esta manera, se pueden usar métodos tales como PCR, hibridación, y similares, para identificar tales secuencias basándose en su homología de secuencia con las secuencias expuestas aquí.

En un enfoque de PCR, se pueden diseñar cebadores oligonucleotídicos para uso en reacciones de PCR para amplificar las secuencias de ADN correspondientes a partir de ADNc o ADN genómico extraído de cualquier planta de interés. Los métodos para diseñar cebadores de PCR y clonar mediante PCR son generalmente conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Véanse también Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York); Innis y Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nueva York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nueva York).

En técnicas de hibridación todo o parte de un polinucleótido conocido se usa como una sonda que se hibrida de forma selectiva a otros polinucleótidos correspondientes presentes en una población de fragmentos de ADN genómico o fragmentos de ADNc clonados (es decir, librerías genómicas o de ADNc) procedentes de un organismo escogido. Las sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN, u otros oligonucleótidos, y se pueden marcar con un grupo detectable, tal como <sup>32</sup>P, o cualquier otro marcador detectable. Los métodos para la preparación de sondas para hibridación y para construcción de librerías de ADNc y genómicas son generalmente conocidos en la técnica, y se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York).

Por “que se hibrida a” o “que se hibrida específicamente a” se refiere a la unión, formación de dúplex, o hibridación de una molécula sólo a una secuencia nucleotídica particular en condiciones restrictivas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total). “Se une(n) sustancialmente” se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana, y abarca desemparejamientos menores que se pueden arreglar reduciendo la restricción del medio de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

“Condiciones restrictivas de hibridación” y “condiciones de de hibridación y lavado restrictivas”, en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como hibridaciones Southern y Northern, dependen de las secuencias, y son diferentes bajo parámetros medioambientales diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. En Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte I capítulo 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” Elsevier, Nueva York, se encuentra una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, las condiciones de hibridación y de lavado muy restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de un 5°C menores que el punto de fusión térmica (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Típicamente, en “condiciones restrictivas” una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, pero no a otras secuencias.

La T<sub>m</sub> es la temperatura (en fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy restrictivas se seleccionan para que sean iguales a la T<sub>m</sub> para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas para la hibridación de ácidos

nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es formamida al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, llevándose a cabo la hibridación toda la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy restrictivas es 0,1 NaCl 5M a 72°C durante alrededor de un 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado con 0,2X SSC a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, *más abajo*, para una descripción del tampón de SSC). A menudo, un lavado muy restrictivo va precedido por un lavado menos restrictivo, para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de restricción media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1X SSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de baja restricción para un dúplex de, *por ejemplo*, más de 100 nucleótidos, es 4-6X SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, alrededor de un 10 a 50 nucleótidos), las condiciones restrictivas implican típicamente concentraciones de sal menores que alrededor de un 1,0 M de ion Na, típicamente alrededor de un 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente al menos alrededor de un 30°C. Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizadores, tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2X (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada, en el ensayo de hibridación particular, indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones restrictivas todavía son sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto se produce, *por ejemplo*, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración máxima del codón permitida por el código genético.

Lo siguiente son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que se pueden usar para clonar secuencias nucleotídicas que son homólogos de secuencias nucleotídicas de referencia de la presente invención: una secuencia nucleotídica de referencia se hibrida preferiblemente a la secuencia nucleotídica de referencia en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 2X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, de forma más deseable en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 1X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, todavía de forma más deseable en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 0,5X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, preferiblemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, más preferiblemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50°C con lavado en 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 65°C.

También se divulgan fragmentos y variantes de las secuencias nucleotídicas descritas y proteínas codificadas consiguientemente. "Fragmento" quiere decir una porción de la secuencia nucleotídica o una porción de la secuencia de aminoácidos, y por tanto proteína codificada consiguientemente. Los fragmentos de una secuencia nucleotídica pueden codificar fragmentos proteicos que retienen la actividad biológica de la proteína de HPPD mutante, y por tanto tienen actividad enzimática de HPPD. Como alternativa, los fragmentos de una secuencia nucleotídica que son útiles como sondas de hibridación o en reacciones de mutagénesis y barajado, para generar todavía más variantes de HPPD, generalmente no codifican proteínas de fragmentos que retienen actividad biológica. De este modo, los fragmentos de una secuencia nucleotídica pueden oscilar desde alrededor de un 20 nucleótidos, alrededor de un 50 nucleótidos, alrededor de un 100 nucleótidos, y hasta la secuencia nucleotídica de longitud completa que codifica los polipéptidos de la invención.

Un fragmento de una secuencia nucleotídica que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de HPPD mutante de la invención codificará al menos 15, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 180, 200, 250, 300, 350 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en un polipéptido de HPPD mutante de longitud completa. Los fragmentos en una secuencia nucleotídica que son útiles como sondas de hibridación o cebadores de PCR generalmente no necesitan codificar una porción biológicamente activa de una proteína de HPPD.

Como se usa aquí, "secuencia de longitud completa", en referencia a un polinucleótido específico, significa que tiene toda la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de HPPD nativa o mutada. "Secuencia nativa" quiere decir una secuencia endógena, es *decir*, una secuencia no manipulada mediante ingeniería, encontrada en un genoma del organismo.

De este modo, un fragmento de una secuencia nucleotídica de la divulgación puede codificar una porción biológicamente activa de un polipéptido de HPPD mutante, o puede ser un fragmento que se puede usar como una sonda de hibridación, etc., o cebador de PCR, usando métodos descritos más abajo. Una porción biológicamente activa de un polipéptido de HPPD mutante se puede preparar aislando una porción de una de las secuencias nucleotídicas de la invención, expresando la porción codificada de la proteína de HPPD mutante (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*), y evaluando la actividad de la porción codificada de la proteína de HPPD mutante. Las moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de una secuencia nucleotídica de la invención comprenden al menos 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, ó 1300 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia nucleotídica de longitud completa descrita aquí.

"Variantes" quiere decir secuencias sustancialmente similares. Para polinucleótidos, una variante comprende una supresión y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos con referencia al polinucleótido, y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido de HPPD mutante. Como se usa aquí, un polinucleótido o polipéptido "de referencia" comprende una secuencia nucleotídica o secuencia

de aminoácidos de HPPD mutante, respectivamente. Como se usa aquí, un polinucleótido o polipéptido “nativo” comprende una secuencia nucleotídica o secuencia de aminoácidos de origen natural, respectivamente. La persona experta en la técnica reconocerá que se pueden construir variantes de los ácidos nucleicos de la invención de manera que se mantenga el marco de lectura abierto. Para polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de HPPD mutantes de la invención. Las variantes alélicas de origen natural, tales como estas, se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se explica más abajo. Los polinucleótidos variantes también incluyen polinucleótido derivado sintéticamente, tales como aquellos generados, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio, pero que todavía codifican una proteína de HPPD mutante. Generalmente, las variantes de un polinucleótido particular de la invención tendrán una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con aquel polinucleótido particular según se determina mediante programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos aquí en otra parte.

Las variantes de un polinucleótido particular de la invención (es decir, el polinucleótido de referencia) también se pueden evaluar comparando el porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. De este modo, por ejemplo, se describe un polinucleótido que codifica un polipéptido con un porcentaje de identidad de secuencia dado con los polipéptidos SEC ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 49 y 50. El porcentaje de identidad de secuencia entre cualesquiera dos polipéptidos se puede calcular usando programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos aquí en otra parte. Cuando cualquier par dado de polinucleótidos de la invención se evalúa mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia compartido por los dos polipéptidos que ellos codifican, el porcentaje de identidad de secuencia entre los dos polipéptidos codificados es al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia a lo largo de la totalidad de las secuencias de HPPD descritas aquí.

Proteína “variante” quiere decir una proteína derivada de una proteína de referencia mediante supresión o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína de HPPD mutante, y/o mediante sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína de HPPD mutante. Las proteínas variantes englobadas por la presente invención son biológicamente activas, esto es, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína de HPPD mutante, esto es, actividad enzimática de HPPD y/o tolerancia a herbicidas como se describe aquí. Tales variantes pueden resultar de, por ejemplo, polimorfismo genético, o de manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de una proteína de HPPD mutante de la invención tendrán una identidad de secuencia de al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más a lo largo de la totalidad de la secuencia de aminoácidos para la proteína de HPPD mutante, según se determina mediante programas de alineamiento de secuencias, y parámetros descritos aquí en otra parte. Una variante biológicamente activa de una proteína de la invención puede diferir de esa proteína en tan pocos como 1-15 restos de aminoácidos, tan pocos como 1-10, tales 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso un resto de aminoácido.

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica, y se pueden lograr usando algoritmos matemáticos tales como el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; el algoritmo de alineamiento local de Smith *et al.* (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; y el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia, se pueden utilizar implementaciones computerizadas de estos algoritmos matemáticos. Tales implementaciones incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible de Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el GCG Wisconsin Genetics Software Package, Versión 10 (disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA).

#### 50 Apilamiento de genes

En ciertos aspectos, los polinucleótidos de la invención que codifican polipéptidos de HPPD nativos o mutantes, o sus variantes, que retienen actividad enzimática de HPPD (*por ejemplo*, una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 2) se pueden apilar con cualquier combinación de secuencias polinucleotídicas de interés, a fin de crear plantas con un rasgo deseado. Un rasgo, como se usa aquí, se refiere al fenotipo derivado de una secuencia particular o grupos de secuencias. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican un polipéptido de HPPD mutante o una variante del mismo, que retiene actividad enzimática de HPPD, se pueden apilar con cualesquiera otros polinucleótidos que codifican polipéptidos que confieren un rasgo deseable, incluyendo, pero sin limitarse a, resistencia a enfermedades, insectos, y herbicidas, tolerancia al calor y a la sequía, tiempo reducido para la madurez de la cosecha, procesamiento industrial mejorado, tal como para la conversión de almidón o biomasa en azúcares fermentables, y calidad agronómica mejorada, tal como contenido elevado de aceite y contenido proteico elevado.

En un aspecto particular de la divulgación, los polinucleótidos se pueden apilar (o, como alternativa, los casetes de expresión se pueden apilar en un único polinucleótido) para expresar más de un tipo de polipéptido de HPPD dentro de una planta. Esto es una ventaja particular cuando, por ejemplo, una HPPD es particularmente adecuada para proporcionar resistencia a una clase de herbicida de HPPD, mientras que la otra proporciona mejor tolerancia a una clase diferente de herbicida de HPPD. El apilamiento de polipéptidos de HPPD también es una ventaja cuando un polipéptido expresa resistencia inherente a herbicidas, pero es en cierto modo lábil. Esta HPPD resistente a herbicidas se puede estabilizar entonces en expresión mixta con, por ejemplo, HPPD similares pero menos lábiles a temperaturas, a través de la formación de dímeros enzimáticos mixtos.

5

10

15

20

25

30

35

40

Los polinucleótidos ejemplares que se pueden apilar con polinucleótidos de la invención que codifican un polipéptido de HPPD mutante, o una variante del mismo, que retiene actividad enzimática de HPPD incluyen polinucleótidos que codifican polipéptidos que confieren resistencia a plagas/patógenos, tales como virus, nemátodos, insectos u hongos, y similares. Los polinucleótidos ejemplares que se pueden apilar con polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos que codifican: polipéptidos que tienen actividad plaguicida y/o insecticida, tales como otras proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (descritas en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; y Geiser *et al.* (1986) *Gene* 48:109), lectinas (Van Damme *et al.* (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825, pentina (descrita en la patente U.S. n<sup>o</sup> 5.981.722), y similares; rasgos deseables para resistencia a enfermedades o a herbicidas (*por ejemplo*, genes de detoxificación de fumonixina (patente U.S. n<sup>o</sup> 5.792.931); genes de avirulencia y de resistencia a enfermedades (Jones *et al.* (1994) *Science* 266:789; Martin *et al.* (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos *et al.* (1994) *Cell* 78:1089); un gen que codifica una ariloxialcanoato dioxigenasa, que confiere resistencia a ciertas clases de herbicidas de auxina y de acetylCoA carboxilasa (*por ejemplo*, en las Publicaciones PCT n<sup>os</sup> WO 2008/141154, WO 2007/053482 o un gen *ttfA* que da resistencia a 2,4 D en la patente U.S. n<sup>o</sup> 6.153.401); un gen que codifica una dicamba monooxigenasa (Behrens *et al.* (2007) *Science*, 316, 1185) que confiere resistencia a dicamba; un gen que codifica una homogentisato solanesiltransferasa (HST), que confiere resistencia a herbicidas que inhiben HST (Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 2010/029311); un gen que codifica una nitrilasa, que confiere resistencia a un herbicida que contiene nitrilo (*por ejemplo*, la *bxnA* bromoxinil nitrilasa); mutantes de acetolactato sintasa (ALS), que conducen a resistencia a herbicidas, tales como las mutaciones S4 y/o Hra; resistencia a glifosato (*por ejemplo*, gen de 5-enol-pirovil-chiquimato-3-fosfato-sintasa (EPSPS), descrito en las in Patentes U.S. n<sup>os</sup> 4.940.935 y 5.188.642; o el gen de glifosato N-acetiltransferasa (GAT), descrito en Castle *et al.* (2004) *Science*, 304:1151-1154; y en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes U.S. n<sup>os</sup> 20070004912, 20050246798, y20050060767)); resistencia a glufosinato (*por ejemplo*, genes de fosfinotricin acetil transferasa PAT y BAR, descritos en las Patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.561.236 y 5.276.268); un citocromo P450 o una variante del mismo, que confiere resistencia o tolerancia a herbicidas, *entre otros*, a herbicidas de HPPD (Publicación de Solicitud de Patente U.S. n<sup>o</sup> 20090011936; Patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.380.465; 6.121.512; 5.349.127; 6.649.814; y 6.300.544; y Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 2007/000077); y rasgos deseables para el procesamiento o procesar productos tales como aceite elevado (*por ejemplo*, patente U.S. n<sup>o</sup> 6.232.529); aceites modificados (*por ejemplo*, genes de ácido graso desaturasa (patente U.S. n<sup>o</sup> 5.952.544; Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 94/11516)); almidones modificados (*por ejemplo*, ADPG pirofosforilasas (AGPasa), almidón sintasas (SS), enzimas de ramificación de almidones (SBE), y enzimas de desramificación de almidones (SDBE)); y polímeros o bioplásticos (*por ejemplo*, patente U.S. n<sup>o</sup> 5.602.321; beta-cetotiolasa, polihidroxibutirato sintasa, y acetoacetil-CoA reductasa (Schubert *et al.* (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) que facilita la expresión de polihidroxialcanoatos (PHA)).

45

De este modo, los polinucleótidos que codifican un polipéptido de HPPD nativo o mutante, o variante del mismo, que retiene actividad enzimática de HPPD, se pueden apilar con uno o más polinucleótidos que codifican polipéptidos que confieren resistencia o tolerancia a un herbicida. En un aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a un inhibidor de HPPD. En otro aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a glifosato. En otro aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a glufosinato. En aspectos adicionales, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a un herbicida inhibidor de HST, un herbicida de auxina o un herbicida de PSII.

50

55

60

Estas combinaciones apiladas se pueden crear por cualquier método, incluyendo, pero sin limitarse a, reproducción cruzada de plantas mediante cualquier metodología convencional o TopCross, o transformación genética. Si las secuencias se apilan transformando genéticamente las plantas, las secuencias polinucleotídicas de interés se pueden combinar en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, una planta transgénica que comprende uno o más rasgos deseados se puede usar como la diana para introducir rasgos adicionales mediante transformación subsiguiente. Los rasgos se pueden introducir simultáneamente en un protocolo de cotransformación con los polinucleótidos de interés proporcionados por cualquier combinación de casetes de transformación. Por ejemplo, si se introdujeran dos secuencias, las dos secuencias pueden estar contenidas en casetes de transformación (trans) separados, o pueden estar contenidas en el mismo casete de transformación (cis). La expresión de las secuencias se puede llevar a cabo por el mismo promotor, o por promotores diferentes. En ciertos casos, puede ser deseable introducir un casete de transformación que suprimirá la expresión del polipéptido de interés. Este se puede combinar con cualquier combinación de otros casetes de supresión o casetes de sobreexpresión, para generar la combinación deseada de rasgos en la planta. Se reconoce además que se pueden apilar secuencias polinucleotídicas en una localización genómica deseada usando un sistema de recombinación específica del sitio. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT n<sup>os</sup> WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855, y WO 99/25853.

**Casetes de expresión vegetales**

Las composiciones de la invención pueden contener adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos para la transformación y expresión en una planta de interés. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden estar presentes en constructos de ADN o casetes de expresión. “Casete de expresión”, como se usa aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia nucleotídica particular en una célula hospedante apropiada, que comprende un promotor enlazado operablemente a la secuencia nucleotídica de interés (es decir, un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que retiene actividad enzimática de HPPD, solo o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables) que está operablemente enlazada a señales de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia nucleotídica. La región codificante codifica habitualmente una proteína de interés, pero también codifica un ARN funcional de interés, por ejemplo ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección del sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de interés puede ser quimérico, queriendo decir que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión puede ser también uno que sea de origen natural, pero se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedante, es decir, la secuencia de ADN particular del casete de expresión no se encuentra de forma natural en la célula hospedante, y se debe de haber introducido en la célula hospedante o en un ancestro de la célula hospedante mediante un suceso de transformación. La expresión de la secuencia nucleotídica en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo, o de un promotor inducible, que inicia la transcripción sólo cuando la célula hospedante se expone a cierto estímulo externo particular. Adicionalmente, el promotor puede ser también específico de un tejido u órgano o etapa de desarrollo particular.

La presente invención engloba la transformación de plantas con casetes de expresión capaces de expresar un polinucleótido de interés, es decir, un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que retiene actividad enzimática de HPPD, solo o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación transcripcional y traduccional (es decir, un promotor) y un marco de lectura abierto polinucleotídico. El casete de expresión puede comprender opcionalmente una región de terminación transcripcional y traduccional (es decir, región de terminación) funcional en plantas. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende un gen marcador seleccionable, para permitir la selección de transformantes estables. Los constructos de expresión de la invención pueden comprender también una secuencia líder, y/o una secuencia que permite la expresión inducible del polinucleótido de interés. Véase Guo *et al.* (2003) *Plant J.* 34:383-92 y Chen *et al.* (2003) *Plant J.* 36:731-40, para ejemplos de secuencias que permiten la expresión inducible.

Las secuencias reguladoras del constructo de expresión están enlazadas operablemente al polinucleótido de interés. Por “enlazadas operablemente” se quiere decir un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la segunda secuencia inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN que corresponde a la segunda secuencia. Generalmente, operablemente enlazadas significa que las secuencias nucleotídicas que se enlazan son contiguas.

En la práctica de la invención se puede usar cualquier promotor capaz de dirigir la expresión en la planta de interés. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo al hospedante vegetal. Los términos “heterólogo” y “exógeno”, cuando se usan aquí, se refieren a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo una secuencia de ADN o ARN) o un gen, se refieren a una secuencia que se origina de una fuente extraña a la célula hospedante particular, o, si procede de la misma fuente, está modificada de su forma original. De este modo, un gen heterólogo en una célula hospedante incluye un gen que es endógeno a la célula hospedante particular, pero que se ha modificado, por ejemplo, mediante el uso de barajado de ADN. Los términos también incluyen múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. De este modo, los términos se refieren a un fragmento de ADN que es extraño o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedante en la que el elemento no se encuentra normalmente. Los segmentos de ADN exógenos se expresan para producir polipéptidos exógenos.

Una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) “homóloga” es una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) asociada de forma natural con una célula hospedante en la que se introduce.

La elección de los promotores a incluir depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, eficiencia, selectibilidad, inducibilidad, nivel de expresión deseado, y expresión preferencial por células o tejidos. Es una materia normal para un experto en la técnica modular la expresión de una secuencia seleccionando y colocando apropiadamente promotores y otras regiones reguladoras con relación a esa secuencia. Los promotores que se usan para la expresión del transgén o transgenes pueden ser un promotor vegetal fuerte, un promotor vírico, o promotores quiméricos compuestos de elementos tales como: la caja TATA de cualquier gen (o cajas TATA sintéticas, basadas en el análisis del gen de la planta), opcionalmente fusionado a la región 5' a la caja TATA de promotores vegetales (que dirigen la expresión génica en tejidos y temporalmente apropiada), opcionalmente

fusionado a uno o más potenciadores (tales como el potenciador 35S, el potenciador FMV, el potenciador CMP, el potenciador de la SUBUNIDAD PEQUEÑA DE RUBISCO, el potenciador de PLASTOCYANINA).

Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, por ejemplo, el promotor central del promotor Rsyn7, y otros promotores constitutivos descritos en el documento WO 99/43838 y en la patente U.S. nº 6.072.050; el promotor CaMV 35S central (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632; y Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); el promotor de ALS (patente U.S. nº 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos se incluyen en, por ejemplo, las Patentes U.S. nºs 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

Los promotores vegetales o quiméricos apropiados son útiles para aplicaciones tales como la expresión de transgenes en ciertos tejidos, mientras que minimizan la expresión en otros tejidos, tales como semillas, o tejidos reproductivos. Los promotores de tipo celular o preferencialmente tisulares ejemplares conducen la expresión preferentemente en el tejido diana, pero también pueden igualmente conducir a cierta expresión en otros tipos celulares o tejidos. Los métodos para identificar y caracterizar regiones promotoras en ADN genómico vegetal incluyen, por ejemplo, los descritos en las siguientes referencias: Jordano, *et al.*, *Plant Cell*, 1:855-866 (1989); Bustos, *et al.*, *Plant Cell*, 1:839-854 (1989); Green, *et al.*, *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier, *et al.*, *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); y Zhang, *et al.*, *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996).

En otros aspectos de la presente divulgación, se pueden desear promotores inducibles. Los promotores inducibles llevan a cabo la transcripción en respuesta a estímulos externos, tales como agentes químicos, o estímulos medioambientales. Por ejemplo, los promotores inducibles pueden conferir transcripción en respuesta a hormonas tales como ácido giberélico o etileno, o en respuesta a la luz o a la sequía.

Existe una variedad de terminadores transcripcionales para uso en casetes de expresión. Son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transgén, y la poliadenilación de ARNm correcta. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés operablemente enlazada, puede ser nativa con el hospedante vegetal, o puede derivar de otra fuente (*es decir* extraña o heteróloga al promotor, a la secuencia de ADN de interés, al hospedante vegetal, o a cualquier combinación de los mismos). Los terminadores transcripcionales apropiados son aquellos que se sabe que funcionan en plantas, e incluyen el terminador CAMV 35S, el terminador tml, el terminador de nopalina sintasa, y el terminador rbcS E9 del guisante. Estos se pueden usar tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Además, se puede usar un terminador de la transcripción nativo del gen.

Generalmente, el casete de expresión comprenderá un gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de células o tejidos transformados.

Se han encontrado numerosas secuencias para potenciar la expresión génica a partir de la unidad transcripcional, y estas secuencias se pueden usar conjuntamente con los genes de esta invención para incrementar su expresión en plantas transgénicas.

Se ha demostrado que diversas secuencias intrónicas potencian la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Por ejemplo, se ha encontrado que los intrones del gen *Adhl* del maíz potencian significativamente la expresión del gen de tipo salvaje bajo su promotor cognato cuando se introducen en células de maíz. Se encontró que el intrón 1 es particularmente efectivo y que potenció la expresión en constructos de fusión con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Callis *et al. Genes Develop.* 1:1183-1200 (1987)). En el mismo sistema experimental, el intrón del gen *brn1* del maíz tiene un efecto similar potenciando la expresión. Las secuencias intrónicas se han incorporado de forma habitual en vectores de transformación de plantas, típicamente en el líder no traducido.

También se sabe que un número de secuencias líder no traducidas, derivadas de virus, potencian la expresión, y estas son particularmente efectivas en células dicotiledóneas. Específicamente, se ha demostrado que las secuencias líder del virus del mosaico del tabaco (TMV, la "secuencia W"), el virus del moteado clorótico del maíz (MCMV), y el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), son efectivas potenciando la expresión (*por ejemplo*, Gallie *et al. Nucl. Acids Res.* 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski *et al. Plant Molec. Biol.* 15: 65-79 (1990)). Otras secuencias líder conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a: líderes de picomavirus, por ejemplo líder de EMCV (región no codificante de 5' de encefalomiocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T. R., y Moss, B. *PNAS USA* 86:6126-6130 (1989)); los líderes de potivirus, por ejemplo el líder del virus del jaspeado del tabaco (TEV) (Allison *et al.* 1986); el líder del virus del mosaico del enanismo maíz (MDMV); *Virology* 154:9-20); el líder de la proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak, D. G., y Samow, P., *Nature* 353: 90-94 (1991)); el líder no traducido procedente del ARNm de proteína de revestimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4) (Jobling, S. A., y Gehrke, L., *Nature* 325:622-625 (1987)); el líder del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Gallie, D. R. *et al., Molecular Biology of RNA*, 237-256 (1989)); y el líder del virus moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel, S. A. *et al., Virology* 81:382-385 (1991). Véase también, Della-Cioppa *et al., Plant Physiology* 84:965-968 (1987).

En la presente invención también se divulgan constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más de los casetes de expresión descritos anteriormente. El constructo puede ser un vector, tal como un vector de transformación vegetal. En un aspecto, el vector es un vector de transformación vegetal que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID NO: 51 o SEC ID NO: 52.

## 5 Plantas

Como se usa aquí, la expresión “parte vegetal” o “tejido vegetal” incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales a partir de los cuales se pueden generar plantas, callos vegetales, racimos vegetales, y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, fruta, pepitas, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, puntas de raíces, anteras, y similares. Las expresiones mencionadas anteriormente incluyen productos vegetales, tales como grano, frutos, y nueces.

Las plantas útiles en la presente invención incluyen plantas que son transgénicas para al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que retiene actividad enzimática de HPPD, solo o en combinación con una o más moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. El tipo de planta seleccionada depende de una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, el uso aguas abajo del material vegetal cosechado, la susceptibilidad de la especie vegetal a la transformación, y las condiciones en las que se harán crecer, se cosecharán, y/o se procesarán las plantas. Un experto reconocerá además que factores adicionales para seleccionar variedades vegetales apropiadas para uso en la presente invención incluyen elevado potencial de rendimiento, buena fortaleza del tallo, resistencia a enfermedades específicas, tolerancia a la sequía, secado rápido, y suficiente calidad de grano para permitir el almacenamiento y el envío al mercado con pérdida mínima.

Las plantas según la presente invención incluyen cualquier planta que se cultive con el fin de producir material vegetal que es buscado por el hombre o animal para el consumo oral, o para la utilización en un proceso industrial, farmacéutico, o comercial. La invención se puede aplicar a cualquiera de una variedad de plantas, incluyendo, pero sin limitarse a, maíz, trigo, arroz, cebada, haba de soja, algodón, sorgo, habas en general, colza/cánola, alfalfa, lino, girasol, alazor, mijo, centeno, caña de azúcar, remolacha azucarera, cacao, té, Brassica, algodón, café, batata, lino, cacahuete, clavo; vegetales tales como lechuga, tomate, cucurbitáceas, casabe, patata, zanahoria, rábano, guisante, lentejas, repollo, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, pimientos, y piña; frutas de árboles tales como limón, manzanas, peras, melocotones, albaricoques, nueces, aguacate, plátano, y coco, y flores tales como orquídeas, claveles y rosas. Otras plantas útiles en la práctica de la invención incluyen pastos perennes, tales como pasto varilla, pastos de las praderas, pasto de la India, pasto de tallo azul gigante, y similares. Se reconoce que se pueden usar mezclas de plantas.

Además, el término “cosechas” se ha de entender también que incluye cosechas que se han hecho tolerantes a herbicidas o clases de herbicidas (tales como, por ejemplo, inhibidores de ALS, por ejemplo primisulfurón, prosulfurón y trifloxisulfurón, inhibidores de EPSPS (5-enol-pirovil-chiquimato-3-fosfato-sintasa), inhibidores de GS (glutamina sintetasa)) como resultado de métodos convencionales de reproducción o manipulación genética mediante ingeniería. Los ejemplos de cosechas que se han hecho tolerantes a herbicidas o clases de herbicidas mediante métodos de manipulación genética mediante ingeniería incluyen variedades de cosechas resistentes a glifosato y a glufosinato, comercialmente disponibles con los nombres comerciales RoundupReady® y LibertyLink®. El método según la presente invención es especialmente adecuado para la protección de cosechas de haba de soja que también se han hecho tolerantes a glifosato y/o glufosinato, y en las que se usan herbicidas de HPPD en un programa de control de malas hierbas junto con otros de tales herbicidas (glufosinato y/o glifosato) para el control de malas hierbas.

Se contempla además que los constructos divulgados se pueden introducir en variedades vegetales que tienen propiedades mejoradas adecuadas u óptimas para un uso aguas abajo particular. Por ejemplo, la variabilidad genética de origen natural da como resultado plantas con resistencia o tolerancia a inhibidores de HPPD u otros herbicidas, y tales plantas son también útiles en los métodos divulgados. El método según la presente divulgación se puede optimizar además cruzando los transgenes que proporcionan un nivel de tolerancia con variedades de cultivo de haba de soja que muestran un nivel mejorado de tolerancia a inhibidores de HPPD que se encuentra en un pequeño porcentaje de líneas de haba de soja.

## Transformación vegetal

Una vez que se ha clonado en un sistema de expresión un polinucleótido de HPPD mutante resistente o tolerante a herbicidas, solo o en combinación con una o más moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables, se transforma en una célula vegetal. Los casetes de expresión de la invención se pueden introducir en la célula vegetal de muchas maneras reconocidas en la técnica. El término “introducir”, en el contexto de un polinucleótido, por ejemplo un constructo nucleotídico de interés, quiere decir presentar a la planta el polinucleótido de manera que el polinucleótido gane acceso al interior de una célula de la planta. Cuando se va a introducir más de un polinucleótido, estos polinucleótidos se pueden ensamblar como parte de un único constructo nucleotídico, o como constructos nucleotídicos separados, y se pueden localizar en los mismos vectores de transformación o en diferentes vectores de transformación. En

consecuencia, estos polinucleótidos se pueden introducir en la célula hospedante de interés en un suceso de transformación individual, en sucesos de transformación separados, o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de reproducción. Los métodos de la invención no dependen del método particular para introducir uno o más polinucleótidos en una planta, sólo que el polinucleótido o polinucleótidos ganen acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducir polinucleótidos en plantas son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de transformación transitoria, métodos de transformación estable, y métodos mediados por virus.

“Transformación transitoria”, en el contexto de un polinucleótido, quiere decir que se introduce un polinucleótido en la planta y no se integra en el genoma de la planta.

Por “introducir de forma estable” o “introducido de forma estable”, en el contexto de un polinucleótido introducido en una planta, se quiere decir que el polinucleótido introducido se incorpora de forma estable en el genoma de la planta, y de este modo la planta se transforma de forma estable con el polinucleótido.

“Transformación estable” o “transformado de forma estable” quiere decir que un polinucleótido, por ejemplo un constructo nucleotídico descrito aquí, introducido en una planta, se integra en el genoma de la planta y es capaz de ser heredado por la progenie de la misma, más particularmente por la progenie de múltiples generaciones sucesivas.

Aquellos de pericia normal en las técnicas de transformación vegetal conocen numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación vegetal, y se pueden usar los genes pertinentes a esta invención conjuntamente con cualquiera de tales vectores. La selección del vector dependerá de la técnica de transformación preferida y de la especie diana para la transformación. Para ciertas especies diana, se pueden preferir diferentes marcadores de selección de antibióticos o de herbicidas. Los marcadores de selección usados habitualmente en transformación incluyen el gen *nptII*, que confiere resistencia a canamicina y antibióticos relacionados (Messing y Vierra *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan *et al.*, *Nature* 304:184-187 (1983)), los genes *pat* y *bar*, que confieren resistencia al herbicida glufosinato (también denominado fosfotricina; véanse White *et al.*, *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer *et al. Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990) y las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.561.236 y 5.276.268), el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger y Diggelmann, *Mol. Cell Biol.* 4: 2929-2931), y el gen de *dhfr*, que confiere resistencia a metatrexato (Bourouis *et al.*, *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), el gen de EPSPS, que confiere resistencia a glifosato (patentes U.S. n<sup>os</sup> 4.940.935 y 5.188.642), el gen de glifosato N-acetiltransferasa (GAT), que también confiere resistencia a glifosato (Castle *et al.* (2004) *Science*, 304:1151-1154; Pub. Sol. de patentes U.S. n<sup>os</sup> 20070004912, 20050246798, y 20050060767); y el gen de manosa-6-fosfato isomerasa, que proporciona la capacidad para metabolizar manosa (patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.767.378 y 5.994.629). Como alternativa, y en una realización preferida, el gen de HPPD de la actual invención se usa él mismo, como el marcador seleccionable, en combinación con el uso de un herbicida de HPPD como agente de selección.

Los métodos para la regeneración de plantas también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han utilizado vectores plasmídicos Ti para el suministro de ADN extraño, así como la captación directa de ADN, liposomas, electroporación, microinyección, y microproyectiles. Además, se pueden utilizar bacterias del género *Agrobacterium* para transformar células vegetales. A continuación se dan descripciones de técnicas representativas para transformar plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, así como una técnica de transformación de plástidos representativa.

Muchos vectores están disponibles para la transformación usando *Agrobacterium tumefaciens*. Estos poseen típicamente al menos una secuencia frontera de T-DNA, e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984)). Para la construcción de vectores útiles en la transformación con *Agrobacterium*, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. n<sup>o</sup> 2006/0260011.

La transformación sin el uso de *Agrobacterium tumefaciens* soslaya la necesidad de secuencias de T-DNA en el vector de transformación escogido, y en consecuencia se pueden utilizar vectores que carecen de estas secuencias, además de vectores tales como aquellos descritos anteriormente que contienen las secuencias de T-DNA. Las técnicas de transformación que no se basan en *Agrobacterium* incluyen la transformación vía bombardeo con partículas, captación de protoplastos (*por ejemplo*, PEG y electroporación) y microinyección. La elección del vector depende enormemente de la selección preferida para la especie que se transforma. Para la construcción de tales vectores, véase, *por ejemplo*, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. n<sup>o</sup> 20060260011.

Para la expresión de una secuencia nucleotídica de la presente invención en plástidos vegetales, se usa el vector de transformación de plástidos pPH143 (véase la Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 97/32011, Ejemplo 36). La secuencia nucleotídica se inserta en pPH143, sustituyendo de ese modo la secuencia codificante de PROTOX. Este vector se usa entonces para la transformación plástidica y la selección de transformantes para resistencia a espectinomicina. Como alternativa, la secuencia nucleotídica se inserta en pPH143, de forma que sustituye al gen *aadH*. En este caso, los transformantes se seleccionan para resistencia a inhibidores de PROTOX.

Las técnicas de transformación para dicotiledóneas son bien conocidas en la técnica, e incluyen técnicas a base de *Agrobacterium* y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas sin *Agrobacterium* implican la captación de material genético exógeno directamente por los protoplastos o células. Esto se puede lograr

mediante captación mediada por PEG o por electroporación, suministro mediado por bombardeo con partículas, o microinyección. Los ejemplos de estas técnicas se describen por Paszkowski *et al.* *EMBO J.* 3:2717-2722 (1984); Potrykus *et al.* *Mol. Gen. Genet.* 199:169-177 (1985); Reich *et al.* *Biotechnology* 4:1001-1004 (1986); y Klein *et al.* *Nature* 327:70-73 (1987). En cada caso, las células transformadas se regeneran en plantas completas usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica preferida para la transformación de dicotiledóneas, debido a su elevada eficiencia de transformación y a su amplia utilidad con muchas especies diferentes. La transformación mediada por *Agrobacterium* implica típicamente la transferencia del vector binario que posee el ADN extraño de interés (*por ejemplo*, pCIB200 o pCIB2001) a una cepa de *Agrobacterium* apropiada, que puede depender del complemento de genes *vir* portados por la cepa hospedante de *Agrobacterium* en un plásmido Ti corresidente, o cromosómicamente (*por ejemplo*, cepa CIB542 para pCIB200 y pCIB2001 (Uknes *et al.* *Plant Cell* 5:159-169 (1993)). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* se logra mediante un procedimiento de emparejamiento triparental usando *E. coli* que posee el vector binario recombinante, una cepa de *E. coli* auxiliar que posee un plásmido tal como pRK2013 y que es capaz de movilizar el vector binario recombinante a la cepa diana de *Agrobacterium*. Como alternativa, el vector binario recombinante se puede transferir a *Agrobacterium* mediante transformación con ADN (Hofgen y Willmitzer *Nucl. Acids Res.* 16: 9877 (1988)).

La transformación de la especie vegetal diana mediante *Agrobacterium* recombinante implica habitualmente el cocultivo de la *Agrobacterium* con explantes procedentes de la planta, y siguiendo protocolos bien conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera en medio seleccionable que posee el marcador de resistencia a antibióticos o a herbicidas presente entre las fronteras de T-DNA del plásmido binario.

Otro enfoque para transformar células vegetales con un gen implica propulsar partículas inertes o biológicamente activas en los tejidos y células vegetales. Esta técnica se describe en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 4.945.050, 5.036.006, y 5.100.792, todas de Sanford *et al.* Generalmente, este procedimiento implica impulsar partículas inertes o biológicamente activas en las células en condiciones efectivas para penetrar la superficie exterior de la célula y producir la incorporación en el interior de la misma. Cuando se utilizan partículas inertes, el vector se puede introducir en la célula revistiendo las partículas con el vector que contiene el gen deseado. Como alternativa, la célula diana puede estar rodeada por el vector, de manera que el vector es portado en la célula por la estela de la partícula. Las partículas biológicamente activas (*por ejemplo*, células de levadura secas, bacteria seca o un bacteriófago, conteniendo cada uno ADN que se busca introducir) también pueden ser propulsadas en un tejido de célula vegetales.

La transformación de la mayoría de las especies de monocotiledóneas se ha convertido ahora también en algo normal. Las técnicas preferidas incluyen la transferencia génica directa en protoplastos usando técnicas mediante PEG o electroporación, y bombardeo con partículas en el tejido del callo. Las transformaciones se pueden llevar a cabo con una única especie de ADN, o con múltiples especies de ADN (es decir, cotransformación), y estas dos técnicas son adecuadas para uso con esta invención. La cotransformación puede tener la ventaja de evitar la construcción completa del vector, y de generar plantas transgénicas con loci sin enlazar para el gen de interés y el marcador seleccionable, permitiendo la eliminación del marcador seleccionable en generaciones subsiguientes, considerándose esto deseable. Sin embargo, una desventaja del uso de la cotransformación es la frecuencia menor de 100% con la que la especie de ADN separada se integra en el genoma (Schocher *et al.* *Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)).

Las patentes europeas EP 0292435, EP 0392225, y la Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 93/07278, describen técnicas para la preparación de callo y protoplastos a partir de una línea consanguínea de élite de maíz, la transformación de los protoplastos usando PEG o electroporación, y la regeneración de plantas de maíz a partir de protoplastos transformados. Gordon-Kamm *et al.* (*Plant Cell* 2: 603-618 (1990)) y Fromm *et al.* (*Biotechnology* 8: 833-839 (1990)) han publicado técnicas para la transformación de la estirpe del maíz derivada de A188 usando bombardeo con partículas. Además, el documento la Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 93/07278 y Koziel *et al.* (*Biotechnology* 11:194-200 (1993)) describen técnicas para la transformación de estirpes consanguíneas de élite de maíz mediante bombardeo con partículas. Esta técnica utiliza embriones inmaduros de maíz de una longitud de 1,5-2,5 mm, cortados de una mazorca de maíz 14-15 días después de la polinización, y un dispositivo PDS-1000He Biolistics para el bombardeo.

La transformación de arroz también se puede llevar a cabo mediante técnicas de transferencia génica directa utilizando protoplastos o bombardeo con partículas. Las transformaciones mediadas por protoplastos se han descrito para los tipos Japonica e Índica (Zhang *et al.* *Plant Cell Rep* 7: 379-384 (1988); Shimamoto *et al.* *Nature* 338:274-277 (1989); y Datta *et al.* *Biotechnology* 8:736-740 (1990)). Ambos tipos también son transformables de forma habitual usando bombardeo con partículas (Christou *et al.* *Biotechnology* 9:957-962 (1991)). Además, la Publicación PCT n<sup>o</sup> WO 93/21335 describe técnicas para la transformación de arroz vía electroporación.

La patente europea EP 0332581 describe técnicas para la generación, transformación, y regeneración de protoplastos de Pooideae. Estas técnicas permiten la transformación de *Dactylis* y trigo. Además, la transformación del trigo se ha descrito por Vasil *et al.* (*Biotechnology* 10:667-674 (1992)) usando bombardeo con partículas en células de callo regenerable a largo plazo tipo C, y también por Vasil *et al.* (*Biotechnology* 11:1553-

1558 (1993)) y Weeks *et al.* (*Plant Physiol.* 102:1077-1084 (1993)) usando bombardeo con partículas de embriones inmaduros y callo derivado de embriones inmaduros. Sin embargo, una técnica preferida para la transformación de trigo implica la transformación de trigo mediante bombardeo con partículas de embriones inmaduros, e incluye una etapa con alto contenido de sacarosa o una etapa con alto contenido de maltosa antes del suministro génico. Antes del bombardeo, se colocan en placas cualquier número de embriones (0,75-1 mm de longitud) en medio MS con 3% de sacarosa (Murashiga y Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962)) y 3 mg/l de 2,4-D para la inducción de embriones somáticos, que se deja transcurrir en la oscuridad. En el día escogido del bombardeo, los embriones se retiran del medio de inducción y se colocan en el osmótico (es decir, medio de inducción con sacarosa o maltosa añadida a la concentración deseada, típicamente 15%). Los embriones se dejan plasmolizar durante 2-3 horas y después son bombardeados. Veinte embriones por placa diana son típicos, aunque no críticos. Un plásmido que posee el gen apropiado (tal como pCIB3064 o pSOG35) se hace precipitar sobre partículas de oro de tamaño micrométrico usando procedimientos estándar. Cada placa de embriones es disparada con el dispositivo de helio DuPont BIOLISTICS® usando una presión de estallido de alrededor de un 1000 psi usando un tamiz de malla 80 estándar. Tras el bombardeo, los embriones se colocan nuevamente en la oscuridad para que se recuperen durante alrededor de un 24 horas (todavía en osmótico). Después de 24 h, los embriones se retiran del osmótico y se colocan nuevamente en medio de inducción, en el que permanecen durante alrededor de un mes antes de la regeneración. Aproximadamente un mes después, los explantes embrionarios con callo embriogénico en desarrollo se transfieren a medio de regeneración (MS+1 mg/l NAA, 5 mg/l GA), que contiene además el agente de selección apropiado (10 mg/l basta en el caso de pCIB3064, y 2 mg/l de metotrexato en el caso de pSOG35). Después de aproximadamente un mes, los retoños desarrollados se transfieren a recipientes estériles más grandes conocidos como "GA7", que contienen MS de fuerza media, 2% de sacarosa, y la misma concentración de agente de selección.

También se ha descrito la transformación de monocotiledóneas usando *Agrobacterium*. Véanse, la publicación PCT nº WO 94/00977 y la patente U.S. nº 5.591.616, y Negrotto *et al.* *Plant Cell Reports* 19:798-803 (2000). Por ejemplo, se puede usar arroz (*Oryza sativa*) para generar plantas transgénicas. Se pueden usar diversas variedades de cultivo del arroz (Hiei *et al.*, 1994, *Plant Journal* 6:271-282; Dong *et al.*, 1996, *Molecular Breeding* 2:267-276; y Hiei *et al.*, 1997, *Plant Molecular Biology* 35:205-218). También, los diversos constituyentes de los medios descritos más abajo se pueden variar en cantidad o se pueden sustituir. Las respuestas embriogénicas se inician y/o los cultivos se establecen a partir de embriones maduros cultivando en medio MS-CIM (sales basales de MS, 4,3 g/l; vitaminas B5 (200X), 5 ml/l; sacarosa, 30 g/l; prolina, 500 mg/l; glutamina, 500 mg/l; hidrolizado de caseína, 300 mg/l; 2,4-D (1 mg/ml), 2 ml/l; ajustar pH hasta 5,8 con KOH 1 N; Phytigel, 3 g/l). Tanto los embriones maduros en las etapas iniciales de respuesta del cultivo o las estirpes del cultivo establecidas se inoculan y cocultivan con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*) que contiene la construcción vectorial deseada. *Agrobacterium* se cultiva a partir de lotes de glicerol sobre medio YPC sólido (100 mg/l de espectinomicina y cualquier otro antibiótico apropiado) durante alrededor de un 2 días a 28°C. *Agrobacterium* se resuspende en medio MS-CIM líquido. El cultivo de *Agrobacterium* se diluye hasta una OD<sup>600</sup> de 0,2-0,3, y se añade acetosiringona hasta una concentración final de 200 µM. La acetosiringona se añade antes de mezclar la disolución con los cultivos de arroz para inducir al *Agrobacterium* para la transferencia de ADN a las células vegetales. Para la inoculación, los cultivos vegetales se sumergen en la suspensión bacteriana. La suspensión bacteriana líquida se retira y los cultivos inoculados se colocan en medio de cocultivo y se incuban a 22°C durante dos días. Los cultivos se transfieren entonces a medio MS-CIM con ticarcilina (400 mg/l) para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium*. Para los constructos que utilizan el gen marcador seleccionable de PMI (Reed *et al.* *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:127-132), los cultivos se transfieren a medio de selección que contiene manosa como fuente de hidratos de carbono (MS con 2% de manosa, 300 mg/l de ticarcilina) después de 7 días, y se cultivan durante 3-4 semanas en la oscuridad. Las colonias resistentes se transfieren entonces para la regeneración en medio de inducción (MS sin 2,4-D, 0,5 mg/litro de IAA, 1 mg/l de zeatina, 200 mg/l de timentina, 2% de manosa y 3% de sorbitol) y se hacen crecer en la oscuridad durante 14 días. Las colonias que proliferan se transfieren entonces a otra ronda de medio de inducción de regeneración y se mueven a la habitación de crecimiento iluminada. Los brotes regenerados se transfieren a recipientes GA7 con medio GA7-1 (MS sin hormonas y con 2% de sorbitol) durante 2 semanas, y después se mueven al invernadero donde son suficientemente grandes y tienen raíces adecuadas. Las plantas se transplantan al suelo en el invernadero (generación T<sub>0</sub>), se hacen crecer hasta la madurez, y la semilla T<sub>1</sub> se cosecha.

Las plantas obtenidas vía transformación con una secuencia de ácido nucleico de interés en la presente invención pueden ser cualquiera de una amplia variedad de especies vegetales, incluyendo aquellas monocotiledóneas y dicotiledóneas; sin embargo, las plantas usadas en el método de la invención se seleccionan preferiblemente de la lista de cosechas diana agrónomicamente importantes expuestas aquí en otra parte. La expresión de un gen de la presente invención, en combinación con otras características importantes para la producción y calidad, se pueden incorporar en estirpes vegetales a través de reproducción. Los enfoques y técnicas de reproducción son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Welsh, *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley and Sons, NY (1981); *Crop Breeding*, Wood D.R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Segunda Edición, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*, Springer-Verlag, NY (1986); y Wricke y Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*, Walter de Gruyter and Co., Berlín (1986).

Para la transformación de plástidos, se hacen germinar semillas de *Nicotiana tabacum* c.v. "Xanthiense", siete por placa, en una disposición circular de 1" en un medio de agar T, y 12-14 días después de sembrar se bombardean con partículas de volframio de 1 µm (M10, Biorad, Hercules, Calif.) revestidas con ADN procedente de los plásmidos pPH143 y pPH145, esencialmente como se describe (Svab, Z. y Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). Las plántulas bombardeadas se incuban en medio T durante dos días, después de lo cual se cortan las hojas y se colocan con el lado abaxial hacia arriba en luz brillante (350-500 µmoles de fotones/m<sup>2</sup>/s) en placas de medio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) que contiene 500 µg/ml de dihidrocloruro de espectinomicina (Sigma, St. Louis, MO). Los brotes resistentes que aparecen por debajo de las hojas cloróticas, tres a ocho semanas después del bombardeo, se subclonan en el mismo medio selectivo, se deja que se forme callo, y los brotes secundarios se aíslan y se subclonan. La segregación completa de copias genómicas de plástidos transformados (homoplasmicidad) en subclones independientes se evalúa mediante técnicas estándar de transferencia Southern (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). Se separa ADN celular total digerido con BamHI/EcoRI (Mettler, I. J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346349) en geles de agarosa con 1% de Tris-borato (TBE), se transfiere a membranas de nailon (Amersham), y se sonda con secuencias de ADN cebadas al azar marcadas con <sup>32</sup>P que corresponden a un fragmento de ADN de BamHI/HindIII de 0,7 kb procedente de pC8 que contiene una porción de la secuencia que selecciona plástidos rps7/12. Los brotes homoplásmicos se enraízan asépticamente en medio MS/IBA que contiene espectinomicina (McBride, K. E. et al. (1994) PNAS 91, 7301-7305), y se transfieren al invernadero.

Las propiedades genéticas manipuladas mediante ingeniería en las semillas y plantas transgénicas descritas anteriormente se perpetúan mediante reproducción sexual o crecimiento vegetativo, y de este modo se pueden mantener y propagar en las plantas de la progenie. Generalmente, el mantenimiento y la propagación hacen uso de métodos agrícolas conocidos, desarrollados para satisfacer fines específicos tales como el arado, la siembra o el cosechado.

El uso de las propiedades genéticas ventajosas de las plantas y semillas transgénicas según la invención se puede hacer adicionalmente en la reproducción vegetal. Dependiendo de las propiedades deseadas, se toman diferentes medidas de reproducción. Las técnicas pertinentes son bien conocidas en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, hibridación, reproducción endogámica, reproducción por retrocruzamiento, reproducción de múltiples líneas, mezcla de variedades, hibridación interespecífica, técnicas aneuploides, etc. De este modo, las semillas y plantas transgénicas según la invención se pueden usar para la reproducción de líneas vegetales mejoradas que, por ejemplo, incrementan la efectividad de métodos convencionales, tales como el tratamiento con herbicidas o plaguicidas, o permiten dispensarlos con dichos métodos debido a sus propiedades genéticas modificadas.

Muchos métodos adecuados para la transformación que usan marcadores de selección adecuados, tales como canamicina, vectores binarios tales como procedentes de *Agrobacterium*, y regeneración de plantas, como, por ejemplo, procedentes de discos de hojas de tabaco, son bien conocidos en la técnica. Opcionalmente, igualmente una población de control vegetal se transforma con un polinucleótido que expresa la HPPD de control. Como alternativa, una planta dicotiledónea no transformada, tal como *Arabidopsis* o tabaco, se puede usar como un control, puesto que, en este caso, expresa su propia HPPD endógena.

#### 40 Resistencia a herbicidas

La presente invención proporciona plantas, células vegetales, tejidos y semillas transgénicas que se han transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica una HPPD mutante o variante de la misma que confiere resistencia o tolerancia a herbicidas, sola o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables.

En un aspecto, las plantas transgénicas de la invención presentan resistencia o tolerancia a la aplicación de herbicida en una cantidad desde alrededor de un 5 hasta alrededor de un 2,000 gramos por hectárea (g/ha), incluyendo, por ejemplo, alrededor de un 5 g/ha, alrededor de un 10 g/ha, alrededor de un 15 g/ha, alrededor de un 20 g/ha, alrededor de un 25 g/ha, alrededor de un 30 g/ha, alrededor de un 35 g/ha, alrededor de un 40 g/ha, alrededor de un 45 g/ha, alrededor de un 50 g/ha, alrededor de un 55 g/ha, alrededor de un 60 g/ha, alrededor de un 65 g/ha, alrededor de un 70 g/ha, alrededor de un 75 g/ha, alrededor de un 80 g/ha, alrededor de un 85 g/ha, alrededor de un 90 g/ha, alrededor de un 95 g/ha, alrededor de un 100 g/ha, alrededor de un 110 g/ha, alrededor de un 120 g/ha, alrededor de un 130 g/ha, alrededor de un 140 g/ha, alrededor de un 150 g/ha, alrededor de un 160 g/ha, alrededor de un 170 g/ha, alrededor de un 180 g/ha, alrededor de un 190 g/ha, alrededor de un 200 g/ha, alrededor de un 210 g/ha, alrededor de un 220 g/ha, alrededor de un 230 g/ha, alrededor de un 240 g/ha, alrededor de un 250 g/ha, alrededor de un 260 g/ha, alrededor de un 270 g/ha, alrededor de un 280 g/ha, alrededor de un 290 g/ha, alrededor de un 300 g/ha, alrededor de un 310 g/ha, alrededor de un 320 g/ha, alrededor de un 330 g/ha, alrededor de un 340 g/ha, alrededor de un 350 g/ha, alrededor de un 360 g/ha, alrededor de un 370 g/ha, alrededor de un 380 g/ha, alrededor de un 390 g/ha, alrededor de un 400 g/ha, alrededor de un 410 g/ha, alrededor de un 420 g/ha, alrededor de un 430 g/ha, alrededor de un 440 g/ha, alrededor de un 450 g/ha, alrededor de un 460 g/ha, alrededor de un 470 g/ha, alrededor de un 480 g/ha, alrededor de un 490 g/ha, alrededor de un 500 g/ha, alrededor de un 510 g/ha, alrededor de un 520 g/ha, alrededor de un 530 g/ha, alrededor de un 540 g/ha, alrededor de un 550 g/ha,

5 alrededor de un 560 g/ha, alrededor de un 570 g/ha, alrededor de un 580 g/ha, alrededor de un 590 g/ha,  
 alrededor de un 600 g/ha, alrededor de un 610 g/ha, alrededor de un 620 g/ha, alrededor de un 630 g/ha,  
 alrededor de un 640 g/ha, alrededor de un 650 g/ha, alrededor de un 660 g/ha, alrededor de un 670 g/ha,  
 10 alrededor de un 680 g/ha, alrededor de un 690 g/ha, alrededor de un 700 g/ha, alrededor de un 710 g/ha,  
 alrededor de un 720 g/ha, alrededor de un 730 g/ha, alrededor de un 740 g/ha, alrededor de un 750 g/ha,  
 alrededor de un 760 g/ha, alrededor de un 770 g/ha, alrededor de un 780 g/ha, alrededor de un 790 g/ha,  
 alrededor de un 800 g/ha, alrededor de un 810 g/ha, alrededor de un 820 g/ha, alrededor de un 830 g/ha,  
 15 alrededor de un 840 g/ha, alrededor de un 850 g/ha, alrededor de un 860 g/ha, alrededor de un 870 g/ha,  
 alrededor de un 880 g/ha, alrededor de un 890 g/ha, alrededor de un 900 g/ha, alrededor de un 910 g/ha,  
 20 alrededor de un 920 g/ha, alrededor de un 930 g/ha, alrededor de un 940 g/ha, alrededor de un 950 g/ha,  
 alrededor de un 960 g/ha, alrededor de un 970 g/ha, alrededor de un 980 g/ha, alrededor de un 990 g/ha,  
 alrededor de un 1.000 g/ha, alrededor de un 1.010 g/ha, alrededor de un 1.020 g/ha, alrededor de un 1.030  
 g/ha, alrededor de un 1.040 g/ha, alrededor de un 1.050 g/ha, alrededor de un 1.060 g/ha, alrededor de un 1.070  
 25 g/ha, alrededor de un 1.080 g/ha, alrededor de un 1.090 g/ha, alrededor de un 1.100 g/ha, alrededor de un 1.110  
 g/ha, alrededor de un 1.120 g/ha, alrededor de un 1.130 g/ha, alrededor de un 1.140 g/ha, alrededor de un 1.150  
 g/ha, alrededor de un 1.160 g/ha, alrededor de un 1.170 g/ha, alrededor de un 1.180 g/ha, alrededor de un 1.190  
 g/ha, alrededor de un 1.200 g/ha, alrededor de un 1.210 g/ha, alrededor de un 1.220 g/ha, alrededor de un 1.230  
 30 g/ha, alrededor de un 1.240 g/ha, alrededor de un 1.250 g/ha, alrededor de un 1.260 g/ha, alrededor de un 1.270  
 g/ha, alrededor de un 1.280 g/ha, alrededor de un 1.290 g/ha, alrededor de un 1.300 g/ha, alrededor de un 1.310  
 g/ha, alrededor de un 1.320 g/ha, alrededor de un 1.330 g/ha, alrededor de un 1.340 g/ha, alrededor de un 1.350  
 35 g/ha, alrededor de un 360 g/ha, alrededor de un 1.370 g/ha, alrededor de un 1.380 g/ha, alrededor de un 1.390  
 g/ha, alrededor de un 1.400 g/ha, alrededor de un 1.410 g/ha, alrededor de un 1.420 g/ha, alrededor de un 1.430  
 g/ha, alrededor de un 1.440 g/ha, alrededor de un 1.450 g/ha, alrededor de un 1.460 g/ha, alrededor de un 1.470  
 g/ha, alrededor de un 1.480 g/ha, alrededor de un 1.490 g/ha, alrededor de un 1.500 g/ha, alrededor de un 1.510  
 40 g/ha, alrededor de un 1.520 g/ha, alrededor de un 1.530 g/ha, alrededor de un 1.540 g/ha, alrededor de un 1.550  
 g/ha, alrededor de un 1.560 g/ha, alrededor de un 1.570 g/ha, alrededor de un 1.580 g/ha, alrededor de un 1.590  
 g/ha, alrededor de un 1.600 g/ha, alrededor de un 1.610 g/ha, alrededor de un 1.620 g/ha, alrededor de un 1.630  
 45 g/ha, alrededor de un 1.640 g/ha, alrededor de un 1.650 g/ha, alrededor de un 1.660 g/ha, alrededor de un 1.670  
 g/ha, alrededor de un 1.680 g/ha, alrededor de un 1.690 g/ha, alrededor de un 1.700 g/ha, alrededor de un 1.710  
 g/ha, alrededor de un 1.720 g/ha, alrededor de un 1.730 g/ha, alrededor de un 1.740 g/ha, alrededor de un 1.750  
 50 g/ha, alrededor de un 1.760 g/ha, alrededor de un 1.770 g/ha, alrededor de un 1.780 g/ha, alrededor de un 1.790  
 g/ha, alrededor de un 1.800 g/ha, alrededor de un 1.810 g/ha, alrededor de un 1.820 g/ha, alrededor de un 1.830  
 g/ha, alrededor de un 1.840 g/ha, alrededor de un 1.850 g/ha, alrededor de un 1.860 g/ha, alrededor de un 1.870  
 g/ha, alrededor de un 1.880 g/ha, alrededor de un 1.890 g/ha, alrededor de un 1.900 g/ha, alrededor de un 1.910  
 55 g/ha, alrededor de un 1.920 g/ha, alrededor de un 1.930 g/ha, alrededor de un 1.940 g/ha, alrededor de un 1.950  
 g/ha, alrededor de un 1.960 g/ha, alrededor de un 1.970 g/ha, alrededor de un 1.980 g/ha, alrededor de un 1.990  
 g/ha, o alrededor de un 2.000.

40 Los niveles medios y de distribución de tolerancia o resistencia a herbicidas de un intervalo de sucesos de  
 transformación vegetal primario se evalúan de la manera normal basándose en el daño a la planta, síntomas de  
 clorosis meristemática, etc., en un intervalo de diferentes concentraciones de herbicidas. Estos datos se pueden  
 expresar en términos de, por ejemplo, valores GR<sub>50</sub>, derivados de curvas de dosis/respuesta que representan  
 gráficamente las “dosis” en el eje x, y representan gráficamente en el eje y el “porcentaje de exterminio”, “efecto  
 45 herbicida”, “números de plantas verdes que emergen”, etc., en las que valores incrementados de GR<sub>50</sub>  
 corresponden a niveles incrementados de tolerancia inherente a inhibidores (*por ejemplo*, valor incrementado de  
 K<sub>off</sub>/K<sub>mHPP</sub>) y/o el nivel de expresión de polipéptido de HPPD expresado.

50 Los métodos de la presente divulgación son especialmente útiles para proteger cosechas de la lesión herbicida  
 de herbicidas inhibidores de HPPD. Por ejemplo, el herbicida inhibidor de HPPD se selecciona adecuadamente  
 del grupo que consiste en biciclopirona (CAS RN 352010-68-5), benzobicyclón (CAS RN 156963-66-5),  
 benzofenap (CAS RN 82692-44-2), cetospiradox (CAS RN 192708-91-1) o su ácido libre (CAS RN 187270-87-  
 7), isoxaclortol (CAS RN 141112-06-3), isoxaflutol (CAS RN 141112-29-0), mesotriona (CAS RN 104206-82-8),  
 55 pirasulfotol (CAS RN 365400-11-9), pirazolinato (CAS RN 58011-68-0), pirazoxifeno (CAS RN 71561-11-0),  
 sulcotriona (CAS RN 99105-77-8), tefurilttriona (CAS RN 473278-76-1), tembotriona (CAS RN 335104-84-2) y  
 topamezona (CAS RN 210631-68-8); incluyendo, cuando sea aplicable, sus sales agrónómicamente  
 aceptables.

## 55 **Métodos de uso**

60 También se divulga un método para controlar selectivamente malas hierbas en un locus, que comprende plantas  
 de cosechas y malas hierbas, en el que las plantas se obtienen por cualquiera de los métodos de la actual  
 divulgación descritos anteriormente, en el que el método comprende la aplicación al locus de una cantidad  
 controladora de malas hierbas de uno o más herbicidas. En estos métodos de invención se puede usar  
 65 cualquiera de las plantas transgénicas descritas aquí. El término “locus” puede incluir suelo, semillas, y  
 plántulas, así como una vegetación establecida. Los herbicidas se pueden aplicar adecuadamente  
 preemergencia o posemgerencia de la cosecha o malas hierbas.

La expresión "cantidad controladora de malas hierbas" quiere incluir funcionalmente una cantidad de herbicida que es capaz de afectar al crecimiento o desarrollo de una mala hierba. De este modo, la cantidad puede ser suficientemente pequeña para simplemente retrasar o suprimir el crecimiento o desarrollo de una mala hierba dada, o la cantidad puede ser suficientemente grande para destruir irreversiblemente una mala hierba dada.

5 De este modo, la presente invención divulga un método para controlar malas hierbas en un locus, que comprende aplicar al locus una cantidad controladora de malas hierbas de uno o más herbicidas, en el que el locus comprende una planta transgénica que se ha transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que confiere resistencia o tolerancia a herbicidas de HPPD, sola o en combinación con una o más moléculas de ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables. En un aspecto, el rasgo deseable es resistencia o tolerancia a un herbicida, incluyendo, por ejemplo, herbicidas seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de HPPD, glifosato y glufosinato. En otro aspecto, el locus comprende una planta transgénica que se ha transformado con cualquier combinación de moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, incluyendo una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de HPPD mutante o variante del mismo que confiere resistencia o tolerancia a un herbicida, en combinación con al menos una, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican polipéptidos que confieren rasgos deseables.

En un aspecto, la presente invención divulga plantas transgénicas y métodos útiles para el control de especies vegetales indeseadas en campos de cosechas, en los que las plantas de cosechas se hacen resistentes a la química de HPPD mediante transformación para expresar genes que codifican polipéptidos de HPPD mutantes, y en los que se aplica un herbicida de HPPD como una aplicación desde la parte superior en cantidades capaces de exterminar o alterar el crecimiento de especies vegetales indeseadas (especies de malas hierbas, o, por ejemplo, plantas de cosechas sobrantes o "maleza" o "espontánea" en un campo de plantas de cosecha deseables). La aplicación puede ser pre- o post-emergencia de las plantas de la cosecha o de la especie indeseada, y se puede combinar con la aplicación de otros herbicidas a los que la cosecha es tolerante de forma natural, o a los que es resistente vía la expresión de uno o más transgenes distintos de resistencia a herbicidas. Véase, *por ejemplo*, la Publicación de Solicitud Patente U.S. nº 2004/0058427 y la Publicación PCT nº WO 98/20144.

En otro aspecto, la invención también se refiere a un método para proteger plantas de cosecha de la lesión herbicida. En el cultivo de plantas de cosecha, especialmente a escala comercial, la rotación correcta de la cosecha es crucialmente importante para la estabilidad del rendimiento (el logro de rendimientos elevados de buena calidad a lo largo de un período prolongado) y para el éxito económico de un negocio agronómico. Por ejemplo, a lo largo de grandes áreas de las principales regiones de los Estados Unidos donde se hace crecer el maíz (el "cinturón de maíz central"), se hace crecer soja como la cosecha subsiguiente al maíz, en alrededor de un 75% de los casos. El control selectivo de las malas hierbas en cosechas de maíz está siendo llevado a cabo cada vez más usando herbicidas inhibidores de HPPD. Aunque esa clase de herbicidas tiene excelente idoneidad para ese fin, puede dar como resultado daño fitotóxico agronómicamente inaceptable a las plantas de la cosecha en las cosechas subsiguientes (daño "residual"). Por ejemplo, ciertas variedades de soja son sensibles a restos incluso muy pequeños de tales herbicidas inhibidores de HPPD. En consecuencia, las plantas resistentes o tolerantes a herbicidas de la divulgación también son útiles para plantarlas en un locus de cualquier remanente a corto plazo de herbicida procedente de una aplicación previa (*por ejemplo*, plantando una planta transgénica de la invención en el año siguiente a la aplicación de un herbicida, para reducir el riesgo de daño procedente de restos de suelo del herbicida).

### Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan con el fin ilustrativo solamente y la invención no está limitada a estos Ejemplos, sino más bien engloba todas las variaciones que son evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas aquí.

#### Ejemplo 1

Clonación, expresión y ensayo de SEC ID NO: 1 de HPPD derivada de *Avena*, y determinación de los valores de  $K_{cat}$ ,  $K_{mHPP}$  y  $k_{off}$  frente a diversos herbicidas de HPPD

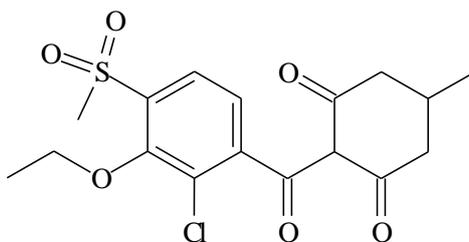
50 Se sintetizó una secuencia de ADN, optimizada en los codones para la expresión en *E. coli*, mediante GeneArt (Regensburg, Alemania) para codificar una HPPD derivada de *Avena sativa* (SEC ID NO: 1), se clonó en pET24a y se expresó en *E. coli* BL21(DE3) con selección de 50 µg/ml de canamicina como se describe en la Publicación PCT nº WO 02/46387. Los cultivos nocturnos que se hicieron crecer a 30°C se usaron para inocular 3 x 1 litro de LB en matraces de agitación, a una relación 1:100. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C, 220 rpm, hasta que se alcanzó una  $A_{600nm}^{1cm}$  de 0,6-0,8. La temperatura se redujo hasta 15°C, y se indujo con 0,1 mM de IPTG. Los cultivos se hicieron crecer toda la noche, y las células se cosecharon después de centrifugar durante 15 minutos a 10.000 g. Las células se almacenaron a -20°C hasta la extracción. Un pelete celular procedente de 3 litros de cultivo en matraz de agitación (~12 g) se descongeló en tampón de extracción (50 mM de Tris, 10 de mM ascorbato de sodio, 2 mM de DTT, 2 mM de AEBSF, 10 µM de inhibidor de tripsina, 1 mM de EDTA, pH 7,66) a una relación de 1 ml de tampón:1 g de pasta celular.

El extracto se hizo pasar a través del destructor celular a 30.000 psi, y se centrifugó a 50.000 g durante 25 minutos a 4°C. El extracto se puede intercambiar opcionalmente de tampón en Sephadex® G25. Los sobrenadantes se colocaron en perlas en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C. Los niveles de expresión de HPPD se estimaron mediante análisis de transferencia Western, usando como patrón *Avena* purificada (1-10 ng). Los extractos se diluyeron 1:6000, y se cargaron 1-10 µl sobre 12% de SDS PAGE. Además, la expresión se cuantificó comparando SDS PAGE inducido y no inducido con tinción de Coomassie® (Imperial Chemicals Industries, Ltd., Londres UK). Los geles se transfirieron sobre membranas de PVDF, y se llevaron a cabo transferencias Western usando suero anti-HPPD de trigo de conejo (1:6600) como anticuerpo primario, y anticuerpos enlazados a FITC anti-conejo de cabra (1:600) como anticuerpo secundario. La detección de las bandas se llevó a cabo haciendo un barrido en un Fluorimager™ 595 (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y la cuantificación de los picos se llevó a cabo usando ImageQuant™ (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK). El ADN plasmídico se volvió a aislar de todas las cepas transformadas, y se confirmó la secuencia de ADN a lo largo de la región codificante.

A partir de las transferencias Western, se estimó que el nivel de expresión del polipéptido de SEC ID NO: 1 expresado en el extracto de *E. coli* era alrededor de un 10-14 mg/ml de una concentración total de proteína soluble de 33,5 mg/ml.

La concentración de HPPD activa en el extracto también se estimó de forma más exacta mediante titulación de sitios activos. Por ejemplo, se añadió un intervalo de volúmenes de extracto (típicamente 0-20 µl) a 50 mM de tampón de BisTrisPropano, a pH 7,0 y a 25°C, que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina y 3 nmoles de compuesto A marcado con <sup>14</sup>C (1,81 GBq/mmol), en un volumen de ensayo final total de 425 µl.

#### Compuesto A



La reacción de unión de proteína radiomarcada se extinguió después de 3 minutos mediante adición de 100 µl de 1 mM de Estructura A "fría". La proteína se intercambió en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 0,1M de KCl mediante cromatografía rápida en una columna NAP5 G25 Sephadex® (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y <sup>14</sup>C unido a las fracciones proteicas se midió en un líquido de centelleo Optiphase usando un contador de centelleo Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Wellesley, MA). La concentración de sitio de unión de HPPD en el extracto se calculó a partir de la titulación como se describe en la publicación PCT n° WO 02/46387, y se estimó como 94,9, 78,3, y 82,3 (media 85,2) µM en un extracto, y 47,2 µM en otro ejemplo.

Los valores de  $K_{mHPPD}$  y  $k_{cat}$  de la HPPD expresada se estimaron basándose en los ensayos llevados a cabo a 25°C en disolución de 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO), y un intervalo de concentraciones (típicamente 0,5x-10x  $K_m$ ) de 4-hidroxifenilpiruvato. Típicamente, los ensayos en un volumen final de 110 µl se iniciaron con la adición de enzima, y se detuvieron de forma exacta después de 20, o preferiblemente 10 ó 15 segundos, con adición mezclada en remolinos de 20 µl de ácido perclórico al 25%. La disolución de ensayo se transfirió a viales de Chromacol 03-CVG HPLC, se cerraron herméticamente, y la cantidad de homogentisato formada en una alícuota de 40 µl se determinó mediante inyección en una columna de HPLC Aqua C18 5µ 75 x 4,6 mm HPLC de fase inversa que corre con 5,5% de acetonitrilo 0,1% de TFA (Tampón A) a 1,5 ml/min. La columna se eluyó a 1,5 ml/minuto usando un lavado de 2 minutos en tampón A, seguido de un lavado de 2 minutos en una mezcla 30/70 de tampón A y 100% de acetonitrilo, y un lavado adicional de 3,5 minutos en tampón A. La elución de homogentisato se monitorizó mediante UV a 292 nm, y la cantidad formada en cada reacción se cuantificó comparando con una curva de calibración patrón.

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se determinaron (por ejemplo Figura 1) usando un ajuste de mínimos cuadrados no lineal usando el software Grafit 4™ (Erithacus Software, Middlesex, UK). Los valores de  $k_{cat}$  se determinaron dividiendo la velocidad máxima,  $V_{max}$ , expresada en nmoles/s, entre el número de nmoles de enzima HPPD (basado en la concentración determinada mediante titulación de sitios activos).

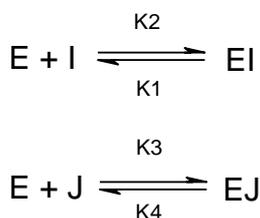
A partir de un conjunto de experimentos separados similares a aquellos que produjeron los datos mostrados en la Figura 1, en un extracto de SEC ID NO: 1 de HPPD se estimó el valor de  $K_m$  como 6,17, 4,51, 6,09, 6,13, 4,37, 4,62, 5,41, 5,13 y 6 µM ( $K_m$  media = 5,38 µM). Los valores de  $k_{cat}$  correspondientes fueron 4,92, 6,25, 7,08, 6,26, 5,5, 6,77, 6,89, 7,12 y 7,39 s<sup>-1</sup> ( $k_{cat}$  media = 6,46 s<sup>-1</sup>). Obsérvese que para este cálculo, y de forma estándar aquí,  $M_r$  se tomó como ~94 kD, y se supuso un sitio activo por dímero (es decir, la mitad de actividad de los

sitios así como la unión del inhibidor; véanse Garcia *et al.* (2000) *Biochemistry*, 39:7501-7507; Hawkes "Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (HPPD) – The Herbicide Target". En *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. Krämer y Schirmer. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH, 2007. Cap. 4.2, p. 211-220). Para la suposición alternativa de un sitio activo por monómero, entonces los valores calculados de  $k_{cat}$  deberían simplemente dividirse a la mitad correspondiente y sistemáticamente.

Las velocidades de asociación (gobernadas por una constante de velocidad de asociación,  $k_{on}$ ) para la formación de los complejos de enzima:inhibidor, EI y velocidades de disociación (gobernadas por una constante de velocidad de disociación,  $k_{off}$ ) se determinaron por métodos conocidos en la técnica y esencialmente como se describe en Hawkes *et al.* (2001) *Proc. Bright. Crop. Prot. Conf. Weeds*, 2:563-568 y en la publicación PCT n° WO 02/46387).

Por ejemplo, las velocidades de asociación se midieron, a tiempo cero, añadiendo ~60 pmoles de HPPD a 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 y a 25°C que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO) y un exceso (~300 pmoles) de  $^{14}C$ -inhibidor en un volumen de ensayo total de 425 µl, y, a diversos puntos de tiempo (0-180 s), extinguiendo la reacción de unión del radiomarcador mediante adición y mezclamiento rápido de 100 µl de estructura A "fría" 1 mM. Las muestras de proteína extinguidas a diferentes tiempos se intercambiaron entonces en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 0,1 M de KCl mediante cromatografía rápida a través de una columna NAP5 G25 Sephadex® (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y la cantidad de  $^{14}C$  unido a las fracciones proteicas se cuantificó en un líquido de centelleo Optiphase usando un contador de centelleo Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Los datos se ajustaron según el esquema más abajo, a fin de derivar el valor de la constante de velocidad aparente de segundo orden,  $k_2$ , que gobierna la velocidad de asociación de la enzima y el inhibidor radiomarcado. Se usó un intervalo de concentraciones de enzima y de inhibidor. Opcionalmente, la constante de velocidad se puede obtener a partir de experimentos similares en los que la enzima (a ~0,05-0,2 µM de sitios de unión) y, en este caso, inhibidor sin marcar (a ~0,5 a 2 µM) se hacen reaccionar durante un intervalo de tiempos cortos (0-60 s) en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 y a 25°C que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO), y entonces se extinguió mediante dilución rápida en disolución de ensayo que contiene 100-200 µM de HPP para el ensayo inmediato mediante cuantificación por HPLC/UV de la formación de homogentisato después de 30-40 s (*es decir*, un tiempo suficientemente corto de manera que la disociación y asociación del inhibidor no se produce significativamente en la escala de tiempo del ensayo) como se describe anteriormente. Otros métodos ejemplares se describen en la publicación PCT n° WO 02/46387.

Las velocidades de disociación ( $k_1$  en el esquema más abajo) se obtuvieron a partir de estudios de velocidad de intercambio, en los que el inhibidor de ensayo, I, o su pareja de intercambio, J, se radiomarcaron, y los datos se ajustaron según el esquema más abajo. Como se señala en Hawkes *et al.* (2001) *Proc. Bright. Crop. Prot. Conf. Weeds*, 2:563-568, las preparaciones de HPPD parecen típicamente comprender, al menos con respecto a la disociación de ciertos inhibidores, 5-40% de una fracción que se intercambia más rápidamente (unión más débil) de sitios de unión al inhibidor. Una pequeña cantidad de este efecto es debida a la unión no específica, que se puede restar fácilmente o se puede tener en cuenta. Para la mayoría de los inhibidores, el efecto es pequeño; con respecto a estructuras como el compuesto A, tal efecto es probablemente debido a la proquiralidad. Cuando las fracciones que se intercambian de manera rápida y lenta se distinguen en absoluto por los inhibidores, aquí las velocidades de disociación medidas se refieren siempre sólo a la fracción principal que se intercambia de manera más lenta, que representa el 60-95% de la masa de los sitios de unión al inhibidor de HPPD presentes en los extractos ensayados.



Las velocidades de disociación se determinaron preincubando, por ejemplo, ~200 pmoles de sitios de unión a HPPD (determinados como se describe anteriormente mediante titulación de los sitios activos en una reacción de 3 min. con la estructura A) en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 y a 25°C que contiene 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina (Sigma, St. Louis, MO) que contiene ~1,0 nmoles de  $^{14}C$  inhibidor a 25°C en un volumen de ensayo total de 1,3 ml. Después de 30 minutos, se inició la reacción de intercambio con adición de 100 µl de 1 mM de estructura A "fría" con mezclamiento a conciencia, e, inmediatamente, se extrajeron 150 µl y se cargaron en una columna NAP5, la proteína se intercambió en 50 mM de tampón de BisTrisPropano a pH 7,0 que contiene 0,1 M de KCl mediante cromatografía rápida (< 2 min.) a través de una columna NAP5 G25 Sephadex® (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire UK), y la cantidad de  $^{14}C$  unido a proteína se midió mediante líquido de centelleo Optiphase usando un contador de centelleo Tri-Carb® 2900TR (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Se retiraron alícuotas adicionales y se midieron de la

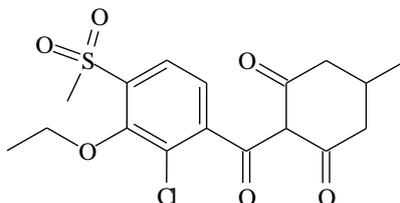
misma manera a diversos tiempos durante minutos u horas según se requiere, a fin de determinar la cinética de intercambio.

5 En una variante del método útil para distinguir mejor entre velocidades de disociación que fueron relativamente rápidas (*por ejemplo*, en las que  $t_{1/2} < 15$  min. a 25°C), la temperatura del experimento se redujo desde 25°C hasta la temperatura del hielo. En este caso, las velocidades de disociación se determinaron preincubando ~200 pmoles de HPPD en tampón de reacción (50 mM de BTP pH 7, 25 mM de ascorbato de Na, 4 µg/ml de catalasa bovina, y 10% de glicerol) que contiene ~1,0 nmoles de <sup>14</sup>C inhibidor a 25°C en un volumen de ensayo total de 1,3 ml. Después de 30 minutos, la vasija de reacción se transfirió a hielo. Después de otros 10 minutos a 10 temperatura del hielo, se inició la reacción de intercambio mediante adición de 100 µl de 1 mM de Estructura A, con mezclamiento a conciencia, y se extrajeron 150 µl, se cargaron y se intercambiaron rápidamente a través de una columna NAP5 en una habitación fría a ~-5-8°C, a fin de cuantificar la cantidad de radiomarcador que queda unido a la proteína a diversos tiempos desde el comienzo de intercambio a la temperatura del hielo.

15 Las velocidades de disociación ( $k_1$ ) de los inhibidores de HPPD que no se pueden radiomarcarse fácilmente o que presentan otros problemas de medición (por ejemplo niveles elevados de unión no específica a proteína de fondo, que se puede medir como unión del radiomarcador que persiste en presencia de concentraciones elevadas de inhibidor "frío") se pueden medir directamente. En este caso, primero se forma el complejo enzimático (~0,1-0,2 µM) con el inhibidor sin marcar, y después se obtuvo la cinética de intercambio ahuyentándolo con una concentración elevada de estructura A marcada con <sup>14</sup>C (o D radiomarcado) y monitorizando la velocidad a la cual el marcador se une a la proteína. La estructura A es un inhibidor 20 particularmente potente con cinética conocida. En un exceso de 20 veces o más, la Estructura A ocupará, en el equilibrio, >90% de los sitios de unión en la competición de intercambio con los otros inhibidores ensayados aquí, y de hecho con la mayoría de los otros inhibidores (los expertos en la técnica diseñarán por supuesto las concentraciones del experimento/relativas y ajustarán los datos en consecuencia). Los métodos ejemplares también se describen en la Publicación PCT nº WO 02/46387.

25 Los datos de velocidades de asociación y de disociación ejemplares (y los valores de  $k_i$  derivados) se obtuvieron para la SEC ID NO: 1 de HPPD derivada de *Avena* para los siguientes compuestos como se indica.

Compuesto A (<sup>14</sup>C a 1,81 GBq/mmol)



Velocidad de disociación  $k_1 = 1,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  según se determina a 25°C usando el método radioquímico directo.

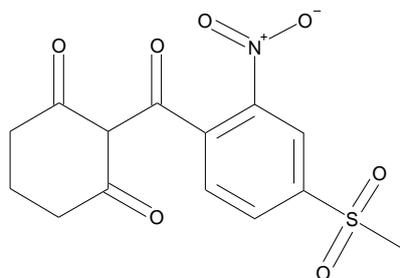
30 Velocidad de disociación  $k_2 = 8,50 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  según se determina a 25°C usando el método radioquímico directo.

$K_d = 1,96\text{E}-10 \text{ M}$ .

Relación  $K_d/ K_m = 0,000036$

De este modo, se estimó que  $k_{off}$  es  $= 1,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$

35 Compuesto B (<sup>14</sup>C a 1,425GBq/mmol)



Velocidad de disociación  $k_1$  (media)  $= 8,1 \text{ E}-04 \text{ s}^{-1}$  a 25°C (los experimentos individuales produjeron  $k_1 = 8,00 \text{ E} - 04, 8,88 \text{ E} - 04, 7,50 \text{ E} - 04$  y  $8,00\text{E} -04 \text{ s}^{-1}$ , según se determina mediante el método radioquímico directo).

Medida a temperatura de hielo  $k_1 = 1,58 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  (los experimentos individuales iniciales produjeron  $1,16 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,2 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ . Más tarde, experimentos más amplios haciendo una mejor asignación para valores de unión no específica aparecieron consistentemente próximos y de media a alrededor de un  $1,58 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  ( $1,58 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,58 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,58 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ).

5

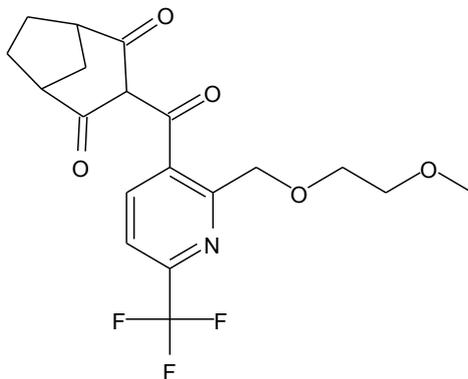
La velocidad de asociación  $k_2$  (media)  $6,7 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  (los experimentos individuales produjeron  $k_2 = 6,35 \text{ E} + 04$ ,  $7,50 \text{ E} + 04$ ,  $6,2 \text{ E} + 04$  según se determina mediante el método radioquímico directo). Para mesotriona, que tiene una velocidad de disociación relativamente rápida, los estimados para la velocidad de asociación basándose en el método a base de actividad fueron más variables, oscilando desde  $4,2 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $4,9 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  hasta  $7,5 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

10

$K_d$  se estimó así a partir del dato radioquímico como  $1,16 \text{ E} - 08 \text{ M}^{-1}$ , que corresponde a una relación  $K_d/ K_m$  de 0,00217.

De este modo, se estimó que  $k_{\text{off}}$  fue  $8,1 \text{ E} - 04 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  y  $1,58 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  a  $0^\circ\text{C}$ .

Compuesto C ( $^{14}\text{C}$  a 0,774 GBq/mmol)



15

Velocidad de disociación  $k_1$  (media) =  $5,3 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  (experimentos iniciales dieron  $k_1 = 7,80 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $9,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $6 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $7 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  y  $7,80 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ; sin embargo, un conjunto subsiguiente de experimentos, que hacen una asignación más exacta para los efectos de unión no específica hacen probable que los primeros valores elevados fueron atípicos). Basándose en valores tardíos más consistentes, la velocidad de disociación  $k_1$  (media) =  $5,3 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  se basó en los valores experimentales individuales de  $6,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $5,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $5,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ , y  $6,0 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ .

20

La velocidad de asociación  $k_2$ , que se estimó que era  $7,50 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  usando el método radioquímico directo, está muy de acuerdo con los estimados a partir del método a base de actividad enzimática de  $7,50 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $7,80 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $7,60 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $7,20 \text{ E} + 03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  y  $1,0 \text{ E} + 04 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

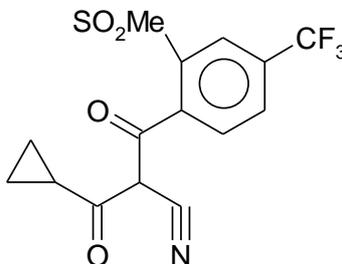
25

Basándose en el método radioquímico, el estimado de  $K_d = 7,1 \text{ E} - 09 \text{ M}$ .

Por lo tanto, el estimado de la relación  $K_d/ K_m = 0,0013$ .

De este modo,  $k_{\text{off}}$  se estimó que era  $5,3 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ .

Compuesto D ( $^{14}\text{C}$  a 1,036GBq/mmol)



30

Velocidad de disociación  $k_1 = 3,96 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  según se determina usando el método radioquímico directo (mediciones individuales de  $4,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  y  $3,75 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ). La velocidad de disociación según se determina en una serie de experimentos indirectos de velocidad de disociación fue  $4,25 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,66 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,83 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $3,83 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,5 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $4,33 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ . El valor medio para la velocidad de disociación se toma como  $4,39 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  a partir de todos los datos.

## ES 2 555 386 T3

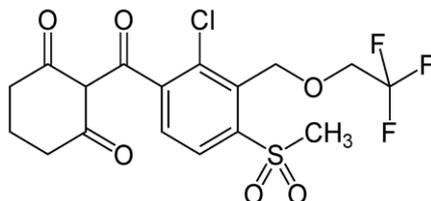
Velocidad de asociación  $k_2 = 3,20 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  según se determina mediante el método radioquímico directo. Esto está bastante de acuerdo con los estimados procedentes del método a base de actividad para una velocidad de disociación de  $3,20 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $5,7 \text{ E} + 04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Basado en los métodos radioquímicos, el estimado de  $K_d = 1,36 \text{ E} - 9 \text{ M}$ .

5 El estimado de la relación  $K_d/K_m = 0,00025$ .

De este modo, se estimó que  $k_{\text{off}}$  fue  $4,39 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ .

Compuesto E



10 Velocidad de disociación  $k_1 = 4,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  según se determina inicialmente mediante el método radioquímico indirecto basado en mediciones individuales de  $5,50 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  y  $2,85 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ . A partir de una serie de medidas adicionales, parece que el valor inicial más elevado es un valor atípico, con valores obtenidos de  $3,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $3,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $2,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $3,17 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $2,67 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $3,33 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $3,08 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $2,02 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $3,00 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ , y un nuevo valor de  $k_{\text{off}}$  medio estimado como  $2,96 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ .

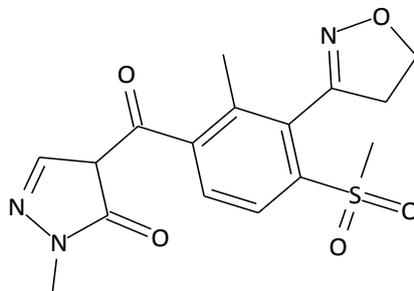
15 Velocidad de asociación  $k_2 = 1,30 \text{ E} + 05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  según se determina mediante el método no radioquímico directo.

El estimado de  $K_d = 2,28 \text{ E} - 10 \text{ M}$

El estimado de la relación  $K_d/K_m = 0,000042$

De este modo,  $k_{\text{off}}$  se estimó que era  $2,96 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ .

Compuesto F



20

El valor medio de  $k_{\text{off}}$  se estimó que era  $6,72 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  a partir de una serie de medidas indirectas de la velocidad de disociación ( $7,08 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $6,00 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ,  $7,00 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$  y  $6,83 \text{ E} - 05 \text{ s}^{-1}$ ).

### Ejemplo 2

25 Clonación, expresión y ensayo de las SEC ID NOs: 1-14 de las HPPD procedentes de diversas plantas, y determinación de los valores de  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_{\text{mHPP}}$  y  $k_{\text{off}}$  frente a diversos herbicidas de HPPD

30 Secuencias de ADN, optimizadas para el uso de codones de *E. coli*, y que codifican polipéptidos de HPPD que corresponden a las SEC ID NOs: 1-14, derivadas de diversas plantas, se sintetizaron mediante GeneArt (Regensburg, Alemania), se clonaron en pET24a, y se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) con selección con  $50 \mu\text{g/ml}$  de canamicina como se describe en la Pub. Sol. PCT nº WO 02/46387. Las células se hicieron crecer, se prepararon extractos proteicos, y se llevaron a cabo medidas de los títulos de sitios activos de HPPD y cinéticas (de los valores de  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_{\text{mHPP}}$  y  $k_{\text{off}}$  frente a diversos herbicidas diferentes), como se describe en el Ejemplo 1.

35 La HPPD que corresponde a SEC ID NO: 1 se incluyó como un control interno en los experimentos. Los valores medios absolutos de los diversos parámetros cinéticos para SEC ID NO: 1 se enumeran anteriormente con detalle en el Ejemplo 1. Los datos en la Tabla 2 a continuación proporcionan datos a partir de estas medidas para las SEC ID NOs: 2-14 expresados como una relación frente al valor de control correspondiente para SEC ID NO: 1. De este modo, todos los valores de los parámetros para SEC ID NO: 1 se dan como 1,0, y todos los valores en la tabla son comparativos con aquellos para SEC ID NO: 1.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las HPPD de SEC ID NOs: 2-14

SEC ID NO:	$K_{cat}/K_{cat}$ SEC ID NO: 1	$K_{mHPPD}/K_m$ SEC ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ $(K_{cat}/K_m)$ SEC ID NO: 1	$K_{off B}/K_{off B}$ SEC ID NO: 1	$K_{off C}/K_{off C}$ SEC ID NO: 1	$K_{off D}/K_{off D}$ SEC ID NO: 1	$K_{off E}/K_{off E}$ SEC ID NO: 1	$K_{off F}/K_{off F}$ SEC ID NO: 1
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2				2,0				
3	1,1	1,1	0,9	2,1	1,3	1,3	1,5	1,6
	1,3	1,2	1,1	2,2	1,1	1,2	1,5	
4	1,3	1,6	0,8	0,5		0,6	1,6	
	1,3	1,6	0,8					
5	1,5	1,4	1,1	0,5		0,7	1,5	
	1,7	1,8	0,9					
6	1,0	1,1	0,9	1,0		1,8	1,0	
7	1,1	0,9	1,2	1,1		2,1	1,7	1,3
	0,9	0,8	1,1	1,3		1,7	1,7	
8	1,1	0,8	1,3	1,3		1,4	1,1	
	1,2	0,8	1,4					
9	1,2	1,1	1,1	0,1		0,2	0,5	
10	1,4			<0,05		0,2	0,1	
11				<0,1		0,3	0,3	0,3
12				0,1		0,1	0,2	0,2
13	0,7	0,7	1,0	<0,05		0,2		
14	0,8	6,0	0,2	<0,05		4,0		

“ $k_{off B}$ ”, “ $k_{off C}$ ”, etc. se refieren a velocidades de disociación medidas mediante intercambio de radiomarcador con los herbicidas B-F inhibidores de HPPD descritos en el Ejemplo 1.

- 5 Es manifiesto a partir de los datos en la Tabla 2 que, con relación a SEC ID NO: 1, algunas HPPD son más y otras son menos inherentemente resistentes a los diversos herbicidas B-F, y por lo tanto más o menos adecuadas para conferir resistencia en plantas transgénicas. Además, algunas muestran valores más grandes o más pequeños de  $k_{cat}/K_m$  a la HPPD de SEC ID NO: 1. Para cada herbicida, el parámetro comparativo relevante que determina la idoneidad o de otro modo de la secuencia de HPPD dada es el múltiplo del valor de  $k_{cat}/K_m$  (con relación a aquél para SEC ID NO: 1) y la velocidad  $k_{off}$  correspondiente para el herbicida (con relación a aquella para SEC ID NO: 1).

- 10 De este modo, por ejemplo, la HPPD de SEC ID NO: 3 derivada de *Alopecurus* da un valor para este múltiplo de ~2,3 para mesotriona (B), queriendo decir que es efectivamente alrededor de un 2,3 veces más resistente a mesotriona que lo que lo es SEC ID NO: 1, y, todo lo demás siendo igual, conferirá un nivel mayor (probablemente alrededor de un 2 veces) de tolerancia a mesotriona cuando se exprese igualmente en plantas transgénicas.

15 De forma similar, la misma secuencia también proporciona una tolerancia mejorada (si bien hasta un menor grado) con respecto a SEC ID NO: 1 a los otros herbicidas ensayados (topramezona, tembotriona y el dicetonitrilo derivado de isoxaflutol, etc.). Igualmente se puede observar que las HPPD de SEC ID NOs: 6, 7 y 8 también confieren ventajas. Por otro lado, del intervalo de otras HPPD ensayadas, algunas parecen

- significativamente menos efectivas que la HPPD de SEC ID NO: 1 para proporcionar tolerancia a cualquier herbicida. De este modo, por ejemplo, parece que las HPPD de *Erichola*, *Arabidopsis* y *Bidens* son de actividad catalítica similar a la HPPD de SEC ID NO: 1, pero son >20 veces más sensibles a mesotriona, mientras que la enzima de *Pseudomonas* es tanto menos catalíticamente eficiente ( $k_{cat}/K_m \sim 0,2$  de aquél para SEC ID NO: 1) como menos sensible a mesotriona. De este modo, un número de las nuevas secuencias de HPPD descritas aquí (por ejemplo, SEC ID NOs: 2-8) ofrecen mejoras significativas con respecto a la técnica anterior con relación a proporcionar mejores opciones para proporcionar tolerancia a herbicidas de HPPD, y especialmente con respecto a las clases químicas ejemplificadas.

### Ejemplo 3

- 10 Clonación, expresión y ensayo de variantes mutantes de las HPPD, y determinación de los valores de  $k_{cat}$ ,  $K_{mHPP}$  y  $k_{off}$  frente a diversos herbicidas de HPPD

Las secuencias de ADN optimizadas para el uso de codones de *E. coli*, y que codifican polipéptidos de HPPD que corresponden a las SEC ID NOs: 20-47, que codifican polipéptidos de HPPD derivados *Avena sativa*, *Alopecurus myosoides* y *Poa annua*, se sintetizaron mediante GeneArt (Regensburg, Alemania), se clonaron en pET24a, y se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) con selección con 50 µg/ml de canamicina, como se describe en la Publicación PCT nº WO 02/46387. Las células se hicieron crecer, se prepararon extractos proteicos, y se llevaron a cabo mediciones de los títulos de sitios activos de HPPD y cinéticas de los valores de  $k_{cat}$ ,  $K_{mHPP}$  y  $k_{off}$ , como se describe en el Ejemplo 1.

En el presente ejemplo, se usaron las siguientes secuencias de HPPD derivadas de SEC ID NO: 1.

- 20 La SEC ID NO: 20 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358.

La SEC ID NO: 21 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de I por la V en la posición 217.

- 25 La SEC ID NO: 22 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de L por la V en la posición 217.

La SEC ID NO: 23 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de R por la A en la posición 326.

La SEC ID NO: 24 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de K por la A en la posición 326.

- 30 La SEC ID NO: 25 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de I por la A en la posición 326.

La SEC ID NO: 26 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de E por la I en la posición 339.

- 35 La SEC ID NO: 27 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de D por la I en la posición 339.

La SEC ID NO: 28 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de C por la I en la posición 339.

La SEC ID NO: 29 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de R por la G en la posición 408.

- 40 La SEC ID NO: 30 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358 y mediante la sustitución de R por la A en la posición 326.

La SEC ID NO: 31 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358, mediante la sustitución de R por la A en la posición 326, y mediante la sustitución de I por la V en la posición 217.

- 45 La SEC ID NO: 32 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358 y mediante la sustitución de I por la V en la posición 217.

La SEC ID NO: 33 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de R por la A en la posición 326 y mediante la sustitución de I por la V en la posición 217.

- 50 La SEC ID NO: 34 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358, mediante la sustitución de K por la A en la posición 326, y mediante la sustitución de I por la V en la posición 217.

## ES 2 555 386 T3

La SEC ID NO: 35 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358, mediante la sustitución de R por la A en la posición 326, y mediante la sustitución de L por la V en la posición 217.

5 La SEC ID NO: 36 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358, mediante la sustitución de R por la A en la posición 326, mediante la sustitución de I por la V en la posición 217, y mediante la sustitución de E por la I en la posición 339.

La SEC ID NO: 37 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de M por L en la posición 358, mediante la sustitución de R por la A en la posición 326, mediante la sustitución de L por la V en la posición 217, y mediante la sustitución de E por la I en la posición 339.

10 La SEC ID NO: 42 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de H por la G en la posición 412.

La SEC ID NO: 43 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de C por la G en la posición 412.

15 La SEC ID NO: 44 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de A por la Q en la posición 297.

La SEC ID NO: 45 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de N por la Q en la posición 283.

La SEC ID NO: 46 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de G por la Q en la posición 297.

20 La SEC ID NO: 47 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 1 mediante la sustitución de A por L en la posición 358.

En el presente ejemplo, se usaron las siguientes secuencias de HPPD derivadas de SEC ID NO: 3:

La SEC ID NO: 40 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 3 mediante la sustitución de M por L en la posición 359 y mediante la sustitución de R por la A en la posición 327.

25 La SEC ID NO: 41 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 3 mediante la sustitución de M por L en la posición 359, mediante la sustitución de R por la A en la posición 327, y mediante la sustitución de I por la V en la posición 218.

En el presente ejemplo, se usaron las siguientes secuencias de HPPD derivadas de SEC ID NO: 7:

30 La SEC ID NO: 38 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 7 mediante la sustitución de M por L en la posición 353 y mediante la sustitución de R por la A en la posición 321.

La SEC ID NO: 39 de HPPD se cambió con relación a SEC ID NO: 7 mediante la sustitución de M por L en la posición 353, mediante la sustitución de R por la A en la posición 321, y mediante la sustitución de I por la primera V en la posición 213.

35 La HPPD correspondiente a SEC ID NO: 1 se incluyó como control interno en los experimentos. Los valores medios absolutos de los diversos parámetros cinéticos para la HPPD de SEC ID NO: 1 se enumeran anteriormente con detalle en el Ejemplo 1. Los datos en las Tablas 3-5 a continuación proporcionan datos procedentes de estas medidas para las SEC ID NOs: 20-47 y 50, expresados como una relación frente al valor de control correspondiente para SEC ID NO: 1. De este modo, todos los valores de los parámetros para SEC ID NO: 1 se les da un valor de 1.0.

40 **Tabla 3. Parámetros cinéticos de las HPPD de SEC ID NOs: 20-29**

SEC ID NO:	$K_{cat}/K_{cat}$ SEC ID NO: 1	$K_{mHPP}/K_m$ SEC ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ $(K_{cat}/K_m)$ SEC ID NO: 1	$K_{off B}/K_{off B}$ SEC ID NO: 1	$K_{off C}/K_{off C}$ SEC ID NO: 1	$K_{off D}/K_{off D}$ SEC ID NO: 1	$K_{off E}/K_{off E}$ SEC ID NO: 1	$K_{off F}/K_{off F}$ SEC ID NO: 1
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
20	0,7	0,9	0,8	2,0	1,1	2,3	1,2	2,1

ES 2 555 386 T3

	0,8	0,9	0,8	1,9		1,9		
21	1,1	1,4	0,8	1,5	1,1	1,0	1,0	1,1
	0,9	0,9	1,0	1,5				
22	0,8	0,8	1,0	2,0	1,0	1,2	1,0	1,0
	0,7	0,7	1,1					
23	1,5	1,0	1,6	1,7		1,4	1,2	1,3
	1,3	0,6	2,2	1,7	0,9	1,4	1,3	
24	0,8	1,0	0,8	1,4	1,1	1,5	1,2	1,3
	0,7	0,6	1,2					
25	0,9			1,6		1,1	1,3	
26	0,6	0,5	1,2	1,5	1,0	1,4	1,6	1,5
	0,6	0,6	1,0					
27	0,8	0,9	0,9	1,7		1,1	1,5	
	0,7	0,7	1,1					
28				1,2		1,0	1,6	
29	0,1	0,6	0,2	8,1		1,7	11,3	
	0,1	0,3	0,4					

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las HPPD para SEC ID NOs: 30-36

SEC ID NO:	$K_{cat}/K_{cat}$ SEC ID NO: 1	$K_{mHPP}/K_m$ SEC ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ $(K_{cat}/K_m)$ SEC ID NO: 1	$K_{off B}/K_{off B}$ SEC ID NO: 1	$K_{off C}/K_{off C}$ SEC ID NO: 1	$K_{off D}/K_{off D}$ SEC ID NO: 1	$K_{off E}/K_{off E}$ SEC ID NO: 1	$K_{off F}/K_{off F}$ SEC ID NO: 1
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
30	0,6	0,6	1,1	3,4		2,8	1,6	3,2
	0,6	0,5	1,1	3,3		2,7	1,6	3,1
	0,8	0,8	1,1	3,5	1,1	3,1	1,9	
	0,8	0,7	1,1	3,6	0,9	2,8	2,2	
	0,8	0,7	1,0					
31	0,6	0,5	1,1	5,3	1,1	3,2	2,4	3,8
	0,6	0,5	1,1	5,3		2,6	2,3	
	0,8	0,7	1,2					
32	1,0	1,1	0,8	3,1	1,0	2,1	1,6	2,7
	0,9	0,9	0,9	3,2		2,3		
33	0,6	0,5	0,8	2,5	1,3	1,4	1,5	1,3
	0,6	0,7	0,7					

ES 2 555 386 T3

34	0,7	0,8	0,9	5,0		3,2	2,9	
	0,7	0,9	0,8					
35	0,8	1,2	0,7	6,3		3,0	2,5	
	0,7	0,8	0,9					
36	0,7	0,7	1,0	8,5		3,6	5,1	
	0,7	0,5	1,3					

Tabla 5. Parámetros cinéticos de las HPPDs de SEC ID NOs: 37-47 y 50

SEC ID NO:	$K_{cat}/K_{cat}$ SEC ID NO: 1	$K_{mHPP}/K_m$ SEC ID NO: 1	$(K_{cat}/K_m)/$ $(K_{cat}/K_m)$ SEC ID NO: 1	$K_{off B}/K_{off B}$ SEC ID NO: 1	$K_{off C}/K_{off C}$ SEC ID NO: 1	$K_{off D}/K_{off D}$ SEC ID NO: 1	$K_{off E}/K_{off E}$ SEC ID NO: 1	$K_{off F}/K_{off F}$ SEC ID NO: 1
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
37	0,7	0,5	1,3	8,6		3,4	3,7	
	0,7	0,4	1,6					
38	0,5	0,8	0,7	3,9		3,1	2,8	
	0,6	0,5	1,2					
39	0,8	0,7	1,2	6,4		4,3	4,8	
	0,9	0,8	1,0					
40	0,6	0,5	1,0	8,4		2,1	2,5	
	0,8	0,6	1,3					
41	0,9	0,7	1,2	12,5		3,6	5,3	
	0,9	1,0	1,0					
42	2,0	8,1	0,2	1,4	0,7	0,6	1,0	1,9
	1,1	4,6	0,2					
43	0,7	10,5	<0,1	2,0	1,4	1,0	2,7	0,7
	0,5	8,5	<0,1					
44	0,4	22	<0,1		1,6	0,6		
45	<0,05	>2	<<0,1			2,0		
46	0,1	49	<<0,1	2,7	1,8			
47	0,2	2	0,1	1,0	1,7			
50	1,1	2	1,1	15,3		3,2	4,7	
						3,4	3,7	4,1

Es manifiesto a partir de los datos dados a conocer en las Tablas 3-5 que, con relación a SEC ID NO: 1, algunas HPPD mutantes son más y otras son menos inherentemente resistentes a los diversos herbicidas B-F, y por lo tanto más o menos adecuadas para conferir resistencia en plantas transgénicas. Nuevamente, para cada herbicida, el parámetro comparativo relevante que determina la idoneidad u otro modo de la secuencia de HPPD

dada es el múltiplo del valor de  $k_{cat}/K_m$  (con relación a aquél para SEC ID NO: 1) y la velocidad  $k_{off}$  correspondiente para el herbicida (con relación a aquella para SEC ID NO: 1). De este modo, aquellas secuencias, por ejemplo SEC ID NOs: 20-29, que tienen cambios de aminoácidos individuales con relación a SEC ID NO: 1 en las posiciones L358, V217, I339 y A326 de SEC ID NO: 1 no muestran sólo incrementos significativos en la velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) a uno o más de los herbicidas de ensayo (B-F), sino también siguen siendo catalíticamente eficientes (es decir  $k_{cat}/K_m$  sigue siendo aproximadamente el mismo, o está mejorado, con relación a aquél para SEC ID NO: 1). De este modo, por ejemplo, la HPPD de SEC ID NO: 26, que tiene una sustitución de aminoácido I339E con relación a SEC ID NO: 1 muestra una mejora significativa (~1,5 veces) en la tolerancia inherente a herbicidas B, D, E y F con relación a SEC ID NO: 1. De forma similar, las otras diversas sustituciones de aminoácidos individuales (L358M, V217I, V217L, G408R, I339D, I339C, A326R, A326I y A326K de SEC ID NOs: 20-29) también proporcionan mejoras en la tolerancia inherente a uno o más de los herbicidas.

SEC ID NO: 29, con un cambio G408R con relación a SEC ID NO: 1, muestra sólo alrededor de un un cuarto a un tercio de la actividad catalítica de la HPPD de SEC ID NO: 1. Sin embargo, esta deficiencia en la actividad catalítica está más que reconciliada por el incremento de 8X o más en el valor de  $k_{off}$  que gobierna la velocidad de disociación de los compuestos B y E a partir de la enzima. Pruebas adicionales demuestran que la mutación de G408 confiere propiedades ventajosas en la enzima mutante. Por ejemplo, una sustitución G408A tiene actividad catalítica similar a la HPPD de SEC ID NO: 1 ( $k_{cat}/K_m$ ), y muestra, en comparación con SEC ID NO: 1, un incremento de 1,45 veces en la velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) del complejo de enzima:inhibidor con mesotriona. La HPPD mutante de G408A también muestra, con relación a SEC ID NO: 1, un incremento mayor que 1,5X en el valor de  $k_{off}$  con respecto al inhibidor D, y un incremento mayor que 3,5X en el valor de  $k_{off}$  con respecto al inhibidor E. Como tal, los niveles comerciales de tolerancia a los herbicidas de HPPD, y particularmente a las clases estructurales ejemplificadas aquí, se logra más fácilmente a través de las mejoras adicionales conferidas por esas mutaciones descritas.

A fin de proporcionar cualquier grado de tolerancia útil, una mutación debe proporcionar una disminución en la unión al herbicida (medida aquí como un incremento en la velocidad de disociación del herbicida desde la enzima) que, en magnitud numérica supere con creces cualquier déficit catalítico (medido aquí como  $k_{cat}/K_m$ ). Incluso son más valiosas aquellas mutaciones que se pueden combinar juntas entre sí y se pueden incorporar en una variedad de secuencias de HPPD (por ejemplo, las HPPD expuestas en la Tabla 2) para que trabajen en combinación y proporcionen niveles aditivos, o más preferiblemente sinérgicos, de tolerancia a herbicidas con relación a las HPPD nativas.

De este modo, por ejemplo, la HPPD variante de SEC ID NO: 30 derivada de *Avena*, que combina la sustitución A326R de SEC ID NO: 23 con la sustitución L358M de SEC ID NO: 20, proporciona un nivel de resistencia a herbicida de HPPD que supera a aquél de las dos mutaciones individuales, y, de hecho, proporciona un incremento casi multiplicativo. Así, por ejemplo, la HPPD de SEC ID NO: 30 es alrededor de un 3,5 veces más resistente a mesotriona que lo que lo es la SEC ID NO: 1, y de este modo, todo lo demás siendo igual, conferirá un nivel mayor (probablemente alrededor de un 3 o más veces) de tolerancia a mesotriona cuando se expresa igualmente en plantas transgénicas. La misma secuencia de HPPD (es decir, SEC ID NO: 30) también proporciona tolerancia mejorada con respecto a SEC ID NO: 1 en lo que respecta a los otros herbicidas ensayados, y, notablemente, por ejemplo, es alrededor de un 3 veces más tolerante a topramezona y a isoxaflutol (dicetonitrilo) que lo que lo es SEC ID NO: 1. La HPPD de SEC ID NO: 31, que combina la sustitución V217I de SEC ID NO: 21 con la sustitución L358M de SEC ID NO: 20 y la sustitución A326R de SEC ID NO: 23 muestra correspondientemente incluso una mejora aún mayor (~5,8 veces) en la resistencia a mesotriona y a otros herbicidas con relación a la HPPD de SEC ID NO: 1. De forma similar, la HPPD de SEC ID NO: 36, que añade todavía más el cambio I339E de SEC ID NO: 26 a aquellos de SEC ID NO: 31 es incluso más tolerante a mesotriona (~9,8 veces) que lo que lo es la HPPD de SEC ID NO: 1. Esto demuestra que los cambios en todas estas posiciones de aminoácidos se pueden combinar para proporcionar niveles mejorados de tolerancia inherente a herbicidas enzimáticos.

Además, los mismos cambios mutacionales también funcionan y beneficiosamente alteran las características de las HPPD distintas de la SEC ID NO: 1 de *Avena*. De este modo, por ejemplo, SEC ID NO: 40 combina los cambios de aminoácidos equivalentes como en SEC ID NO: 30, pero en este caso en la HPPD de *Alopecurus* de SEC ID NO: 3. Los beneficios de los dos cambios mutacionales y de la enzima HPPD de *Alopecurus* con respecto a *Avena* funcionan aproximadamente de forma multiplicativa de manera que, teniendo en cuenta los valores de  $k_{cat}/K_m$  y de  $k_{off}$ , la HPPD de SEC ID NO: 40 muestra una mejora de más de 10 veces en la tolerancia inherente a mesotriona con relación a SEC ID NO: 1. De forma similar, SEC ID NO: 39 combina los cambios de aminoácidos equivalentes como en SEC ID NO: 31, pero en este caso en la HPPD de *Poa* de SEC ID NO: 7. En consecuencia, SEC ID NO: 39 muestra una tolerancia significativamente mejor al compuesto D (~4,7 mejor que la HPPD de SEC ID NO: 1), que lo que lo hace la HPPD de SEC ID NO: 31 (~3,2 mejor que la HPPD de SEC ID NO: 1). SEC ID NO: 41 también combina los cambios de aminoácidos equivalentes como en SEC ID NO: 31, pero en este caso en la HPPD de *Alopecurus* de SEC ID NO: 3. La HPPD de SEC ID NO: 41 muestra un nivel elevado de tolerancia inherente tanto al compuesto E (~5,8 veces mayor que la HPPD de SEC ID NO: 1) como también a mesotriona (~13,8 veces mayor que la HPPD de SEC ID NO: 1).

#### Ejemplo 4

Preparación y evaluación de tolerancia herbicida conferida por enzimas HPPD heterólogas expresadas en tabaco

En el presente ejemplo, las HPPD nativas y mutantes son, por ejemplo, SEC ID NOs: 1-14 y 20-47. Las secuencias de ADN que codifican a éstas (optimizadas para tabaco, u, opcionalmente, optimizadas en codones según una cosecha diana tal como haba de soja) se preparan sintéticamente y se obtienen comercialmente a partir de GeneArt (Regensburg, Alemania). Cada secuencia se diseña para tener sitios 5' *Nde1* y 3' *BamH1* para facilitar la clonación directa, y después se clona en un vector binario adecuado para la transformación vegetal a base de *Agrobacterium*.

En una realización particular, los genes optimizados para el tabaco que codifican las fusiones N-terminales del péptido de tránsito de cloroplasto de EPSPS de petunia (SEC ID NO: 48) a HPPD SEC ID NOs: 13 y 14, y la HPPD de trigo (SEC ID NO: 5 en la publicación PCT nº WO 02/46387; UNIPROT:A7WK82) se clonan en constructos de expresión y se transforman en tabaco. La secuencia nucleotídica codificante de CTP/HPPD se edita mediante PCR (o se sintetiza inicialmente) para incluir un sitio 5' *XhoI*, un potenciador TMV omega (SEC ID NO: 86) y un sitio de 3' *KpnI* (y para eliminar cualquiera de tales sitios internos).

El casete de expresión, que comprende el líder TMV omega 5', CTP y el gen de 4-HPPD, se corta usando *XhoI/KpnI* y se clona en pBIN 19 digerido de forma similar (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984) detrás de un promotor 35S mejorado doble (SEC ID NO: 87) y delante de un terminador de la transcripción NOS 3' (SEC ID NO: 88), y después se transforma en células competentes de *E. coli* TOP 10. El ADN recuperado de la *E. coli* se usa para transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, y las bacterias transformadas se seleccionan en medio que contiene rifampicina y canamicina. El tejido de tabaco se somete a transformación mediada por *Agrobacterium*, usando métodos conocidos en la técnica o como se describe aquí. Por ejemplo, una placa maestra de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el vector binario que expresa HPPD se usa para inocular 10 ml de LB (caldo L) que contiene 100 mg/l de rifampicina más 50 mg/l de canamicina, usando una única colonia bacteriana. Esto se incuba toda la noche a 28°C, agitando a 200 rpm. Este cultivo nocturno completo se usa para inocular un volumen de 50 ml de LB que contiene el mismo antibiótico. Nuevamente, esto se cultiva toda la noche a 28°C, agitando a 200 rpm. Las células de *Agrobacterium* se peletizan centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos, y después se resuspenden en medio MS (Murashige y Skoog) que contiene 30 g/l de sacarosa, pH 5,9 hasta una OD (600 nM) = 0,6. Esta suspensión se dispensa en alícuotas de 25 ml en cápsulas de Petri.

Cultivos de brotes de tabaco micropropagados de forma clonal se usaron para escindir hojas jóvenes (todavía no expandidas completamente). La nervadura central y los márgenes externos de las hojas se eliminan y se desechan, y la lámina que queda se corta en cuadrados de 1 cm. Estos se transfieren a la suspensión de *Agrobacterium* durante 20 minutos. Los explantes se retiran entonces, se embadurnan en papel de filtro estéril para eliminar la suspensión en exceso, después se transfieren a medio NBM sólido (medio MS que contiene 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de BAP (bencilaminopurina) y 0,1 mg/l de NAA (ácido naftalenoacético) a pH 5,9, y solidificado con 8 g/l de plantagar), con la superficie abaxial de cada explante en contacto con el medio. Se transfirieron aproximadamente 7 explantes por placa, que entonces se cierran herméticamente y se mantienen en una incubadora alumbrada a 25°C durante un fotoperíodo de 16 horas durante 3 días.

Los explantes se transfieren entonces sobre medio NMB que contiene 100 mg/l de canamicina más antibiótico, para evitar el crecimiento adicional de *Agrobacterium* (200 mg/l de timentina con 250 mg/l de carbenicilina). Entonces se llevó a cabo el subcultivo adicional sobre este mismo medio cada 2 semanas.

A medida que los brotes comienzan a regenerarse a partir de las explantas de hojas que forman callos, se retiran a medio de alargamiento de brotes (medio MS, 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de plantagar, 100 mg/l de canamicina, 200 mg/l de timentina, 250 mg/l de carbenicilina, pH 5,9). Las plantas transgénicas estables enraízan fácilmente en 2 semanas. Para proporcionar múltiples plantas por suceso para permitir finalmente ensayar más de un herbicida por planta transgénica, todos los brotes que enraízan se micropropagan para generar 3 o más clones enraizados.

Las plantas transgénicas putativas que están enraizando y que muestran un crecimiento vigoroso del brote en el medio que incorpora canamicina se analizan mediante PCR usando cebadores que amplificaron un fragmento de 500 pb en el transgén de HPPD. La evaluación de este mismo cebador montado en tabaco sin transformar mostró de forma concluyente que estos cebadores no amplificarían secuencias del gen de HPPD de tabaco nativo.

Los brotes transformados se dividen en 2 ó 3 clones y se regeneran a partir de callo resistente a canamicina. Los brotes se enraízan en agar MS que contiene canamicina. Las explantas enraizadas que sobreviven se vuelven a enraizar para proporcionar aproximadamente 40-50 eventos resistentes a canamicina y positivos a PCR a partir de cada evento.

Una vez enraizadas, las plántulas se transfieren desde agar y se ponen en macetas en 50% de turba, 50% de John Innes Soil nº 3 con un fertilizante de liberación lenta en macetas redondas de 3 pulgadas, y se dejan regadas regularmente para establecerse durante 8-12 días en el invernadero. Las condiciones del invernadero

## ES 2 555 386 T3

se ajustaron a alrededor de un 24-27°C día, 18-21°C noche, y aproximadamente un fotoperíodo de 14 horas. La humedad se ajustó a ~65%, y los niveles de luz fueron hasta 2000  $\mu\text{moles}/\text{m}^2$  al nivel del banco.

De este modo se produjeron tres poblaciones transgénicas, cada una de alrededor de un cuarenta plantas de tabaco y que comprenden, como alternativa, un gen de HPPD que codifica la HPPD de trigo HPPD (A7WK82), HPPD SEC ID NO: 12 o HPPD SEC ID NO: 13. Entonces se seleccionó un subconjunto de alrededor de un 30 plantas basándose en el tamaño similar de cada población, para el ensayo de pulverización. Todas las plantas se pulverizaron entonces con 600 g/ha de mesotriol. Se mezcló Callisto® en agua con 0,2-0,25% de tensoactivo X-77®, y se pulverizó desde un brazo de grúa en un pulverizador de carril adecuado que se mueve a 2 mph, con una boquilla a alrededor de un 2 pulgadas desde las partes superiores de la planta. El volumen de pulverización fue 200 l/ha. Las plantas se evaluaron para determinar el daño, y se puntuaron a 14 días después del tratamiento (DAT). Los resultados se representan en la Tabla 6.

Las cajas negras en la Tabla 6 indican que las plantas en ese evento particular fueron verdes, mientras que las cajas grises indican que las plantas estaban parcialmente cloróticas. Las cajas blancas restantes indican que las plantas estaban completamente cloróticas. A partir de los datos representados en la Tabla 6, está claro que, de las HPPD expresadas de forma similar, sólo la HPPD de trigo (A7WK82) había conferido un nivel útil de tolerancia a mesotriona (es decir, normalmente robusta a al menos 2-4X de una tasa de aplicación de campo normal). Por el contrario, las HPPD de SEC ID NO: 13 (procedente de *Arabidopsis*) y SEC ID NO: 14 (procedente de *Pseudomonas fluorescens*) no proporcionaron tolerancia efectiva a la tasa pulverizada. Cinco de 33 eventos de HPPD de trigo mostraron < o igual a 10% de daño (cero a ligera atrofia). Esta diferencia en la tolerancia a mesotriona según la cual HPPD se expresa es completamente consistente tanto con los datos *in vitro* representados en la Tabla 2 (que indican que ni las HPPD de *Arabidopsis* ni las de *Pseudomonas* tienen mucha tolerancia inherente a mesotriona) como también con los datos publicados que describen la superioridad significativa relativa de la HPPD del trigo (tanto *in vitro* como *in planta*) a cualquiera de estos (Hawkes *et al* (2001) en *Proc. Brit Crop Prot. Conf. (Weeds)*, p 563. British Crop Protection Council y Publicación PCT n° WO 02/46387).

Tabla 6

Arabidopsis		Trigo		Pseudomonas	
Evento	Puntuación	Evento	Puntuación	Evento	Puntuación
987	90	1605	90	1897	85
1988	90	1607	0	1898	80
1990	80	1608	15	1899	80
1993	85	1609	30	1905	85
1995	85	1610	80	1908	85
1996	90	1612	75	1909	90
1997	85	1613	80	1918	85
1999	90	1616	50	1920	100
2009	85	1617	65	1927	85
2011	90	1618	70	1928	90
2012	90	1620	0	1929	85
2013	95	1622	20	1930	85
2015	90	1623	30	1931	85
2016	90	1626	75	1934	85
2021	90	1636	85	1936	80
2022	90	1701	70	1937	80
2029	90	1704	75	1938	75
2031	85	1705	75	1939	90

ES 2 555 386 T3

2033	85	1706	10	1940	85
2035	85	1708	15	1943	85
2036	90	1709	90	1944	80
2038	85	1710	5	1945	80
2039	90	1711	85	1951	90
2040	90	1713	70	1952	90
2044	90	1717	75	1953	90
2049	85	1718	80	1954	95
2051	90	1719	5	1955	95
2052	85	1720	70	1956	95
2053	90	1721	15	1957	95
2059	0	1722	90	1958	95
2061	90	1723	15	1965	85
2062	90	1727	35	1966	95
		1728	40		

La Tabla 7 representa una evaluación del daño 14 DAT con 600 g/ha de isoxaflutol de plantas clonales de los mismos eventos como se representan en la Tabla 6, a partir de un experimento llevado a cabo en paralelo al mismo tiempo.

Tabla 7

Arabidopsis		Trigo		Pseudomonas	
Evento	Puntuación	Evento	Puntuación	Evento	Puntuación
987	65	1605	85	1897	70
1988	75	1607	60	1898	50
1990	80	1608	15	1899	50
1993	10	1609	70	1905	65
1995	80	1610	80	1908	90
1996	65	1612	85	1909	95
1997	70	1613	30	1918	70
1999	85	1616	70	1920	
2009	70	1617	80	1927	70
2011	70	1618	10	1928	75
2012	70	1620	65	1929	60
2013	90	1622	80	1930	75
2015	80	1623	65	1931	60
2016	70	1626	90	1934	70
2021	70	1636	35	1936	60

2022	65	1701	65	1937	65
2029	70	1704	90	1938	30
2031	80	1705	65	1939	80
2033	70	1706	25	1940	70
2035	80	1708	25	1943	75
2036	80	1709	90	1944	75
2038	80	1710	40	1945	50
2039		1711	95	1951	68
2040	85	1713	65	1952	75
2044	90	1717	85	1953	68
2049	75	1718	75	1954	68
2051	75	1719	25	1955	55
2052	68	1720	80	1956	55
2053	68	1721	65	1957	70
2059	70	1722	95	1958	68
2061	75	1723	15	1965	80
2062	90	1727	50	1966	75
		1728	68		

Todas las plantas pulverizadas con isoxaflutol fueron dañadas, mostrando sólo 3/33 eventos que expresan HPPD de trigo menos de 20% de daño. Nuevamente, ninguna de las plantas que expresan HPPD de *Arabidopsis* parece apreciablemente resistente, mientras que la HPPD de *Pseudomonas* sí confiere cierto grado de resistencia, mostrando 4/32 plantas un 50% de daño o menos. Nuevamente, esto es ampliamente consistente con los datos genéticos *in vitro* (Tabla 2 y Publicación PCT n° WO 02/46387), que muestran que, aunque exhibe un valor elevado de  $K_m$  para HPP, y por lo tanto muestra un valor relativamente pobre de  $k_{cat}/K_m$ , la HPPD de *Pseudomonas* exhibe un valor relativamente elevado de  $k_{off}$  para el dicetonitrilo de isoxaflutol (es decir, Compuesto D).

Los datos anteriores establecen ampliamente el poder predictivo de determinar la cinética enzimática *in vitro*, como se determina mediante el valor relativo de  $(k_{cat}/K_m) \times k_{off}$ , para anticipar cuánta tolerancia conferirá una HPPD dada a un herbicida de HPPD dado cuando se expresa en una planta de cosecha.

En ejemplos adicionales, genes optimizados para tabaco que codifican HPPD SEC ID NOs. 1 a 14 y HPPD SEC NOs: 20-47 se clonan (esta vez sin ningún CTP) en constructos de expresión, como se describe más abajo, y se transforman en tabaco. La secuencia nucleotídica codificante de HPPD se edita mediante PCR (o se sintetiza inicialmente) para incluir el sitio 5' *XhoI*, un potenciador TMV omega, y un sitio 3' *KpnI* (y para eliminar cualquiera de tales sitios internos). El casete de expresión, que comprende el líder de TMV omega y el gen de 4-HPPD se escinde usando *XhoI/KpnI* y se clona en pBIN 19 digerido de forma similar (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984) detrás de un promotor 35S doble y delante de un terminador transcripcional del gen *Nos*, y después se transforma en células competentes de *E. coli* TOP 10. Nuevamente, se generan poblaciones transgénicas de plantas de tabaco, y se evalúan en el invernadero como se describe anteriormente.

### Ejemplo 5

Construcción de vectores de transformación de haba de soja

Se construyeron vectores binarios para transformación de dicotiledóneas (haba de soja) con un promotor, tal como un promotor sintético que contiene los potenciadores transcripcionales CaMV 35S y FMV que dirigen la expresión de la secuencia codificante de HPPD, tales como SEC ID NOs: 1-8 y 20-41, seguido de un terminador de 3' del gen *Nos*. El gen de HPPD se optimizó en los codones para la expresión de haba de soja basándose en la secuencia de aminoácidos predicha de la región codificante del gen de HPPD. En el caso de que no se use como marcador seleccionable la propia HPPD, se construyen vectores de transformación binarios de *Agrobacterium* que contienen un casete de expresión de HPPD añadiendo un gen marcador seleccionable de la

## ES 2 555 386 T3

- transformación. Por ejemplo, el vector de transformación binario 17900 (SEC ID NO: 51) contiene un casete de expresión que codifica una variante de HPPD (SEC ID NO: 49) enlazado con dos casetes del gen PAT (uno con el promotor 35S y uno con el promotor COMPUESTO, y en los que ambos genes PAT van seguidos por el terminador nos) para la selección a base de glufosinato durante el proceso de transformación. Otro vector de transformación binario (17901; SEC ID NO: 52) contiene un casete de expresión que codifica la variante de HPPD (SEC ID NO: 50) y también un casete de marcador seleccionable de EPSPS. El vector 17901 se transforma en haba de soja, y se obtienen plantas transgénicas usando selección con glifosato usando transformación, mediada por *Agrobacterium*, de dianas de semillas inmaduras. Las secuencias de ADN que codifican los genes de HPPD se optimizan en los codones para la expresión en plantas dicotiledóneas.
- 5
- 10 Los vectores binarios ejemplares descritos anteriormente se construyen usando una combinación de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como PCR de solapamiento, síntesis de ADN, subclonación y ligación de fragmentos de restricción. Sus estructuras únicas se obtienen explícitamente en las Figuras 3 (vector 17900) y Figura 4 (vector 17901) y en los listados de secuencias SEC ID NOs: 51 y 52. A continuación se proporciona información adicional con respecto a los vectores.
- 15 Las abreviaturas usadas en la Figura 3 (vector 17900) se definen según lo siguiente:
- cAvHPPD-04
- Principio: 1024 Final: 2343
- Gen de HPPD de avena optimizado en los codones para haba de soja que codifica SEC ID NO: 49
- cPAT-03-01
- 20 Principio: 3209 Final: 3760
- S. viridochromogenes sintético Hoescht AO2774 PAT, codones vegetales; idéntico a la proteína Q57146 de fosfinotricin acetil transferasa
- cPAT-03-02
- Principio: 5062 Final: 5613
- 25 Proteína fosfinotricin acetil transferasa de S. viridochromogenes PAT Q57146, ADN de cPAT-03-01, con sitios *BamH1*, *Bgl2* mutados
- cSpec-03
- Principio: 6346 Final: 7134
- También denominado *aadA*; gen que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin para mantenimiento del vector en *E. coli* y *Agrobacterium*.
- 30 cVirG-01
- Principio: 7434 Final: 8159
- virG (putativo) procedente de pAD1289 con codón de Principio TTG. virGN54D procede de pAD1289 descrito en Hansen *et al.* 1994, *PNAS* 91:7603-7607
- 35 cRepA-01
- Principio: 8189 Final: 9262
- Proteína de replicación RepA, pVS1
- eNOS-01
- Principio: 168 Final: 259
- 40 Secuencia potenciadora de NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.
- eFMV-03
- Principio: 396 Final: 589
- Región potenciadora del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)
- 45 e35S-05

## ES 2 555 386 T3

Principio: 596 Final: 888

Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador CMV 35S

eTMV-02

Principio: 953 Final: 1020

- 5 Secuencia líder de TMV Omega 5'UTR que se piensa que potencia la expresión. EMBL: TOTMV6

eFMV-03

Principio: 4054 Final: 4247

Región potenciadora procedente del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)

e35S-05

- 10 Principio: 4254 Final: 4546

Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador CMV 35S

eNOS-01

Principio: 4557 Final: 4648

- 15 Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios

bNRB-05

Principio: 4 Final: 259 (complementario)

Región de frontera derecha/ T-DNA de NOS; puede influir en los promotores. EMBL Nos: J01826, V00087, AF485783.

- 20 bNRB-01-01

Principio: 101 Final: 125 (complementario)

Repetición de frontera derecha de T-DNA del plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

bNLB-03

Principio: 5937 Final: 6066 (complementario)

- 25 Región de frontera izquierda de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

Principio: 5972 Final: 5996 (complementario)

Región de repetición de frontera izquierda de 25 pb de T-DNA del plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*

prCMP-04

- 30 Principio: 4655 Final: 5051

Promotor y líder del virus del rizado de la hoja amarilla de galán de noche. Número de Acceso a Genbank®: AF364175. Véase también la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20040086447. prCMP-01 con un truncamiento de un par de bases en el extremo 5', y un truncamiento de 2 pares de bases en el extremo 3'

pr35S-04-01

- 35 Principio: 2664 Final: 3184

Promotor 35S procedente de CMV. EMBL: CAMVG2

oVS1-02

Principio: 9305 Final: 9709

## ES 2 555 386 T3

Origen de replicación y región de partición de plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, *Plasmid* 11: 206-220); similar al Número de Acceso GenBank® U10487; sirve como origen de replicación en el hospedante de *Agrobacterium tumefaciens*

oCOLE-06

5 Principio: 10387 Final: 11193 (complementario)

El origen de replicación de ColE1 funcional en *E. coli* derivó de pUC19

tNOS-05-01

Principio: 2360 Final: 2612

Terminador sintético de nopalina sintetasa

10 tNOS-05-01

Principio: 3794 Final: 4046

Terminador sintético de nopalina sintetasa

tNOS-05-01

Principio: 5642 Final: 5894

15 Terminador sintético de nopalina sintetasa

Las abreviaturas usadas en la Figura 4 (vector 17901) se definen como lo siguiente:

cAmHPPD-01

Principio: 1024 Final: 2346

Gen de HPPD de *Alopecurus myosuroides* optimizado en los codones para tabaco, que codifica SEC ID NO: 50

20 cGmEPSPS-01

Principio: 3675 Final: 5252

Versión optimizada en los codones para haba de soja de ADNc de EPSPS de haba de soja mutante doble

cSpec-03

Principio: 6346 Final: 7134

25 También denominado *aadA*; gen que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina para mantenimiento del vector in *E. coli* y *Agrobacterium*.

cVirG-01

Principio: 7434 Final: 8159

30 *virG* (putativo) procedente de pAD1289 con codón de Principio TTG. *virGN54D* procedió de pAD1289 descrito en Hansen *et al.* 1994, *PNAS* 91:7603-7607

cRepA-01

Principio: 8189 Final: 9262

Proteína de replicación de RepA, pVS1

eNOS-01

35 Principio: 168 Final: 259

Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.

eFMV-03

Principio: 396 Final: 589

## ES 2 555 386 T3

- Región potenciadora del virus del mosaico de la escrofularia (FMV)  
e35S-05  
Principio: 596 Final: 888  
Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador CMV 35S
- 5 eTMV-02  
Principio: 953 Final: 1020  
Secuencia líder de TMV Omega 5'UTR que se piensa que potencia la expresión. EMBL: TOTMV6  
eFMV-03  
Principio: 4054 Final: 4247
- 10 Región potenciadora del virus del mosaico de escrofularia (FMV)  
e35S-05  
Principio: 4254 Final: 4546  
Cambios de pb de C a T y C a A en la región del potenciador CMV 35S  
eNOS-01
- 15 Principio: 4557 Final: 4648  
Secuencia del potenciador NOS putativa procedente de 15235 como se encuentra en la frontera derecha de ciertos vectores binarios.  
bNRB-05  
Principio: 4 Final: 259 (complementario)
- 20 Región de frontera derecha/T-DNA de NOS; puede influir en los promotores. EMBL Nos: J01826, V00087, AF485783.  
bNRB-01-01  
Principio: 101 Final: 125 (complementario)  
Repetición de frontera derecha de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*
- 25 bNLB-03  
Principio: 5937 Final: 6066 (complementario)  
Región de frontera izquierda de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*  
Principio: 5972 Final: 5996 (complementario)
- 30 Región de repetición de frontera izquierda de 25 pb de T-DNA de plásmido ti de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*  
prCMP-04  
Principio: 4655 Final: 5051  
Promotor y líder del virus del rizado de la hoja amarilla de galán de noche. Número de Acceso Genbank® AF364175. Véase también la Publicación de Solicitud U.S. nº 20040086447. prCMP-01 con truncamiento de 1 par de bases en el extremo 5' y truncamiento de 2 pares de bases en el extremo 3'.
- 35 oVS1-02  
Principio: 9305 Final: 9709  
Origen de la replicación y región de partición procedente del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh *et al.* 1984, *Plasmid* 11: 206-220); similar al Número de Acceso GenBank® U10487; sirve como origen de replicación en el hospedante de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 40

oCOLE-06

Principio: 10387 Final: 11193 (complementario)

El origen de replicación de ColE1 funcional en *E. coli* derivó de pUC19

tNOS-05-01

5 Principio: 2360 Final: 2612

Terminador sintético de nopalina sintetasa

tNOS-05-01

Principio: 3794 Final: 4046

Terminador sintético de nopalina sintetasa

10 **Ejemplo 6**

Transformación de haba de soja y selección de plantas resistentes a herbicidas

El material vegetal de haba de soja se puede transformar de forma adecuada y se pueden regenerar plantas fértiles mediante muchos métodos que son bien conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, las plantas transgénicas de haba de soja fértiles morfológicamente normales se pueden obtener mediante: 1) la producción de tejido embriogénico somático procedente de, *por ejemplo*, cotiledón inmaduro, hipocotilo u otro tejido adecuado; 2) transformación mediante bombardeo con partículas o infección con *Agrobacterium*; y 3) regeneración de plantas. En un ejemplo, como se describe en la patente U.S. nº 5.204.944, se corta tejido de cotiledón procedente de embriones inmaduros de haba de soja, preferiblemente al que se le ha eliminado el eje embrionario, y se cultiva en medio que contiene hormonas, para formar material vegetal embriogénico somático. Este material se transforma usando, por ejemplo, métodos de ADN directos, bombardeo con microproyectiles revestidos con ADN o infección con *Agrobacterium*, se cultiva en un medio de selección adecuado y se regenera, opcionalmente también en presencia continua de agente de selección, en plantas de haba de soja transgénicas fértiles. Los agentes de selección pueden ser antibióticos tales como canamicina, higromicina, o herbicidas tales como fosfinotricina o glifosato, o, como alternativa, la selección se puede basar en la expresión de un gen marcador visualizable, tal como GUS. Como alternativa, los tejidos diana para la transformación comprenden tejido meristemático en vez de embriogénico somaclonal, u, opcionalmente, es tejido de flores o formador de flores. Otros ejemplos de transformaciones de haba de soja se pueden encontrar, *por ejemplo*, mediante el método de suministro de ADN físico, tal como bombardeo con partículas (Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182; McCabe *et al.* (1988) *Bio/technology* 6:923-926), triquitas (Khalafalla *et al.* (2006) *African J. of Biotechnology* 5:1594-1599), inyección de haces de aerosol (patente U.S. nº 7.001.754), o mediante métodos de suministro mediados por *Agrobacterium* (Hinchee *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:915-922; patente U.S. nº 7.002.058; Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20040034889; Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20080229447; Paz *et al.* (2006) *Plant Cell Report* 25:206-213). El gen de HPPD también se puede suministrar en un orgánulo tal como un plástido, para conferir resistencia incrementada a herbicidas (véase la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20070039075).

Las plantas transgénicas de haba de soja se pueden generar con los vectores binarios descritos hasta ahora que contienen variantes del gen de HPPD con diferentes métodos de transformación. Opcionalmente, el gen de HPPD puede proporcionar el medio de selección e identificación de tejido transgénico. Por ejemplo, se usó un vector para transformar dianas de semillas inmaduras como se describe (véase, *por ejemplo*, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20080229447) para generar plantas de haba de soja de HPPD transgénicas directamente usando inhibidor de HPPD, tal como mesotriona, como agente de selección. Opcionalmente, los genes de HPPD se pueden presentar en el polinucleótido junto con otras secuencias que proporcionan medios adicionales de selección/identificación de tejido transformado, incluyendo, por ejemplo, los genes conocidos que proporcionan resistencia a canamicina, higromicina, fosfinotricina, butafenacilo, o glifosato. Por ejemplo, vectores binarios diferentes que contienen los genes marcadores seleccionables PAT o EPSPS como se describe en el Ejemplo 4 se transformaron en una diana de semilla de haba de soja inmadura para generar plantas tolerantes a herbicidas de HPPD usando transformación mediada por *Agrobacterium* y selección con glufosinato o glifosato (véase, *por ejemplo*, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20080229447).

Como alternativa, las secuencias marcadoras seleccionables pueden estar presentes en polinucleótidos separados, y se usa un proceso de, por ejemplo, cotransformación y coselección. Como alternativa, en lugar de un gen marcador seleccionable, se puede usar un gen marcador puntuable, tal como GUS, para identificar un tejido transformado.

Se puede usar un método a base de *Agrobacterium* para la transformación de haba de soja para generar plantas transgénicas usando glufosinato, glifosato o inhibidor de HPPD mesotriona como agente de selección, usando semillas de haba de soja inmaduras como se describe (Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20080229447).

**Ejemplo 7**

Crecimiento de plantas transgénicas T<sub>0</sub> de haba de soja, análisis y evaluación de la tolerancia a herbicidas

5 Se llevaron plantas T<sub>0</sub> procedentes de cultivo de tejido al invernadero, en el que se transplantaron en suelo saturado con agua (mezcla para cepellones y plántulas Redi-Earth®, Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) mezclado con 1% de Marathon® granular (Olympic Horticultural Products, Co., Mainland, PA) a 5-10 g/gal de mezcla Redi-Earth® en macetas cuadradas de 2". Las plantas se cubrieron con cúpulas para la humedad y se colocaron en una cámara Conviron (Pembina, ND) con las siguientes condiciones medioambientales: 24°C día; 18°C noche; fotoperíodo de 16 h de luz-8 h de oscuridad; y humedad relativa de 80%.

10 Después de que las plantas se establecen en el suelo y aparecen nuevos crecimientos (~1-2 semanas), se toman muestras de las plantas y se ensayan para determinar la presencia del transgén deseado mediante análisis Taqman™ usando sondas apropiadas para los genes de HPPD, o promotores (por ejemplo prCMP y prUBq3). Todas las plantas positivas y varias plantas negativas se transplantaron en macetas cuadradas de 4" que contienen suelo MetroMix® 380 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA). Se incorpora un fertilizante de liberación lenta Sierra 17-6-12 en el suelo, a la tasa recomendada. Las plantas negativas sirven como controles para el experimento de pulverización. Las plantas se vuelven a colocar entonces en un invernadero estándar para aclimatizarlas (~1 semana). Las condiciones medioambientales son típicamente: 27°C día; 21°C noche; fotoperíodo de 16 h (con luz ambiental); humedad ambiental. Después de aclimatarse (~1 semana), las plantas están listas para ser pulverizadas con los herbicidas deseados. Se hacen crecer plantas transgénicas de haba de soja tolerantes a herbicidas hasta madurez, para la producción de semillas. Las semillas transgénicas y las plantas de la progenie se usan para evaluar posteriormente su comportamiento de tolerancia a herbicidas y sus características moleculares.

20 De este modo, las plantas de haba de soja T1 del vector 17900 (Figura 3) y del vector 17901 (Figura 4), que expresan, como alternativa, SEC ID NO: 49 y SEC ID NO: 50 procedentes de casetes de expresión idénticos, se hacen crecer y se ensayan para determinar la tolerancia a un intervalo de herbicidas de HPPD, en comparación con plantas similares, que expresan similarmente SEC ID NO: 1 de HPPD.

25

Todas las patentes, solicitudes y publicaciones de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

# ES 2 555 386 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG  
 Hawkes, Timothy R  
 Langford, Michael P  
 Viner, Russell C  
 Vernooij, Bernard TM  
 Dale, Richard  
 Singh, Shradha  
 Kramer, Vance

<120> Nuevos Polipéptidos De Hidroxifenilpiruvato Dioxigenasa Y Métodos De Uso

<130> S305 1021PCT 63367.0139.1

<150> 61/224.661  
 <151> 2009-07-10

<150> 12/692.552  
 <151> 2010-01-22

<150> 61/146.513  
 <151> 2009-01-22

<160> 88

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

<400> 1

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

# ES 2 555 386 T3

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



# ES 2 555 386 T3

	195	200	205
5	Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe 210	Asp His Val Val Gly 215	Asn Val Pro Glu 220
10	Met Ala Pro Val Ala Ala Tyr Met Lys Gly Phe Thr Gly Phe His Glu 225	230	235 240
15	Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu 245	250	255
20	Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu 260	265	270
25	Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr 275	280	285
30	Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser 290	295	300
35	Ser Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met 305	310	315 320
40	Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly 325	330	335
45	Val Arg Arg Leu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu 340	345	350
50	Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu 355	360	365
55	Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Arg Pro Thr Phe Phe 370	375	380
60	Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly 385	390	395 400
65	Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe 405	410	415
70	Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala 420	425	430
75	Lys Gln Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser 435	440	
80	<210> 3		
85	<211> 440		
90	<212> PRT		
95	<213> Alopecurus myosuroides		

# ES 2 555 386 T3

<400> 3

5	Met 1	Pro	Pro	Thr	Thr 5	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly 10	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala 15	Val
10	Thr	Pro	Glu	His 20	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe 25	Pro	Arg	Val	Val	Arg 30	Val	Asn
15	Pro	Arg	Ser 35	Asp	Arg	Phe	Pro	Val 40	Leu	Ala	Phe	His	His 45	Val	Glu	Phe
20	Trp	Cys 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser 55	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe 60	Ser	Phe	Ala	Leu
25	Gly 65	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala 70	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser 75	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser 80
30	His	Ala	Ser	His	Leu 85	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala 90	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe 95	Thr
35	Ala	Pro	Tyr	Ala 100	Pro	Pro	Pro	Gln	Asp 105	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Thr
40	Ala	Ser	Ile 115	Pro	Ser	Phe	Ser	Thr 120	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr 125	Phe	Ser	Ser
45	Ala	His 130	Gly	Leu	Ala	Val	Arg 135	Ser	Val	Ala	Ile	Arg 140	Val	Ala	Asp	Ala
50	Ala	Glu	Ala	Phe	His	Thr 150	Ser	Val	Ala	Gly	Gly 155	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe 160
55	Ala	Pro	Ala	Asp	Leu 165	Gly	Ser	Gly	Phe	Gly 170	Leu	Ala	Glu	Val	Glu 175	Leu
60	Tyr	Gly	Asp	Val 180	Val	Leu	Arg	Phe	Val 185	Ser	His	Pro	Asp	Gly 190	Asp	Asp
65	Val	Pro	Phe 195	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu 200	Gly	Val	Ser	Arg	Pro 205	Gly	Ala	Met
70	Asp	Tyr 210	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe 215	Asp	His	Val	Val	Gly 220	Asn	Val	Pro	Glu
75	Met	Ala	Pro	Val	Ala	Ala 230	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe 235	Thr	Gly	Phe	His	Glu 240
80	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr 245	Ala	Glu	Asp	Val	Gly 250	Thr	Ala	Glu	Ser	Gly 255	Leu
85	Asn	Ser	Val	Val 260	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser 265	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu



# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Val Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys Glu  
 340 345 350  
 5  
 Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu  
 355 360 365  
 10  
 Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu  
 370 375 380  
 15  
 Glu Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln  
 385 390 395 400  
 20  
 Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser  
 405 410 415  
 25  
 Gln Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys  
 420 425 430  
 30  
 Gln Ala Ala Ala Ala Gln Gly Pro  
 435 440  
 35  
 <210> 5  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Sorghum halepense  
 40  
 Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Val Ala  
 1 5 10 15  
 45  
 Ala Ala Ser Ala Glu Gln Ala Ala Phe Arg Leu Val Gly His Arg Asn  
 20 25 30  
 50  
 Phe Val Arg Val Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ala Phe  
 35 40 45  
 55  
 His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser  
 65 70 75 80  
 60  
 Thr Gly Asn Thr Ala His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu  
 85 90 95  
 65  
 Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ala His Gly Ala Asp Ala Ala Thr  
 100 105 110  
 70  
 Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser Ala Ala Glu Ala Arg Arg Phe Ala Ala  
 115 120 125

# ES 2 555 386 T3

	Asp	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	
	130						135					140					
5	Glu	Asp	Ala	Phe	Arg	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	
	145					150					155					160	
10	Glu	Pro	Val	Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Arg	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	
					165					170					175		
15	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Tyr	Val	Ser	Tyr	Pro	Thr	Thr	Arg	Thr	
				180					185						190		
20	Arg	Pro	Ser	Cys	Arg	Gly	Ser	Trp	Ala	Asp	Asp	Ala	Asp	Ala	Ser	Phe	
			195					200					205				
25	Leu	Pro	Gly	Phe	Val	Gly	Val	Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Ala	Asp	Tyr	Gly	
	210						215					220					
30	Ala	Ala	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe	Ala	Glu	
					245					250					255		
35	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Met	
				260					265					270			
40	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ala	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	
			275					280					285				
45	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Met	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Asp	Val	
	305					310					315					320	
50	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Glu	Met	Gln	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Gly	Gly	Phe	
					325					330					335		
55	Glu	Phe	Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Val	Arg	Arg	
				340					345					350			
60	Arg	Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Thr	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Glu	
			355					360					365				
65	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	
	370						375					380					
65	Phe	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Glu	Ile	Ile	
	385					390					395					400	

# ES 2 555 386 T3

Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly Gln Glu Tyr Gln  
 405 410 415

5 Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Gln Leu Phe  
 420 425 430

10 Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ala Ala  
 435 440 445

15 Ala Ala Gln Gly Pro  
 450

<210> 6  
 <211> 436  
 <212> PRT  
 20 <213> Poa annua  
 <400> 6

25 Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro  
 1 5 10 15

30 Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg  
 20 25 30

35 Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys  
 35 40 45

40 Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala  
 50 55 60

45 Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala  
 65 70 75 80

50 Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe  
 100 105 110

55 Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val  
 115 120 125

60 Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala  
 130 135 140

65 Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly  
 145 150 155 160

Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu  
 165 170 175

Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Pro Phe Leu Pro

# ES 2 555 386 T3

	180		185		190	
5	Gly Phe Glu Ala Val Ser Arg Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu 195 200 205					
10	Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val 210 215 220					
15	Ile Asp Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe 225 230 235 240					
20	Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val 245 250 255					
25	Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val 260 265 270					
30	His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His 275 280 285					
35	Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val Leu 290 295 300					
40	Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu 305 310 315 320					
45	Phe Met Ala Pro Pro Gln Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile 325 330 335					
50	Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu 340 345 350					
55	Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe 355 360 365					
60	Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln 370 375 380					
65	Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys 385 390 395 400					
70	Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys 405 410 415					
75	Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val 420 425 430					
80	Ala Gln Gln Ser 435					

<210> 7

# ES 2 555 386 T3

<211> 434  
 <212> PRT  
 <213> Poa annua

5 <400> 7

Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro  
 1 5 10 15

10 Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg  
 20 25 30

15 Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys  
 35 40 45

20 Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala  
 50 55 60

25 Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala  
 65 70 75 80

30 Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro  
 85 90 95

35 Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe  
 100 105 110

40 Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val  
 115 120 125

45 Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala  
 130 135 140

50 Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly  
 145 150 155 160

55 Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu  
 165 170 175

60 Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Phe Leu Pro Gly  
 180 185 190

65 Phe Glu Ala Val Ser Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg  
 195 200 205

70 Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val Ile Asp  
 210 215 220

75 Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala  
 225 230 235 240

80 Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala  
 245 250 255

ES 2 555 386 T3

5 Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly  
 260 265 270  
 10 Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His Gly Gly  
 275 280 285  
 15 Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr  
 290 295 300  
 20 Ala Pro Pro Gln Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly  
 305 310 315 320  
 25 Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val  
 325 330 335 340 345 350  
 30 Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys  
 355 360 365  
 35 Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile  
 370 375 380  
 40 Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly  
 385 390 395 400  
 45 Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile  
 405 410 415  
 50 Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val Ala Gln  
 420 425 430  
 55 Gln Ser  
 <210> 8  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> Lolium multiflorum  
 60 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
 65 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

# ES 2 555 386 T3

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
 5  
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
 10 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95  
 15 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr  
 100 105 110  
 20 Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala  
 115 120 125  
 25 Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala  
 130 135 140  
 30 Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu  
 145 150 155 160  
 35 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp  
 180 185 190  
 40 Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val  
 195 200 205  
 45 Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu  
 210 215 220  
 50 Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu  
 225 230 235 240  
 55 Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu  
 245 250 255  
 60 Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Asn Val Leu Leu Pro Leu  
 260 265 270  
 Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr  
 275 280 285  
 65 Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser  
 290 295 300  
 Thr Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met  
 305 310 315 320



# ES 2 555 386 T3

Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro Ser Phe Ser Ala Pro Thr Ala Arg  
 115 120 125

5 Arg Phe Ala Ala Asp His Gly Leu Ala Val Arg Ala Ile Ala Leu Arg  
 130 135 140

10 Val Ala Asp Ala Glu Asp Ala Phe Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ala  
 145 150 155 160

15 Arg Pro Ala Phe Glu Pro Ala Glu Leu Gly Leu Gly Phe Arg Leu Ala  
 165 170 175

20 Glu Val Glu Leu Tyr Gly Glu Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Pro  
 180 185 190

25 Asp Ala Ala Gly Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Glu Val Arg Asn  
 195 200 205

30 Pro Arg Ala Val Asp Tyr Gly Leu Lys Arg Phe Asp His Ile Val Gly  
 210 215 220

35 Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Val Ala Ala Tyr Val Ala Gly Phe Thr  
 225 230 235 240

40 Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala  
 245 250 255

45 Glu Ser Gly Leu Asn Ser Met Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Thr Val  
 260 265 270

50 Leu Ile Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln  
 275 280 285

55 Ile Gln Thr Phe Leu Glu His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile  
 290 295 300

60 Ala Leu Ala Ser Asp Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala  
 305 310 315 320

65 Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Pro Pro Asp  
 325 330 335

70 Tyr Tyr Asp Gly Val Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala  
 340 345 350

75 Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp  
 355 360 365

80 Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro  
 370 375 380

# ES 2 555 386 T3

Thr Phe Phe Leu Glu Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp  
 385 390 395 400

5 Glu Gln Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys  
 405 410 415

10 Gly Asn Phe Ser Gln Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser  
 420 425 430

15 Leu Glu Val Lys Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435 440

20 <210> 10  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Bidens subalternans  
 <400> 10

25 Met Gly Thr Glu Ala Asn Thr Thr Phe Thr Gly Glu Gln Gln Ser Thr  
 1 5 10 15

30 Gln Ala Phe Lys Leu Val Gly Phe Arg Asn Phe Ile Arg Thr Asn Pro  
 20 25 30

35 Lys Ser Asp Lys Phe Thr Val Lys Arg Phe His His Val Glu Phe Trp  
 35 40 45

40 Cys Ser Asp Ala Thr Asn Thr Ser Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly  
 50 55 60

45 Met Pro Ile Leu Leu Lys Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Thr Val His  
 65 70 75 80

50 Ala Ser Tyr Leu Ile Arg Ser Gly His Leu Asn Phe Leu Phe Thr Ala  
 85 90 95

55 Pro Tyr Ser Pro Ser Ile Thr Thr Thr Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 100 105 110

60 Ser Ile Pro Ser Phe Ser His Thr Val Cys Arg Asp Phe Thr Gly Lys  
 115 120 125

65 His Gly Leu Ala Val Arg Ala Ile Ala Val Glu Val Glu Asp Ala Glu  
 130 135 140

70 Thr Ala Phe Ala Val Ser Val Ala Asn Gly Ala Lys Pro Ser Cys Thr  
 145 150 155 160

75 Pro Val Thr Ile Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gln Asn Asp Val  
 165 170 175

Val Val Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg

# ES 2 555 386 T3

	180		185		190
5	Tyr Val Ser Tyr Lys Asn Pro Asn Leu Glu Thr Asn Leu Lys Phe Leu 195 200 205				
10	Pro Gly Phe Glu Pro Val Glu Ala Thr Ser Ser Phe Pro Asp Leu Asp 210 215 220				
15	Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu 225 230 235 240				
20	Ala Pro Ala Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Thr Gly Phe His Glu Phe 245 250 255				
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ser Glu Ser Gly Leu Asn 260 265 270				
30	Ser Val Val Leu Ala Cys Asn Ser Glu Glu Val Leu Leu Pro Met Asn 275 280 285				
35	Glu Pro Val Tyr Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 290 295 300				
40	Glu His Asn Glu Gly Ala Gly Val Gln His Leu Ala Leu Ala Ser Glu 305 310 315 320				
45	Asp Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Gly Val Gly 325 330 335				
50	Gly Phe Glu Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Arg Asn Leu 340 345 350				
55	Lys Asn Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Asp Glu Gln Ile Lys Glu Cys 355 360 365				
60	Glu Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu 370 375 380				
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu 385 390 395 400				
70	Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Val Lys Asp Asp Glu Gly Asn Val 405 410 415				
75	Gln Gln Lys Ala Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 420 425 430				
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Arg Val 435 440 445				
85	Ala Thr Ala Thr Ala				

# ES 2 555 386 T3

450

5 <210> 11  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> *Bidens pilosa*

10 <400> 11  
 Met Gly Thr Glu Ala Asn Thr Thr Phe Thr Gly Glu Gln Gln Gln Gln  
 1 5 10 15

15 Gln Ser Thr Gln Pro Phe Lys Leu Val Gly Phe Lys Asn Phe Ile Arg  
 20 25 30

20 Thr Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Thr Val Lys Arg Phe His His Val  
 35 40 45

25 Glu Phe Trp Cys Ser Asp Ala Thr Asn Thr Ser Arg Arg Phe Ser Trp  
 50 55 60

30 Gly Leu Gly Met Pro Ile Val Leu Lys Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn  
 65 70 75 80

35 Ser Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Asn Phe Leu  
 85 90 95

40 Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Ile Thr Thr Thr Gly Ser Thr Ser  
 100 105 110

45 Ser Ser Ile Pro Ser Phe Ser His Thr Val Cys Arg Asp Phe Thr Gly  
 115 120 125

50 Lys His Gly Leu Ala Val Arg Ala Ile Ala Val Glu Val Glu Asp Ala  
 130 135 140

55 Glu Thr Ala Phe Ala Val Ser Val Ala Asn Gly Ala Lys Pro Ser Cys  
 145 150 155 160

60 Ala Pro Val Thr Ile Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asp Asn Gln Asn Asp  
 165 170 175

65 Val Val Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg  
 180 185 190

70 Tyr Val Ser Tyr Lys Asn Pro Asn Leu Glu Thr Asn Leu Asn Asn Leu  
 195 200 205

75 Lys Ile Leu Pro Gly Phe Glu Pro Val Glu Thr Thr Ser Ser Phe Pro  
 210 215 220

80 Asp Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val  
 225 230 235 240

ES 2 555 386 T3

5 Pro Glu Leu Ala Lys Ala Val Asp Tyr Val Lys Ser Phe Thr Gly Phe  
245 250 255

10 His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ser Glu Ser  
260 265 270

15 Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala Cys Asn Ser Glu Glu Val Leu Ile  
275 280 285

20 Pro Met Asn Glu Pro Val Tyr Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln  
290 295 300

25 Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala Gly Val Gln His Leu Ala Leu  
305 310 315 320

30 Ala Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser  
325 330 335

35 Gly Val Gly Gly Phe Glu Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr  
340 345 350

40 Arg Asn Leu Lys Asn Arg Ala Gly Asp Val Leu Ser Asp Glu Gln Ile  
355 360 365

45 Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly  
370 375 380

50 Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Ile  
385 390 395 400

55 Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Asp Glu  
405 410 415

60 Gly Lys Val Gln Gln Lys Ala Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn  
420 425 430

65 Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu  
435 440 445

<210> 12  
<211> 436  
<212> PRT  
<213> Brachypodium arbuscula

<400> 12

Met Pro Pro Pro Ala Thr Thr Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Val Thr  
1 5 10 15

# ES 2 555 386 T3

Pro Glu His Ala Arg Pro Pro Arg Arg Val Ala Arg Val Asn Pro Arg  
 20 25 30  
 5  
 Ser Asp Arg Phe Ser Ala Leu Ser Phe His His Val Glu Leu Trp Cys  
 35 40 45  
 10  
 Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala  
 50 55 60  
 15  
 Pro Pro Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala  
 65 70 75 80  
 20  
 Ser Ile Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro  
 85 90 95  
 25  
 Tyr Ala Pro Ser Pro Ala Ser Asp Ser Ala Ala Ser Ile Pro Ser Phe  
 100 105 110  
 30  
 Ser Ala Ser Ala Ala Arg Gln Phe Thr Ala Asp His Gly Gly Leu Ala  
 115 120 125  
 35  
 Val Arg Ala Val Ala Leu Arg Val Ser Ser Ala Ser Asp Ala Phe His  
 130 135 140  
 40  
 Ala Ser Val Ser Ala Gly Ala Arg Pro Ser Phe Pro Pro Ala Asp Leu  
 145 150 155 160  
 45  
 Gly Gln Gly Phe Ala Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val  
 165 170 175  
 50  
 Leu Arg Phe Ile Ser His Pro Asp Glu Asn Thr Glu Ile Pro Phe Leu  
 180 185 190  
 55  
 Pro Gly Phe Glu Ser Val Ser Asn Pro Gly Ala Ser Thr Tyr Gly Leu  
 195 200 205  
 60  
 Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Ser Leu Ala Pro Val  
 210 215 220  
 65  
 Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe  
 225 230 235 240  
 70  
 Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Asp Ser Gly Leu Asn Ser Val Val  
 245 250 255  
 75  
 Leu Ala Asn Asn Ser Glu Arg Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val  
 260 265 270  
 80  
 His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Asp His His  
 275 280 285

# ES 2 555 386 T3

Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asp Asp Val Leu  
 290 295 300

5

Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu  
 305 310 315 320

10

Phe Leu Ala Pro Pro Pro Pro Asn Tyr Tyr Asp Gly Val Arg Arg Arg  
 325 330 335

15

Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu  
 340 345 350

20

Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe  
 355 360 365

25

Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln  
 370 375 380

30

Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln Glu Gln Gln Lys  
 385 390 400

35

Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Arg  
 405 410 415

40

Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val  
 420 425 430

Val Gln Glu Ser  
 435

45

<210> 13  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 13

50

Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp  
 1 5 10 15

55

Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe  
 20 25 30

60

Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His  
 35 40 45

65

His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe  
 50 55 60

Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr  
 65 70 75 80

# ES 2 555 386 T3

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



# ES 2 555 386 T3

	145	150	155	160
5	Asp His Leu Thr	His Asn Val Tyr Arg	Gly Arg Met Ala Tyr Trp Ala	
		165	170	175
10	Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp			
		180	185	190
15	Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro			
		195	200	205
20	Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala			
		210	215	220
25	Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln			
		225	230	235
30	His Val Ala Phe Leu Thr Glu Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu			
		245	250	255
35	Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr			
		260	265	270
40	Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asn His Gly Glu Pro Val Asp Gln			
		275	280	285
45	Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ile Glu Gly Asp			
		290	295	300
50	Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val			
		305	310	315
55	Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Glu Gly			
		325	330	335
60	Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg			
		340	345	350
65	Gly Val Leu Thr Thr Asp			
		355		
70	<210> 15			
	<211> 7			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia Artificial			
75	<220>			
	<223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa			
80	<220>			
	<221> VARIANTE			
	<222> (1)..(1)			
	<223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de L, I o R			

## ES 2 555 386 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Xaa = V o A

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 10 <223> Xaa = G o A

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7)..(7)  
 15 <223> Xaa = S o T

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Asp Val Leu Xaa  
 20 1 5

<210> 16  
 <211> 6  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa  
 30

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 35 <223> Xaa = I o V

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 40 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de L

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(6)  
 45 <223> Xaa = R o K

<400> 16

Gly Xaa Xaa Val Asp Xaa  
 50 1 5

<210> 17  
 <211> 6  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa  
 60

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 65 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de V, I o M

<400> 17

# ES 2 555 386 T3

Asp His Xaa Val Gly Asn  
 1 5

5 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = E o D

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa = M o L

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de A o P

30 <400> 18  
 Gly Gly Phe Xaa Phe Xaa Xaa  
 1 5

35 <210> 19  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Motivo de secuencia de HPPD derivada de Avena sativa

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido distinto de K

50 <400> 19  
 Cys Gly Gly Phe Gly Xaa Gly Asn  
 1 5

55 <210> 20  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

60 <400> 20  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

65 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

# ES 2 555 386 T3

	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	Pro	Val	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Leu
			35					40					45			
5	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu
		50					55					60				
10	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala
	65					70					75					80
15	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr
				85						90					95	
20	Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala
				100					105					110		
25	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala
			115					120					125			
30	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala
	130						135					140				
35	Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala
	145					150						155				160
40	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr
				165						170					175	
45	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	Leu
				180					185					190		
50	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Asp
			195					200					205			
55	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Met
	210						215					220				
60	Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	Phe
	225					230						235				240
65	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn
				245						250					255	
70	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn
				260					265					270		
75	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu
			275					280					285			
80	Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn
	290						295					300				

# ES 2 555 386 T3

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320

5

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

10

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

15

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360 365

20

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

25

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

30

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

35

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

35

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

40

<210> 21  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

45

<400> 21

45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

65

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

5 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

10 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

15 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

20 <210> 22  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

25 <400> 22

30 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

35 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

40 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

45 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

50 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

55 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

60 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

65 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr

# ES 2 555 386 T3

	165	170	175
5	Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu 180	185	190
10	Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195	200	205
15	Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Leu Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210	215	220
20	Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225	230	235
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245	250	255
30	Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260	265	270
35	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275	280	285
40	Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290	295	300
45	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305	310	315
50	Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325	330	335
55	Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340	345	350
60	Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355	360	365
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370	375	380
70	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385	390	395
75	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405	410	415
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420	425	430
85	Ser Val Val Ala Gln Lys Ser		

# ES 2 555 386 T3

435

5 <210> 23  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

10 <400> 23  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

15 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

20 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

25 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

30 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

35 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

40 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

45 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

50 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

55 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

60 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175

65 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190

70 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205

75 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220

80 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240

ES 2 555 386 T3

5 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
245 250 255

10 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
260 265 270

15 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
275 280 285

20 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
290 295 300

25 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
305 310 315 320

30 Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
325 330 335

35 Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
340 345 350

40 Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
355 360 365

45 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
370 375 380

50 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
385 390 395 400

55 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
405 410 415

60 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
420 425 430

65 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
435

70 <210> 24  
<211> 439  
<212> PRT  
<213> Avena sativa

75 <400> 24

80 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
1 5 10 15

85 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
20 25 30

# ES 2 555 386 T3

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
 5  
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
 10  
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
 15  
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95  
 20  
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 25  
 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
 30  
 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
 35  
 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
 40  
 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
 45  
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
 50  
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240  
 55  
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
 245 250 255  
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
 260 265 270  
 60  
 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
 275 280 285  
 65  
 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
 290 295 300

# ES 2 555 386 T3

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320

5

Gly Phe Glu Phe Met Lys Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

10

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

15

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360 365

20

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

25

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

30

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

35

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

40

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

<210> 25  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

65

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

70

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

5 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

10 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

15 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

20 <210> 26  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

25 <400> 26

30 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

35 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

40 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

45 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

50 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

55 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

60 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

65 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr

# ES 2 555 386 T3

	165	170	175
5	Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu 180	185	190
10	Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195	200	205
15	Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210	215	220
20	Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225	230	235
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245	250	255
30	Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260	265	270
35	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275	280	285
40	Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290	295	300
45	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305	310	315
50	Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325	330	335
55	Arg Arg Glu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340	345	350
60	Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355	360	365
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370	375	380
70	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385	390	395
75	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405	410	415
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420	425	430
85	Ser Val Val Ala Gln Lys Ser		

# ES 2 555 386 T3

435

5 <210> 27  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa  
  
 10 <400> 27  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
  
 15 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
  
 20 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
  
 25 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
  
 30 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
  
 35 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90  
  
 40 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
  
 45 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
  
 50 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
  
 55 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
  
 60 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
  
 65 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
  
 70 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
  
 75 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
  
 80 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240

# ES 2 555 386 T3

5 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
                                   245                                  250                                  255

10 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
                                   260                                  265                                  270

15 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
                                   275                                  280                                  285

20 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
                                   290                                  295                                  300

25 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
                                   305                                  310                                  315                                  320

30 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
                                   325                                  330                                  335

35 Arg Arg Asp Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
                                   340                                  345                                  350

40 Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
                                   355                                  360                                  365

45 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
                                   370                                  375                                  380

50 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
                                   385                                  390                                  395                                  400

55 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
                                   405                                  410                                  415

60 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
                                   420                                  425                                  430

65 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
                                   435

70 <210> 28  
       <211> 439  
       <212> PRT  
       <213> Avena sativa

75 <400> 28

80 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
       1          5          10          15

85 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
                                   20                                  25                                  30

# ES 2 555 386 T3

	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	Pro	Val	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Leu
			35					40					45			
5	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu
		50					55					60				
10	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala
	65					70					75					80
15	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr
				85						90					95	
20	Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala
				100					105					110		
25	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala
			115					120					125			
30	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala
	130						135					140				
35	Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala
	145					150					155					160
40	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr
				165						170					175	
45	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	Leu
				180					185					190		
50	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Asp
			195					200					205			
55	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Met
	210						215					220				
60	Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	Phe
	225					230					235					240
65	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn
				245						250					255	
70	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn
				260					265					270		
75	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu
			275					280					285			
80	Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn
	290						295					300				

# ES 2 555 386 T3

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320

5

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

10

Arg Arg Cys Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

15

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360 365

20

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

25

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

30

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

35

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

40

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

<210> 29  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

65

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

70

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

5 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

10 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Arg Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

15 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

20 <210> 30  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

25 <400> 30

30 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

35 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

40 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

45 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

50 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

55 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

60 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

65 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr

# ES 2 555 386 T3

	165	170	175
5	Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu 180	185	190
10	Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195	200	205
15	Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210	215	220
20	Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225	230	235
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245	250	255
30	Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260	265	270
35	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275	280	285
40	Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290	295	300
45	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305	310	315
50	Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325	330	335
55	Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340	345	350
60	Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355	360	365
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370	375	380
70	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385	390	395
75	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405	410	415
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420	425	430
85	Ser Val Val Ala Gln Lys Ser		

ES 2 555 386 T3

435

5 <210> 31  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa  
  
 10 <400> 31  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
  
 15 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
  
 20 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
  
 25 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
  
 30 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
  
 35 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90  
  
 40 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
  
 45 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
  
 50 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
  
 55 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
  
 60 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
  
 65 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
  
 70 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
  
 75 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
  
 80 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240



# ES 2 555 386 T3

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
 5  
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
 10  
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
 15  
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95  
 20  
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 25  
 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
 30  
 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
 35  
 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
 40  
 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
 45  
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
 50  
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240  
 55  
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
 245 250 255  
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
 260 265 270  
 60  
 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
 275 280 285  
 65  
 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
 290 295 300

# ES 2 555 386 T3

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320

5

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

10

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

15

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360 365

20

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

25

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

30

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

35

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

40

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

<210> 33  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

65

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

5 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

10 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

15 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

20 <210> 34  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

25 <400> 34

30 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

35 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

40 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

45 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

50 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

55 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

60 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

65 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr

# ES 2 555 386 T3

	165	170	175
5	Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu 180	185	190
10	Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195	200	205
15	Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210	215	220
20	Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225	230	235
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245	250	255
30	Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260	265	270
35	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275	280	285
40	Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290	295	300
45	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305	310	315
50	Gly Phe Glu Phe Met Lys Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325	330	335
55	Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340	345	350
60	Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355	360	365
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370	375	380
70	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385	390	395
75	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405	410	415
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420	425	430
85	Ser Val Val Ala Gln Lys Ser		

# ES 2 555 386 T3

435

5 <210> 35  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa  
  
 10 <400> 35  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
  
 15 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
  
 20 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
  
 25 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
  
 30 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
  
 35 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90  
  
 40 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
  
 45 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
  
 50 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
  
 55 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
  
 60 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
  
 65 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
  
 70 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
  
 75 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Leu Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
  
 80 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240

ES 2 555 386 T3

5 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
245 250 255

10 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
260 265 270

15 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
275 280 285

20 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
290 295 300

25 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
305 310 315 320

30 Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
325 330 335

35 Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
340 345 350

40 Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
355 360 365

45 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
370 375 380

50 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
385 390 395 400

55 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
405 410 415

60 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
420 425 430

65 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
435

<210> 36  
<211> 439  
<212> PRT  
<213> Avena sativa

<400> 36

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
20 25 30

# ES 2 555 386 T3

	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	Pro	Val	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Leu
			35					40					45			
5	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu
		50					55					60				
10	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala
	65					70					75					80
15	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr
				85						90					95	
20	Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala
				100					105						110	
25	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala
			115					120					125			
30	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala
	130						135					140				
35	Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala
	145					150						155				160
40	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr
				165						170					175	
45	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	Leu
				180					185					190		
50	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Asp
			195					200					205			
55	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Ile	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Met
	210						215					220				
60	Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	Phe
	225					230						235				240
65	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn
					245					250					255	
70	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn
				260					265					270		
75	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu
			275					280						285		
80	Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn
	290						295					300				

# ES 2 555 386 T3

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320

5

Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

10

Arg Arg Glu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

15

Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360 365

20

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

25

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

30

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

35

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

40

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

<210> 37  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

65

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

70

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

5 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

10 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

15 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

20 <210> 38  
 <211> 434  
 <212> PRT  
 <213> Poa annua

25 <400> 38

30 Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro  
 1 5 10 15

35 Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg  
 20 25 30

40 Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys  
 35 40 45

45 Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala  
 50 55 60

50 Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala  
 65 70 75 80

55 Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro  
 85 90 95

60 Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe  
 100 105 110

65 Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val  
 115 120 125

Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala  
 130 135 140

Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly  
 145 150 155 160

Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu

# ES 2 555 386 T3

	165	170	175
5	Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Phe Leu Pro Gly 180	185	190
10	Phe Glu Ala Val Ser Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg 195	200	205
15	Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val Ile Asp 210	215	220
20	Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala 225	230	235
25	Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala 245	250	255
30	Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly 260	265	270
35	Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His Gly Gly 275	280	285
40	Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr 290	295	300
45	Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu Phe Met 305	310	315
50	Arg Pro Pro Gln Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly 325	330	335
55	Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val 340	345	350
60	Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys 355	360	365
65	Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile 370	375	380
70	Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly 385	390	395
75	Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile 405	410	415
80	Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val Ala Gln 420	425	430
85	Gln Ser		

# ES 2 555 386 T3

5 <210> 39  
 <211> 434  
 <212> PRT  
 <213> Poa annua  
  
 10 <400> 39  
 Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Ala Thr Val Thr Pro  
 1 5 10 15  
  
 15 Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn Pro Arg  
 20 25 30  
  
 20 Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp Cys  
 35 40 45  
  
 25 Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala  
 50 55 60  
  
 30 Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His Ala  
 65 70 75 80  
  
 35 Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala Pro  
 85 90 95  
  
 40 Tyr Ala Pro Gln Pro Gln Asp Ala Asp Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe  
 100 105 110  
  
 45 Ser Ala Asp Ala Ala Arg Ala Phe Ser Ala Ala His Gly Leu Ala Val  
 115 120 125  
  
 50 Arg Ser Val Ala Val Arg Val Ala Asp Ala Ala Asp Ala Phe Arg Ala  
 130 135 140  
  
 55 Ser Ile Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Ala Asp Leu Gly  
 145 150 155 160  
  
 60 Arg Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu  
 165 170 175  
  
 65 Arg Phe Val Ser His Pro Asp Ala Asp Asp Ala Pro Phe Leu Pro Gly  
 180 185 190  
  
 70 Phe Glu Ala Val Ser Arg Pro Gly Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg  
 195 200 205  
  
 75 Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu Met Gly Pro Val Ile Asp  
 210 215 220  
  
 80 Tyr Ile Lys Gly Phe Met Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala  
 225 230 235 240

ES 2 555 386 T3

5 Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala  
245 250 255

10 Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly  
260 265 270

15 Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Tyr His Gly Gly  
275 280 285

20 Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr  
290 295 300

25 Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Glu Phe Met  
305 310 315 320

30 Arg Pro Pro Gln Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly  
325 330 335

35 Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val  
340 345 350

40 Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys  
355 360 365

45 Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile  
370 375 380

50 Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly  
385 390 395 400

55 Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile  
405 410 415

60 Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Val Ala Gln  
420 425 430

65 Gln Ser

70 <210> 40  
<211> 440  
<212> PRT  
<213> Alopecurus myosuroides

75 <400> 40

80 Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
1 5 10 15

85 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
20 25 30

# ES 2 555 386 T3

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ala Phe His His Val Glu Phe  
 35 40 45  
 5  
 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
 10  
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser  
 65 70 75 80  
 15  
 His Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95  
 20  
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Asp Ala Ala Asp Ala Ala Ala Thr  
 100 105 110  
 Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Thr Glu Ala Ala Arg Thr Phe Ser Ser  
 115 120 125  
 25  
 Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Ala Ile Arg Val Ala Asp Ala  
 130 135 140  
 30  
 Ala Glu Ala Phe His Thr Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe  
 145 150 155 160  
 35  
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Ser Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu  
 165 170 175  
 40  
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Asp Asp  
 180 185 190  
 Val Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Gly Val Ser Arg Pro Gly Ala Met  
 195 200 205  
 45  
 Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu  
 210 215 220  
 50  
 Met Ala Pro Val Ala Ala Tyr Met Lys Gly Phe Thr Gly Phe His Glu  
 225 230 235 240  
 55  
 Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu  
 245 250 255  
 60  
 Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu  
 260 265 270  
 Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr  
 275 280 285  
 65  
 Leu Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser  
 290 295 300

# ES 2 555 386 T3

Ser Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met  
 305 310 315 320

5

Gly Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly  
 325 330 335

10

Val Arg Arg Leu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu  
 340 345 350

15

Cys Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu  
 355 360 365

20

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu  
 370 375 380

25

Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln  
 385 390 395 400

30

Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser  
 405 410 415

35

Gln Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser  
 420 425 430 435 440

40

<210> 41  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> Alopecurus mycosuroides  
 <400> 41

45

Met Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Arg Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ala Phe His His Val Glu Phe  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

65

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ser  
 65 70 75 80

70

His Ala Ser His Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu  
 370 375 380

5 Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln  
 385 390 395 400

10 Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser  
 405 410 415

15 Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys  
 420 425 430

20 Gln Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser  
 435 440

25 <210> 42  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa  
 <400> 42

30 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

35 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

40 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

45 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

50 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

55 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

60 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

65 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

70 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

75 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

80 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr

# ES 2 555 386 T3

	165		170		175
5	Gly Asp Val Val 180	Leu Arg Phe Val	Ser Tyr Pro Asp	Glu Thr Asp Leu 190	
10	Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195		200	205	
15	Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210		215	220	
20	Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225		230	235	240
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245		250	255	
30	Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260		265	270	
35	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275		280	285	
40	Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290		295	300	
45	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305		310	315	320
50	Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325		330	335	
55	Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340		345	350	
60	Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355		360	365	
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370		375	380	
70	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385		390	395	400
75	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys His Asn Phe Ser Glu 405		410	415	
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420		425	430	
85	Ser Val Val Ala Gln Lys Ser				

ES 2 555 386 T3

435

5 <210> 43  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa  
  
 10 <400> 43  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
  
 15 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
  
 20 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
  
 25 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
  
 30 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
  
 35 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95  
  
 40 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
  
 45 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
  
 50 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
  
 55 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
  
 60 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
  
 65 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
  
 70 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
  
 75 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
  
 80 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240

ES 2 555 386 T3

5 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
245 250 255

10 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
260 265 270

15 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
275 280 285

20 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
290 295 300

25 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
305 310 315 320

30 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
325 330 335

35 Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
340 345 350

40 Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
355 360 365

45 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
370 375 380

50 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
385 390 395 400

55 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Cys Asn Phe Ser Glu  
405 410 415

60 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
420 425 430

65 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
435

70 <210> 44  
<211> 439  
<212> PRT  
<213> Avena sativa

75 <400> 44

80 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
1 5 10 15

85 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
20 25 30

# ES 2 555 386 T3

	Pro	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	Pro	Val	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Leu
			35					40					45			
5																
	Trp	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu
		50					55					60				
10																
	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala
	65					70					75					80
15																
	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr
				85						90					95	
20																
	Ala	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala
				100					105					110		
25																
	Ser	Ile	Pro	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala
			115					120					125			
30																
	His	Gly	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala
		130					135					140				
35																
	Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala
	145					150					155					160
40																
	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	His	Gly	Phe	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr
				165						170					175	
45																
	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Thr	Asp	Leu
				180					185					190		
50																
	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Asp
			195					200					205			
55																
	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Met
		210					215					220				
60																
	Ala	Pro	Val	Ile	Asp	Tyr	Met	Lys	Gly	Phe	Leu	Gly	Phe	His	Glu	Phe
						230					235					240
65																
	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn
					245					250					255	
70																
	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn
				260					265					270		
75																
	Glu	Pro	Val	His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu
			275					280					285			
80																
	Glu	Tyr	His	Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Ala	His	Ile	Ala	Leu	Ala	Ser	Asn
		290					295					300				

# ES 2 555 386 T3

Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320

5

Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

10

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

15

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360 365

20

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

25

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

30

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

35

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

40

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

<210> 45  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

45

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

50

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

55

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

60

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

65

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

# ES 2 555 386 T3

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

# ES 2 555 386 T3

Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
 370 375 380

5 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

10 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

15 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

20 <210> 46  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa

25 <400> 46

30 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30

35 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

40 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60

45 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80

50 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110

55 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125

60 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140

65 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160

Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr

# ES 2 555 386 T3

	165	170	175
5	Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu 180	185	190
10	Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp 195	200	205
15	Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met 210	215	220
20	Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe 225	230	235
25	Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn 245	250	255
30	Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn 260	265	270
35	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275	280	285
40	Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gly His Ile Ala Leu Ala Ser Asn 290	295	300
45	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly 305	310	315
50	Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325	330	335
55	Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys 340	345	350
60	Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355	360	365
65	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370	375	380
70	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu 385	390	395
75	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405	410	415
80	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln 420	425	430
85	Ser Val Val Ala Gln Lys Ser		

ES 2 555 386 T3

435

5 <210> 47  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Avena sativa  
  
 10 <400> 47  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
  
 15 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
  
 20 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45  
  
 25 Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
  
 30 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
  
 35 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90  
  
 40 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
  
 45 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
  
 50 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
  
 55 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
  
 60 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
  
 65 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
  
 70 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
  
 75 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
  
 80 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240

ES 2 555 386 T3

5 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
245 250 255

10 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
260 265 270

15 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
275 280 285

20 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
290 295 300

25 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
305 310 315 320

30 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
325 330 335

35 Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
340 345 350

40 Gln Glu Leu Gly Val Ala Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
355 360 365

45 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu  
370 375 380

50 Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
385 390 395 400

55 Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
405 410 415

60 Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
420 425 430

65 Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
435

70 <210> 48  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Petunia x hybrida

75 <400> 48

80 Met Ala Gln Ile Asn Asn Met Ala Gln Gly Ile Gln Thr Leu Asn Pro  
1 5 10 15

85 Asn Ser Asn Phe His Lys Pro Gln Val Pro Lys Ser Ser Ser Phe Leu  
20 25 30



# ES 2 555 386 T3

Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val  
 195 200 205

5 Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro Glu  
 210 215 220

10 Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu  
 225 230 235 240

15 Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu  
 245 250 255

20 Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu  
 260 265 270

25 Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr  
 275 280 285

30 Leu Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser  
 290 295 300

35 Asn Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met  
 305 310 315 320

40 Gly Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly  
 325 330 335

45 Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu  
 340 345 350

50 Cys Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu  
 355 360 365

55 Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu  
 370 375 380

60 Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln  
 385 390 395 400

65 Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser  
 405 410 415

70 Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys  
 420 425 430

75 Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435 440

80 <210> 50  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> Alopecurus mycosuroides

# ES 2 555 386 T3

<400> 50

5	Pro 1	Pro	Thr	Thr	Ala 5	Thr	Ala	Thr	Gly	Ala 10	Ala	Ala	Ala	Ala	Val 15	Thr
10	Pro	Glu	His	Ala 20	Ala	Arg	Arg	Phe	Pro 25	Arg	Val	Val	Arg	Val 30	Asn	Pro
15	Arg	Ser	Asp 35	Arg	Phe	Pro	Val	Leu 40	Ala	Phe	His	His	Val 45	Glu	Phe	Trp
20	Cys	Ala 50	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala 55	Ala	Gly	Arg	Phe	Ser 60	Phe	Ala	Leu	Gly
25	Ala 65	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg 70	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr 75	Gly	Asn	Ser	Ser	His 80
30	Ala	Ser	His	Leu 85	Leu	Arg	Ser	Gly	Ala 90	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr 95	Ala
35	Pro	Tyr	Ala	Pro 100	Pro	Pro	Gln	Asp	Ala 105	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala 110	Thr	Ala
40	Ser	Ile	Pro 115	Ser	Phe	Ser	Thr	Glu 120	Ala	Ala	Arg	Thr	Phe 125	Ser	Ser	Ala
45	His	Gly 130	Leu	Ala	Val	Arg	Ser 135	Val	Ala	Ile	Arg	Val 140	Ala	Asp	Ala	Ala
50	Glu 145	Ala	Phe	His	Thr	Ser 150	Val	Ala	Gly	Gly	Ala 155	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala 160
55	Pro	Ala	Asp	Leu 165	Gly	Ser	Gly	Phe	Gly 170	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Leu 175	Tyr
60	Gly	Asp	Val 180	Val	Leu	Arg	Phe	Val	Ser 185	His	Pro	Asp	Gly	Asp 190	Asp	Val
65	Pro	Phe	Leu 195	Pro	Gly	Phe	Glu	Gly 200	Val	Ser	Arg	Pro	Gly 205	Ala	Met	Asp
70	Tyr	Gly 210	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp 215	His	Leu	Val	Gly	Asn 220	Val	Pro	Glu	Met
75	Ala 225	Pro	Val	Ala	Ala	Tyr 230	Met	Lys	Gly	Phe	Thr 235	Gly	Phe	His	Glu	Phe 240
80	Ala	Glu	Phe	Thr 245	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr 250	Ala	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn 255
85	Ser	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn

# ES 2 555 386 T3

	260	265	270	
5	Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu 275 280 285			
10	Asp Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Ser 290 295 300			
15	Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly 305 310 315 320			
20	Gly Phe Glu Phe Met Arg Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val 325 330 335			
25	Arg Arg Glu Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys 340 345 350			
30	Gln Glu Leu Gly Val Met Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu 355 360 365			
35	Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu Glu 370 375 380			
40	Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Ile Gly Gln Glu 385 390 395 400			
45	Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu 405 410 415			
50	Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln 420 425 430			
55	Ser Ala Val Ala Gln Gln Ser 435			
60	<210> 51 <211> 11208 <212> ADN <213> Secuencia Artificial			
65	<220> <223> Casete de Expresión			
70	<400> 51 attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccttt 60			
75	taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgc caatatatcc 120			
80	tgtcaaacac tgatagtta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga 180			
85	attaagggag tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg 240			
90	aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaaa tcaattgggc 300			
95	gcgtacgtag cactagtgaa ttccgaccc aagcttgcac gcctgcagga attggccgca 360			

## ES 2 555 386 T3

	gcggccattt aatcaattg ggcgcgtgcg gccgcagctg cttgtgggga ccagacaaaa	420
	aaggaatggt gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgcct ttattgcaaa	480
5	gataaagcag attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct	540
	gacagcccac tcaactaatgc gtatgacgaa cgcagtgacg accacaaaac tcgagacttt	600
10	tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt	660
	tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctccatacaa tgccatcatt gcgataaagg	720
	aaaggtatc gttgaagatg cctctgccga cagtggctcc aaagatggac ccccaccac	780
15	gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg	840
	tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatcccac tatccttctg caggtcgact	900
20	ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttggag aggaaacctc gagtattttt	960
	acaacaatta ccaacaacaa caacaacaa acaacattac aattactatt tacaattaca	1020
	catatgccac caactactgc tactgctaca ggtgctgctg ctgcagctgt tactccagaa	1080
25	catgctgcta gaaggttccc aagagtgtt agagttaacc caaggtctga taggttccca	1140
	gttcttgctt tccatcatgt tgagttttg tgtgctgatg ctgcttctgc tgctggaaga	1200
30	tttcttttg ctcttggtgc tccacttgct gctagatctg attgtctac tggaaactct	1260
	tctcacgctt ctcacctttt gagatctggt gctcttgctt tccttttcac tgctccttat	1320
	gctccaccac cacaagatgc tgcagatgca gcagctactg cttctattcc atctttttca	1380
35	actgaggctg ctaggacttt ctcttctgct catggattgg ctgtagatc tgtggctatt	1440
	agagttgcag atgctgcaga ggctttccat acttctgttg ctggtgggtgc tagaccagct	1500
40	tttgctccag ctgatcttgg atctggattt ggacttgctg aggttgagct ttacggtgat	1560
	gttgttctta gattcgtgtc tcaccagat ggtgatgatg ttccatttct tccaggattc	1620
	gaggggtgta gtagaccagg tgctatggat tatggactca ctaggttcga tcaccttggtg	1680
45	ggaaatgttc cagaaatggc tccagttgct gcttacatga agggattcac tggatttcat	1740
	gagttcgtg agttcactgc tgaggatggt ggaactgctg agtctggact taactctggt	1800
50	gtgcttgcta acaactctga ggctgttctt ttgccactta atgagccagt tcacggcact	1860
	aagagaagat ctgagattca gacttacctc gattaccatg gtggaccagg tgttcaacat	1920
	attgctcttg cttcatctga tgtgcttagg actcttagag agatgagagc tagatctgct	1980
55	atgggaggat ttgagtttat gagaccacca caagctaagt attacgaagg tgttagaagg	2040
	gaggctggtg atgttctttc tgaggctcaa atcaaagagt gccaagagct tggagttatg	2100
60	gtggatagag atgatcaggg tgtgcttctc cagattttca ctaagccagt tggagatagg	2160
	ccaacattct tcttgagat gattcagagg atcggctgca tggaaaagga tgagattgga	2220
	caagagtacc aaaagggcgg atgtggtgga tttgaaagg gaaatttctc cgagcttttc	2280
65	aagtccatcg aggattacga gaagtctctt gaggctaagc aatctgctgt tgctcaacag	2340
	tcttgagagc tcttcatatg acgatcgttc aacatttgg caataaagtt tcttaagatt	2400

## ES 2 555 386 T3

	gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat catataattt ctggtgaatt acgttaagca	2460
	tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga tgggttttta tgattagagt	2520
5	cccgcaatta tacatttaat acgcataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa	2580
	attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact agatcgcgga ccgaagcttg catgcctgca	2640
10	ggtcgactct agaggatctg ggaccagtc aaagattcaa atagaggacc taacagaact	2700
	cgccgtaaag actggcgaac agttcataca gagtctctta cgactcaatg acaagaagaa	2760
	aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac gcttgtctac tccaaaaata tcaaagatac	2820
15	agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaaca agggtaatat ccggaacct	2880
	cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg	2940
20	tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc	3000
	cgacagtggc cccaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt	3060
	tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga	3120
25	cgacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata taaggaagt catttcattt	3180
	ggagaggaca cgctgaaatc actagtcac catgtctccg gagaggagac cagttgagat	3240
30	taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgtaacc attacattga	3300
	gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgga ttgatgatct	3360
	agagaggttg caagatagat acccttggtt ggttgcgtgag gttgagggtg ttgtggctgg	3420
35	tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac	3480
	tgtttacgtg tcacataggc atcaaagggt gggcctagga tccacattgt acacacattt	3540
40	gcttaagtct atggaggcgc aaggtttta gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa	3600
	cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca gcccggggta cattgcgcgc	3660
	agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt	3720
45	gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc tgaactagt atatcggcgc	3780
	catgggtcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc	3840
50	tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgta agcatgtaat	3900
	aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta ggtcccgcga	3960
	attatacatt taatacgcga tagaaaaca aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc	4020
55	gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcc ggaccagct gcttgtgggg accagacaaa	4080
	aaaggaatgg tgcagaattg ttaggcgcac ctacaaaag catctttgcc tttattgcaa	4140
60	agataaagca gattcctcta gtacaagtgg ggaacaaaat aacgtggaaa agagctgtcc	4200
	tgacagcca ctactaatg cgtatgacga acgcatgac gaccacaaa ctcgagactt	4260
	ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact	4320
65	ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggt gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag	4380
	gaaaggctat cgttgaagat gcctctgcc acagtgtcc caaagatgga cccccacca	4440

## ES 2 555 386 T3

	cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat	4500
	gtgatatctc cactgacgta agggatgacg aacaatccca ctatccttct gccggaccct	4560
5	catgagcggg gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc cgatgacgcg ggacaagccg	4620
	ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gaagctttgg cagacaaagt ggcagacata	4680
10	ctgtcccaca aatgaagatg gaatctgtaa aagaaaacgc gtgaaataat gcgtctgaca	4740
	aaggttaggt cggctgcctt taatcaatac caaagtggc cctaccacga tggaaaaact	4800
	gtgcagtcgg tttggctttt tctgacgaac aaataagatt cgtggccgac aggtgggggt	4860
15	ccacatgtg aaggcatctt cagactccaa taatggagca atgacgtaag ggcttacgaa	4920
	ataagtaagg gtagtttggg aatgtccac tcaccgctca gtctataaat acttagcccc	4980
20	tccctcattg ttaagggagc aaaatctcag agagatagtc ctagagagag aaagagagca	5040
	agtagcctag aagtggatcc caccatgtct ccggagagga gaccagttga gattaggcca	5100
	gctacagcag ctgatatggc cgcggtttgt gatatcgta accattacat tgagacgtct	5160
25	acagtgaact ttaggacaga gccacaaaca ccacaagagt ggattgatga tctagagagg	5220
	ttgcaagata gatacccttg gttggttget gaggttgagg gtgttgtggc tggatttget	5280
30	tacgctgggc cctggaaggc taggaacgct tacgattgga cagttgagag tactgtttac	5340
	gtgtcacata ggcatcaaag gttgggccta ggatctacat tgtacacaca tttgcttaag	5400
	tctatggagg cgcaaggttt taagtctgtg gttgctgta taggccttcc aaacgatcca	5460
35	tctgttaggt tgcatgaggc tttgggatac acagcccggg gtacattgcg cgcagctgga	5520
	tacaagcatg gtggatggca tgatgttggg ttttgcaaa gggattttga gttgccagct	5580
40	cctccaaggc cagttaggcc agttaccag atatgagtcg agctctagat cccgaaattt	5640
	ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccgtct	5700
	tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta	5760
45	atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta	5820
	atacgcgata gaaaacaaa tatagcgcg aaactaggat aaattatcg cgcggtgct	5880
50	atctatgtta ctagatcggg aattgggtac catgcccggg cggccagcat ggccgtatcc	5940
	gcaatgtgtt attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac	6000
	cagccagcca acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca	6060
55	gccccatcaga attaattctc atgtttgaca gcttatcatc gactgcacgg tgcaccaatg	6120
	cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg tggatggct gtgcaggtcg taaatcactg	6180
60	cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc	6240
	ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat	6300
	aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagaccat gagggaagcg	6360
65	ttgatcggc aagtatcgac tcaactatca gaggtagttg gcgtcatcga gcgcatctc	6420
	gaaccgacgt tgctggccgt acatttgtac ggctccgag tggatggcgg cctgaagcca	6480

## ES 2 555 386 T3

	cacagtgata ttgatttgcg ggttacggtg accgtaaggc ttgatgaaac aacgcggcga	6540
	gctttgatca acgacctttt ggaaacttcg gcttcccctg gagagagcga gattctccgc	6600
5	gctgtagaag tcaccattgt tgtgcacgac gacatcattc cgtggcggtta tccagctaag	6660
	cgcgaaactgc aatttgagaga atggcagcgc aatgacattc ttgcaggtat cttcgagcca	6720
10	gccacgatcg acattgatct ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca tagcgttgcc	6780
	ttggtaggtc cagcggcggg ggaactcttt gatccggttc ctgaacagga tctatttgag	6840
	gcgctaaatg aaaccttaac gctatggaac tcgccgcccg actgggctgg cgatgagcga	6900
15	aatgtagtgc ttacgttgc cgcatttgg tacagcgcag taaccggcaa aatcgcccg	6960
	aaggatgtcg ctgccgactg ggcaatggag cgcctgccgg cccagtatca gcccgtcata	7020
20	cttgaagcta ggcaggctta tcttggacaa gaagatcgct tggcctcgcg cgcagatcag	7080
	ttggaagaat ttgttacta cgtgaaaggc gagatcacca aagtagtcgg caaataaagc	7140
	tctagtggat ctccgtacc cgggatctgg ctgcggcgg acgcacgacg cggggcgag	7200
25	accataggcg atctcctaaa tcaatagtag ctgtaacctc gaagcgtttc acttgtaaca	7260
	acgattgaga atttttgtca taaaattgaa atacttggtt cgcatttttg tcatccgcg	7320
30	tcagccgcaa ttctgacgaa ctgccattt agctggagat gattgtacat ccttcacgtg	7380
	aaaatttctc aagcgcgtgtg aacaagggtt cagattttag attgaaagggt gagccgttga	7440
	aacacgttct tcttgcgat gacgacgtcg ctatgcggca tcttattatt gaatacctta	7500
35	cgatccacgc cttcaaagtg accgcggtag cgcacagcac ccagttcaca agagtactct	7560
	cttccgcgac ggtcgatgtc gtggttgttg atctagattt aggtcgtgaa gatgggctcg	7620
40	agatcgttcg taatctggcg gcaaagtctg atattccaat cataattatc agtggcgacc	7680
	gccttgagga gacggataaa gttgttgac tcgagctagg agcaagtgat tttatcgcta	7740
	agccgttcag tatcagagag tttctagcac gcattcgggt tgccttgcgc gtgcgcccc	7800
45	acgttgccg ctccaaagac cgacggtctt tttgttttac tgactggaca cttaatctca	7860
	ggcaacgtcg cttgatgtcc gaagctggcg gtgaggtgaa acttacggca ggtgagttca	7920
50	atcttctct cgcgttttta gagaaacccc ggcacgttct atcgcgcgag caacttctca	7980
	ttgccagtcg agtacgcgac gaggaggttt atgacaggag tatagatggt ctcattttga	8040
	ggctgcgccg caaacttgag gcagatccgt caagccctca actgataaaa acagcaagag	8100
55	gtgccgggta tttctttgac gcggacgtgc aggtttcgca cggggggacg atggcagcct	8160
	gagccaattc ccagatcccc gaggaatcgg cgtgagcggc cgcaaaccat cgggccgggt	8220
60	acaaatcggc gcggcgctgg gtgatgacct ggtggagaag ttgaaggccg cgcaggccgc	8280
	ccagcggcaa cgcacgcagg cagaagcacg ccccggtgaa tcgtggcaag cggccgctga	8340
	tcgaatccgc aaagaatccc ggcaaccgcc ggcagccggt gcgccgtcga ttaggaagcc	8400
65	gcccaggggc gacgagcaac cagatttttt cgttccgatg ctctatgacg tgggcacccg	8460
	cgatagtcgc agcatcatgg acgtggccgt tttccgtctg tcgaagcgtg accgacgagc	8520

## ES 2 555 386 T3

	tggcgaggtg atccgctacg agcttcacga cgggcacgta gaggtttccg cagggccggc	8580
	cggcatggcc agtgtgtggg attacgacct ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga	8640
5	atccatgaac cgataccggg aagggaaagg agacaagccc ggccgcgtgt tccgtccaca	8700
	cgttgcbgac gtactcaagt tctgccggcg agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct	8760
10	ggtagaaacc tgcattcggg taaacaccac gcacgttgcc atgcagcgtg cgaagaaggc	8820
	caagaacggc cgcctggtga cggtatccga ggggtaagcc ttgattagcc gctacaagat	8880
	cgtaaagagc gaaaccgggc ggccggagta catcgagatc gagctagctg attggatgta	8940
15	ccgcgagatc acagaaggca agaaccggga cgtgctgacg gttcaccccg attacttttt	9000
	gatcgatccc ggcacgccc gttttctcta ccgcctggca cgcgcgccg caggcaaggc	9060
20	agaagccaga tggttgttca agacgatcta cgaacgcagt ggcagcggc gagagttaa	9120
	gaagtctgtg ttcaccgtgc gcaagctgat cgggtcaaat gacctgccg agtacgattt	9180
	gaaggaggag gcgggcagg ctggccgat cctagtcatg cgctaccgca acctgatcga	9240
25	gggccaagca tccgccggtt cctaattgtac ggagcagatg ctagggcaaa ttgccctagc	9300
	aggggaaaaa ggtcgaaaag gtctctttcc tgtggatagc acgtacattg ggaacccaaa	9360
30	gccgtacatt gggaaaccgga acccgatcat tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg	9420
	gtcacacatg taagtgactg atataaaaga gaaaaaggc gatttttccg cctaaaactc	9480
	tttaaaactt attaaaactc ttaaaaccg cctggcctgt gcataactgt ctggccagcg	9540
35	cacagccgaa gagctgcaaa aagcgcctac ccttcggtcg ctgcgctccc tacgcccgc	9600
	cgcttcgctg cggcctatcg cggccgctgg ccgctcaaaa atggctggcc tacggccagg	9660
40	caatctacca gggcgcggac aagccgcgcc gtcgccactc gaccgcccgc gctgaggtct	9720
	gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga atcgcccat catccagcca	9780
	gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgtttag gtggaccagt tggatgattt	9840
45	gaacttttgc tttgccacgg aacggtctgc gttgtcggga agatgcgtga tctgatcctt	9900
	caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgccg cccgtcaagt cagcgtaatg	9960
50	ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcatc gagcatcaaa	10020
	tgaaactgca atttatcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc	10080
	tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg	10140
55	tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc gtcaaaaata	10200
	aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagc	10260
60	tctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagagcggt ttgcgtattg ggcgctcttc	10320
	cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc	10380
	tcactcaaag gcggtaaatc ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat	10440
65	gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt	10500
	ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg	10560

## ES 2 555 386 T3

	aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccctt ggaagctccc tcgtgcgctc	10620
	tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt	10680
5	ggcgcctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa	10740
	gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta	10800
10	tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa	10860
	caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa	10920
	ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaage cagttacctt	10980
15	cggaaaaaga gttgtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt	11040
	ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat	11100
20	cttttctacg gggctctgacg ctcagtgga cgaaaactca cgtaagga ttttggtcat	11160
	gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttgatc cggaatta	11208
25	<210> 52 <211> 11208 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Casete de expresión	
	<400> 52	
	attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccttt	60
35	taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgc caatatatcc	120
	tgtcaaacac tgatagtta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga	180
40	attaagggag tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg	240
	aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaa tcaattgggc	300
	gcgtacgtag cactagttaa ttccggacc cagcttgcac gcctgcagga attggccgca	360
45	gcggccattt aatcaattg ggcgcgtgcg gccgcagctg cttgtgggga ccagacaaaa	420
	aaggaatggt gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atccttgctt ttattgcaa	480
50	gataaagcag attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct	540
	gacagccac tcactaatgc gtatgacgaa cgcagtgacg accacaaaac tcgagacttt	600
	tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt	660
55	tattgtgaag atagtggaaa aggaaggtgg ctccatacaa tgccatcatt gcgataaagg	720
	aaaggctatc gttgaagatg cctctgccga cagtgtccc aaagatggac cccaccac	780
60	gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccagctc tcaaagcaag tggattgatg	840
	tgatatctcc actgacgtaa gggatgacga acaatccac taccctctg caggtcgact	900
	ctagaggatc ctataaatag gaagttcatt tcatttgag aggaaacctc gagtatTTTT	960
65	acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattactatt tacaattaca	1020
	catatgccac caactactgc tactgctaca ggtgctgctg ctgcagctgt tactccagaa	1080

## ES 2 555 386 T3

	catgctgcta gaaggttccc aagagttggt agagttaacc caaggtctga taggttccca	1140
	gttcttgctt tccatcatgt tgagtttgg tgtgctgatg ctgcttctgc tgctggaaga	1200
5	ttttcttttg ctcttggtgc tccacttgct gctagatctg atttgtctac tggaaactct	1260
	tctcacgctt ctcacctttt gagatctggt gctcttgctt tccttttcac tgctccttat	1320
10	gctccaccac cacaagatgc tgcagatgca gcagctactg cttctattoc atctttttca	1380
	actgaggctg ctaggacttt ctcttctgct catggattgg ctgtagatc tgtggctatt	1440
	agagttgcag atgctgcaga ggctttccat acttctggtg ctggtggtgc tagaccagct	1500
15	tttgctccag ctgatcttgg atctggattt ggacttgctg aggttgagct ttacggtgat	1560
	gttgttctta gattcgtgtc tcaccagat ggtgatgatg ttccatttct tccaggattc	1620
20	gaggggtgta gtagaccagg tgctatggat tatggactca ctaggttcga tcaccttggtg	1680
	ggaaatgttc cagaaatggc tccagttgct gcttacatga agggattcac tggatttcat	1740
	gagttcgctg agttcactgc tgaggatggt ggaactgctg agtctggact taactctggt	1800
25	gtgcttgcta acaactctga ggctgttctt ttgccactta atgagccagt tcacggcact	1860
	aagagaagat ctcagattca gacttacctc gattaccatg gtggaccagg tgttcaacat	1920
30	attgctcttg cttcatctga tgtgcttagg actcttagag agatgagagc tagatctgct	1980
	atgggaggat ttgagtttat gagaccacca caagctaagt attacgaagg tgttagaagg	2040
	gaggctggtg atgttctttc tgaggctcaa atcaaagagt gccaaagact tggagttatg	2100
35	gtggatagag atgatcaggg tgtgcttctc cagattttca ctaagccagt tggagatagg	2160
	ccaacattct tcttgagat gattcagagg atcggctgca tggaaaagga tgagattgga	2220
40	caagagtacc aaaagggcgg atgtggtgga tttggaaagg gaaatttctc cgagcttttc	2280
	aagtccatcg aggattacga gaagtctctt gaggctaagc aatctgctgt tgctcaacag	2340
	tcttgagagc tcttcatatg acgatcgttc aacatttgg caataaagtt tcttaagatt	2400
45	gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat catataattt ctggtgaatt acgttaagca	2460
	tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga tgggttttta tgattagagt	2520
50	cccgcaatta tacatttaat acgcataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa	2580
	attatcgcgc gcggtgcat ctatgttact agatcgcgga ccgaagcttg catgcctgca	2640
	ggtcactct agaggatctg ggaccagtc aaagattcaa atagaggacc taacagaact	2700
55	cgccgtaaag actggcgaac agttcataca gagtctctta cgactcaatg acaagaagaa	2760
	aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac gcttgtctac tccaaaata tcaaagatac	2820
60	agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct	2880
	cctcggattc cattgccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg	2940
	tggctcctac aatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc	3000
65	cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt	3060
	tccaaccagc tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga	3120

## ES 2 555 386 T3

	cgcaaatcc cactatcctt cgcaagacc ttctctata taaggaagt catttcattt	3180
	ggagaggaca cgctgaaatc actagtccac catgtctccg gagaggagac cagttgagat	3240
5	taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgtaacc attacattga	3300
	gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgga ttgatgatct	3360
10	agagaggttg caagatagat acccttggtt ggttgctgag gttgagggtg ttgtggctgg	3420
	tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac	3480
	tgtttacgtg tcacatagc atcaaagggt gggcctagga tccacattgt acacacattt	3540
15	gcttaagtct atggaggcgc aaggtttta gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa	3600
	cgatccatct gttaggttgc atgaggcttt gggatacaca gcccgggta cattgcgcgc	3660
20	agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt	3720
	gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc tgaactagt atatcggcgc	3780
	catgggtcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc	3840
25	tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat	3900
	aattaacatg taatgatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccga	3960
30	attatacatt taatacgcga tagaaaaca aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc	4020
	gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcc ggaccagct gcttgtgggg accagacaaa	4080
	aaaggaatgg tgcagaattg ttaggcgcac ctacaaaag catctttgcc tttattgcaa	4140
35	agataaagca gattcctcta gtacaagtgg ggaacaaaat aacgtggaaa agagctgtcc	4200
	tgacagccca ctactaatg cgtatgacga acgcagtgac gaccacaaa ctcgagactt	4260
40	ttcaacaaag ggtaatatcc ggaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact	4320
	ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggt gctcctaca atgccatcat tgcgataaag	4380
	gaaaggctat cgttgaagat gcctctgccg acagtgttcc caaagatgga cccccacca	4440
45	cgaggagcat cgttgaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat	4500
	gtgatatctc cactgacgta aggatgacg aacaatcca ctatccttct gccggacct	4560
50	catgagcggg gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc cgatgacgcy ggacaagccg	4620
	ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gaagctttgg cagacaaagt ggagacata	4680
	ctgtcccaca aatgaagatg gaatctgtaa aagaaaacgc gtgaaataat gcgtctgaca	4740
55	aaggttaggt cggctgcctt taatcaatac caaagtggtc cctaccacga tggaaaaact	4800
	gtgcagtcgg tttggctttt tctgacgaac aaataagatt cgtggccgac aggtgggggt	4860
60	ccaccatgtg aaggcatctt cagactccaa taatggagca atgacgtaag ggcttacgaa	4920
	ataagtaagg gtagtttggg aaatgtccac tcaccgtoa gtctataaat acttagcccc	4980
	tccctcattg ttaagggagc aaaatctcag agagatagtc ctagagagag aaagagagca	5040
65	agtagcctag aagtggatcc caccatgtct cgggagagga gaccagttga gattaggcca	5100
	gctacagcag ctgatatggc cgcggtttgt gatatcgta accattacat tgagacgtct	5160

## ES 2 555 386 T3

	acagtgaact ttaggacaga gccacaaaca ccacaagagt ggattgatga tctagagagg	5220
	ttgcaagata gatacccttg gttggttgct gaggttgagg gtggttgggc tggatttgct	5280
5	tacgctgggc cctggaaggc taggaacgct tacgattgga cagttgagag tactgtttac	5340
	gtgtcacata ggcatacaaag gttgggccta ggatctacat tgtacacaca tttgcttaag	5400
10	tctatggagg cgcaaggttt taagtctgtg gttgctgtta taggccttoc aaacgatcca	5460
	tctgttaggt tgcatgaggc tttgggatac acagcccggg gtacattgcg cgcagctgga	5520
	tacaagcatg gtggatggca tgatgttggt ttttgcaaaa gggattttga gttgccagct	5580
15	cctccaaggc cagttaggcc agttaccagc atatgagtcg agctctagat ccccgaattt	5640
	ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct	5700
20	tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta	5760
	atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta	5820
	atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc	5880
25	atctatgtta ctagatcggg aattgggtac catgcccggg cggccagcat ggccgtatcc	5940
	gcaatgtggt attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac	6000
30	cagccagcca acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca	6060
	gcccatcaga attaattctc atgtttgaca gcttatcatc gactgcacgg tgcaccaatg	6120
	cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg tggatggct gtgcaggtcg taaatcactg	6180
35	cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc gttctggata atgttttttg cgccgacatc	6240
	ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatcatc cggctcgtat	6300
40	aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagaccat gagggaagcg	6360
	ttgatcgccg aagtatcgac tcaactatca gaggtagttg gcgtcatcga gcgccatctc	6420
	gaaccgacgt tgctggccgt acatttgta cggctccgag tggatggcgg cctgaagcca	6480
45	cacagtgata ttgatttgct ggttacggtg accgtaaggc ttgatgaaac aacgcggcga	6540
	gctttgatca acgacctttt ggaaacttcg gcttcccctg gagagagcga gattctccgc	6600
50	gctgtagaag tcaccattgt tgtgcacgac gacatcatc cgtggcgta tccagetaag	6660
	cgcgaactgc aatttgagga atggcagcgc aatgacattc ttgcaggtat cttcgagcca	6720
	gccacgatcg acattgatct ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca tagcgttgcc	6780
55	ttggtaggtc cagcggcggg ggaactcttt gatccggttc ctgaacagga tctatttgag	6840
	gcgctaaatg aaacctaac gctatggaac tcgccgccg actgggctgg cgatgagcga	6900
60	aatgtagtgc ttacgttgtc ccgcatcttg tacagcgcag taaccggcaa aatcgcgccg	6960
	aaggatgtcg ctgccgactg ggcaatggag cgcctgccgg ccagtatca gcccgtcata	7020
	cttgaagcta ggcaggctta tcttgacaaa gaagatcgct tggcctcggc cgcagatcag	7080
65	ttggaagaat ttgttacta cgtgaaaggc gagatcacca aagtagtcgg caaataaagc	7140
	tctagtggat ctccgtacc cgggatctgg ctgcgcggcg acgcacgacg ccggggcgag	7200

## ES 2 555 386 T3

	accataggcg atctcctaaa tcaatagtag ctgtaacctc gaagcgtttc acttgtaaca	7260
	acgattgaga atttttgtca taaaattgaa atacttggtt cgcatttttg tcatccgcgg	7320
5	tcagccgcaa ttctgacgaa ctgcccattt agctggagat gattgtacat ccttcacgtg	7380
	aaaatttctc aagcgctgtg aacaagggtt cagattttag attgaaaggt gagccgttga	7440
10	aacacgttct tcttgctgat gacgacgtcg ctatgcggca tcttattatt gaatacctta	7500
	cgatccacgc cttcaaagtg accgcggtag ccgacagcac ccagttcaca agagtactct	7560
	cttccgcgac ggtcgatgtc gtggttggtt atctagattt aggtcgtgaa gatgggctcg	7620
15	agatcgttcg taatctggcg gcaaagtctg atattccaat cataattatc agtggcgacc	7680
	gccttgagga gacggataaa gttgttgcac tcgagctagg agcaagtgat tttatcgcta	7740
20	agccgttcag tatcagagag tttctagcac gcattcgggt tgccttgccg gtgcccaca	7800
	acgttgctcg ctccaaagac cgacggtctt tttgttttac tgactggaca cttaatctca	7860
	ggcaacgtcg cttgatgtcc gaagctggcg gtgaggtgaa acttacggca ggtgagttca	7920
25	atcttctcct cgcgttttta gagaaacccc ggcacgttct atcgccgag caacttctca	7980
	ttgccagtcg agtacgcgac gaggaggtt atgacaggag tatagatggt ctcattttga	8040
30	ggctgcgccg caaacttgag gcagatccgt caagccctca actgataaaa acagcaagag	8100
	gtgccggtta tttctttgac gcggacgtgc aggtttcgca cggggggacg atggcagcct	8160
	gagccaattc ccagatcccc gaggaatcgg cgtgagcggc cgcaaaccat cgggcccggt	8220
35	acaaatcggc gcggcgctgg gtgatgacct ggtggagaag ttgaaggccg cgcaggccgc	8280
	ccagcggcaa cgcacgcagg cagaagcacg ccccgtgaa tcgtggcaag cggccgctga	8340
40	tcgaatccgc aaagaatccc ggcaaccgcc ggcagccggt gcgccgtcga ttaggaagcc	8400
	gcccagggc gacgagcaac cagatttttt cgttccgatg ctctatgacg tgggcacccg	8460
	cgatagtcgc agcatcatgg acgtggccgt tttccgtctg tcgaagcgtg accgacgagc	8520
45	tggcgaggtg atccgctacg agcttcaga cgggcacgta gaggtttccg cagggccggc	8580
	cggcatggcc agtgtgtggg attacacct ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga	8640
50	atccatgaac cgataccggg aagggagggg agacaagccc ggccgcgtgt tccgtccaca	8700
	cgttgccgac gtactcaagt tctgccggcg agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct	8760
	ggtagaaacc tgcattcggg taaacaccac gcacgttgcc atgcagcgtg cgaagaaggc	8820
55	caagaacggc cgcctggtga cggtatccga ggggtaagcc ttgattagcc gctacaagat	8880
	cgtaaagagc gaaaccgggc ggccggagta catcgagatc gagctagctg attggatgta	8940
60	ccgcgagatc acagaaggca agaaccggga cgtgctgacg gttcaccocg attacttttt	9000
	gatcgatccc ggcacgcgcc gttttctcta ccgcctggca cgccgcgccg caggcaaggc	9060
	agaagccaga tggttgttca agacgatcta cgaacgcagt ggcagcggcg gagagttcaa	9120
65	gaagttctgt ttcaccgtgc gcaagctgat cgggtcaaat gacctgccgg agtacgattt	9180
	gaaggaggag gcggggcagg ctggcccgat cctagtcatg cgctaccgca acctgatcga	9240

## ES 2 555 386 T3

	gggcgaagca tccgccggtt cctaattgtac ggagcagatg ctagggcaaa ttgccctagc	9300
	aggggaaaaa ggtcgaagag gtctctttcc tgtggatagc acgtacattg ggaacccaaa	9360
5	gccgtacatt gggaaaccgga acccgtacat tgggaacca aagccgtaca ttgggaaccg	9420
	gtcacacatg taagtgactg atataaaaga gaaaaaaggc gatttttccg cctaaaactc	9480
10	tttaaaactt attaaaactc ttaaaaccog cctggcctgt gcataactgt ctggccagcg	9540
	cacagccgaa gagctgcaaa aagcgcctac ccttcggtcg ctgcgctccc tacgccccgc	9600
	cgcttcgctg cggcctatcg cggccgctgg ccgctcaaaa atggctggcc tacggccagg	9660
15	caatctacca gggcgcgac aagccgcgcc gtcgccactc gaccgcggc gctgaggtct	9720
	gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga atcgccccat catccagcca	9780
20	gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgtttag gtggaccagt tggtgatttt	9840
	gaacttttgc tttgccacgg aacggtctgc gttgtcggga agatgcgtga tctgatcctt	9900
	caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgctg cccgtcaagt cagcgtaatg	9960
25	ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcatc gagcatcaaa	10020
	tгааactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc	10080
30	tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg	10140
	tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc gtcaaaaata	10200
	aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagc	10260
35	tctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc	10320
	cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc	10380
40	tcactcaaag gcggttaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat	10440
	gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt	10500
	ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg	10560
45	aaaccgcaca ggactataaa gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc tctgctctc	10620
	tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt	10680
50	ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa	10740
	gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta	10800
	tctgtctgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa	10860
55	caggattagc agagcgagg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa	10920
	ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt	10980
60	cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt	11040
	ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat	11100
	cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggatc	11160
65	gagattatca aaaaggatct tcacctagat cttttgatc cggaatta	11208

<210> 53

## ES 2 555 386 T3

<211> 1320  
 <212> ADN  
 <213> Avena sativa

5 <400> 53  
 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat 60  
 gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt 120  
 10 ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagattt 180  
 tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct 240  
 cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct 300  
 15 ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat 360  
 gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttg agttagagtt 420  
 20 gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc 480  
 ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt 540  
 cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg 600  
 25 gtttcatctc cagggtgctg tgattatgga ctcaactagg tcgatcacgt tgtgggaaat 660  
 gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttggatt ccatgagttc 720  
 30 gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt 780  
 gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga 840  
 agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac cagggtttca acatattgct 900  
 35 cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga 960  
 ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct 1020  
 40 ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tctcgtggat 1080  
 agagatgata aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca 1140  
 ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag 1200  
 45 taccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc 1260  
 atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga 1320

50  
 <210> 54  
 <211> 1326  
 <212> ADN  
 <213> Alopecurus myosuroides

55 <400> 54  
 atgcctccga ccaccgcaac cgcaaccggt gctgcagcag cagccgttac accggaacat 60  
 gcagcacgtc gttttccgcg tgttgttctg gttaatccgc gtagcgatcg ttttccggtt 120  
 60 ctggcatttc atcatgttga attttgggtg gccgatgcag caagcgcagc aggtcgtttt 180  
 agctttgcac tgggtgcacc gctggcagca cgtagcgatc tgagcaccgg taatagcagc 240  
 65 catgcaagcc atctgctgcg tagtgggtgca ctggcatttc tgtttaccgc accgatgca 300  
 ccgcctccgc aggatgcagc agatgcagcc gctaccgcca gcattccgag ctttagcacc 360

## ES 2 555 386 T3

	gaagcagcac gtaccttag cagcgcacat ggtctggcag ttcgtagcgt tgcaattcgt	420
	gttgcagatg ccgcagaagc atttcatacc agcgttgccg gtggtgcacg tccggcattt	480
5	gcaccggcag atctgggtag cggttttggt ctggccgaag ttgaactgta tggatgatgt	540
	gttctgcggt ttgttagtca tccggatggt gatgatgttc cgtttctgcc gggttttgaa	600
10	ggtgttagcc gtccgggtgc aatggattat ggtctgacct gttttgatca tgttgttgg	660
	aatgttccgg aatggcacc ggttgacgca tatatgaaag gttttaccgg ctttcatgaa	720
	tttgccgaat ttaccgcaga agatgttggc accgcagaaa gcggtctgaa tagcgttgtt	780
15	ctggcaaata atagcgaagc agttctgctg ccgctgaatg aaccggtgca tggcaccaaa	840
	cgtcgtagcc agattcagac ctatctggat tatcatggtg gtccgggtgt tcagcatatt	900
20	gcactggcaa gcagtgatgt tctgcgtacc ctgcgtgaaa tgcgtgcacg tagcgcfaat	960
	ggtggttttg aatttatggc accgccgcag gcaaaatatt atgaaggtgt tcgtcgtctg	1020
	gctggtgatg ttctgagcga agcacagatt aaagaatgtc aggaactggg cgttctggtt	1080
25	gatcgtgatg atcaggggtg tctgctgcag atttttacca aaccggttgg tgatcgtcgt	1140
	ccgacctttt ttctggaat gattcagcgt attggctgca tggaaaaaga tgaattggc	1200
30	caggaatata agaaaggcgg ctgtggtggt tttggtaaag gtaattttag cgaactgttt	1260
	aaaagcattg aagattatga aaaaagcctg gaagccaaac agagcgcagt tgcacagcag	1320
	agctaa	1326
35	<210> 55	
	<211> 1323	
	<212> ADN	
	<213> Alopecurus myosuroides	
40	<400> 55	
	atgccaccaa ctactgctac tgctacaggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
45	gctgctagaa ggttccaag agttgttaga gtaaccaa ggtctgatag gttccaagt	120
	cttgctttcc atcatgttga gttttggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaaagatt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
50	cacgcttctc accttttgag atctggtgct cttgctttcc ttttactgc tccttatgct	300
	ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc ttttcaact	360
55	gaggctgcta ggactttctc ttctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
	gttgcagatg ctgcagaggc tttccatact tctgttgctg gtggtgctag accagctttt	480
	gctccagctg atcttgatc tggatttggc cttgctgagg ttgagcttta cggatgatgt	540
60	gttcttagat tcgtgtctca ccagatggt gatgatgttc catttcttcc aggattcgag	600
	ggtgttagta gaccaggtgc tatggattat ggactcacta ggttcgatca cgttgtggga	660
65	aatgttccag aatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg atttcatgag	720
	ttcgtgagt tcaactgctga ggatgttggc actgctgagt ctggacttaa ctctgttgtg	780
	cttgctaaca actctgaggc tgttcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840

## ES 2 555 386 T3

	agaagatctc agattcagac ttacctcgat taccatgggtg gaccaggtgt tcaacatatt	900
5	gctcttgctt catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
	ggaggatttg agtttatggc tccaccacaa gctaagtatt acgaaggtgt tagaaggctt	1020
	gctggatgatg ttctttctga ggctcaaadc aaagagtgcc aagagcttgg agttcttggt	1080
10	gatagagatg atcaggggtg gcttctccag attttacta agccagttgg agataggcca	1140
	acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
15	gagtacaaa agggcggatg tgggtgattt ggaaagggaa atttctccga gcttttcaag	1260
	tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
	tga	1323
20		
	<210> 56	
	<211> 1323	
	<212> ADN	
	<213> Sorghum halepense	
25		
	<400> 56	
	atgcctccga ccccgaccac cgcagcagca acaggtgccg cagttgcagc agcaagcgc	60
30	gaacaggcag catttcgtct ggttggtcat cgtaattttg ttcgtgttaa tccgcgtagc	120
	gatcgttttc ataccctggc atttcatcat gttgaaactgt ggtgtgccga tgcagccagc	180
	gcagcaggtc gtttttagctt tggctctgggt gcaccctggc cagcagctag cgatctgagc	240
35	accgtaata ccgcacatgc aagcctgctg ctgcgttcag gtgcaactggc atttctgttt	300
	accgcaccgt atgccatgg tgctgatgca gcaaccgcaa gcctgccgag ctttagcgca	360
40	gcagaagcac gtcgttttgc agcagatcat ggtctggcag ttcgtgccgt tgcaactgct	420
	gttgagatg ccgaagatgc atttctgca agcgttgca cgggtgcacg tccggcattt	480
	gaaccggttg aactgggtct gggttttcgt ctggccgaag ttgaaactgta tggatgatgt	540
45	gttctgcgtt atgtagctt tccgatgat gcagatgcaa gctttctgcc gggttttggt	600
	ggtgttagca gtcgggtgc ggcagattat ggcctgcgtc gttttgatca tattgtgggt	660
	aatgttccgg aactggcacc ggcagcggca tattttgcag gttttaccgg ctttcatgaa	720
50	tttgagaat ttaccgcaga agatgttggc accaccgaaa gcggtctgaa tagcatgggt	780
	ctggcaata atgccgaaa tgttctgctg ccgctgaatg aaccggtgca tggcaccaaa	840
55	cgctcgtacc agattcagac ctttctggat catcatgggtg gtccgggtgt tcagcacatg	900
	gcactggcaa gtgatgatgt gctgcgtacc ctgcgtgaaa tgcaggcatg tagtgcaatg	960
60	ggtggttttg aatttatggc accgccggca ccggaatatt atgatgggtg tcgtcgtcgt	1020
	gccggatgatg ttctgaccga agcacagatt aaagaatgtc aggaactggg cgttctgggt	1080
	gatcgtgatg atcaggggtg tctgctgcag atttttacca aaccggttgg tgatcgtccg	1140
65	accttttttc tggaaattat tcagcgtatt ggttgcatgg aaaaagatga aaaaggccag	1200
	gaatatcaga aaggcgggtg tgggtggttt ggtaaaggta attttagcca gctgtttaaa	1260

## ES 2 555 386 T3

	agcattgaag attatgaaaa aagcctggaa gcaaaacagg cagctgcagc acaggggccg	1320
	taa	1323
<b>5</b>	<210> 57 <211> 1323 <212> ADN <213> Sorghum halepense	
<b>10</b>	<400> 57 atgcctccga ccccgaccac cgcagcagca acaggtgccg cagttgcagc agcaagcgc	60
<b>15</b>	gaacaggcag catttcgtct ggttggtcat cgtaattttg ttcgtgtaa tccgcgtagc	120
	gatcgttttc ataccctggc atttcatcat gttgaaactgt ggtgtgccga tgcagccagc	180
	gcagcaggtc gttttagctt tggctctgggt gcaccgctgg cagcacgtag cgatctgagc	240
<b>20</b>	accggttaata cgcacatgc aagcctgctg ctgcgttcag gtgcactggc atttctgttt	300
	accgcaccgt atgccatgg tgctgatgca gcaaccgcaa gcctgccgag ctttagcgca	360
<b>25</b>	gcagaagcac gtcgttttgc agcagatcat ggtctggcag ttcgtgccgt tgcactgcgt	420
	gttgcagatg ccgaagatgc atttctgca agcgttgca cgggtgcacg tccggcattt	480
	gaaccggttg aactgggtct gggttttcgt ctggccgaag ttgaaactgta tggatgatgt	540
<b>30</b>	gttctgcgtt atgtagcta tccggatgat gcagatgcaa gctttctgcc gggttttggt	600
	ggtgttacca gtccgggtgc ggcagattat ggcctgaaac gttttgatca tattgtgggt	660
<b>35</b>	aatgttccgg aactggcacc ggcagcggca tattttgcag gttttaccgg ctttcatgaa	720
	tttgcagaat ttaccgcaga agatgttggc accaccgaaa gcggtctgaa tagcatggtt	780
	ctggcaaata atgccgaaaa tgttctgctg ccgctgaatg aaccggtgca tggcaccaaa	840
<b>40</b>	cgctcgtagc agattcagac ctttctggat catcatggtg gtccgggtgt tcagcacatg	900
	gcactggcaa gtgatgatgt gctgctgacc ctgcgtgaaa tgcaggcacg tagtgcaatg	960
<b>45</b>	ggtggttttg aatttatggc accgccggca ccggaatatt atgatggtgt tcgtcgtcgt	1020
	gccgggtgatg ttctgaccga agcacagatt aaagaatgtc aggaactggg cgttctggtt	1080
	gatcgtgatg atcagggtgt tctgctgcag atttttacca aaccggttg tgatcggccg	1140
<b>50</b>	accttttttc tgaaattat tcagcgtatt ggttgcattg aaaaagatga aaaagccag	1200
	gaatatcaga aaggcggttg tgggtgtttt ggtaaaggta attttagcca gctgtttaa	1260
<b>55</b>	agcattgaag attatgaaaa aagcctggaa gcaaaacagg cagctgcagc acaggggccg	1320
	taa	1323
<b>60</b>	<210> 58 <211> 1311 <212> ADN <213> Poa annua	
<b>65</b>	<400> 58 atgcctccga ccaccgcaac gccaccgca gcagcaaccg ttacaccgga acatgcagca	60
	cgctcgttttc cgcgtgttgt tcgtgttaat ccgcgtagcg atcgttttcc ggttctgagc	120

## ES 2 555 386 T3

	tttcatcatg ttgaatthttg gtgtgccgat gcagcaagcg cagcaggctg ttttagcttt	180
	gcactgggtg caccgctggc agcacgtagc gatctgagca ccgtaaatag cgcacatgca	240
5	agcctgctgc tgcgttcagg tgactggca tttctgttta ccgcaccgta tgcaccgcag	300
	ccgcaggatg cagataccgc aagcattccg agcttttagcg cagatgcagc acgtgcattt	360
10	agcgcagcac atggtctggc agttcgtagc gttgcagttc gtgttgcaga tgccgcagat	420
	gcatttcgtg caagcattgc agccggtgca cgtccggcat ttgcaccggc agatctgggt	480
	cgtggthttg gtctggccga agttgaactg tatggtgatg ttgttctgcy tttgtttage	540
15	catccggatg cagatgatgc accgccgttt ctgccgggtt ttgaagcagt tagccgtcgt	600
	ccgggtgccg ttgattatgg tctgaccctg tttgatcatg ttgttggtaa tgttccggaa	660
20	atgggtccgg tgattgatta tattaaggc tttatgggct ttcataaatt tgccgaattt	720
	accgcagaag atgttggcac caccgaaagc ggtctgaata gcgttgttct ggcaaataat	780
	agcgaagcag ttctgctgcc gctgaatgaa ccggtgcatg gcaccaaacy tcgtagccag	840
25	attcagacct atctggaata tcatggtggt ccgggtgttc agcatattgc actggcaagc	900
	agtgatgttc tgcgtaccct gcgtgaaatg caggcacgtt cagcaatggg tggthttgaa	960
30	tttatggcac cgccgcagcc gaaatattat gaagggttc gtcgtattgc cggatgatt	1020
	ctgagcgaag cacagattaa agaatgtcag gaactgggcy ttctggttga tcgtgatgat	1080
	cagggtgttc tgctgcagat ttttaccaaa ccggttggtg atcgtccgac cthttttctg	1140
35	gaaatgattc agcgtattgg ctgcatggaa aaagatgaac gtggtcagga atatcagaaa	1200
	ggcggttgtg gcggtthttg taaagtaat tttagcgaac tgtttaaag cattgaagat	1260
40	tatgaaaaaa gcctggaagc caaacagagc gcagttgcac agcagagcta a	1311
	<210> 59	
	<211> 1305	
	<212> ADN	
45	<213> Poa annua	
	<400> 59	
	atgccaccaa ctactgctac tgctacagct gctgctactg ttactccaga acatgctgct	60
50	agaaggttcc caagagttgt tagagttaac ccaaggtctg ataggttccc agttctttct	120
	ttccaccacg ttgaatthttg gtgtgctgat gctgcttctg ctgctggaag atthttcttt	180
	gctcttggtg ctccacttgc tgctagatct gatttgtcta ctggaattc tgctcacgct	240
55	tctthtcttt tgaggctcgg tgctcttgc ttcctthtta ctgctcctta tgctccacaa	300
	ccacaggatg ctgatactgc atcaattcca tctthtctcag ctgatgctgc aagggtthtt	360
60	tctgctgctc atgattggc tgtagatct gttgctgtta gagttgctga tgcagctgat	420
	gctthcagag cthctattgc tgcaggtgct agaccagctt ttgctccagc tgatcttgg	480
	agaggatttg gacttgcga ggttgagctt tacggtgatg ttgttcttag attcgtgctc	540
65	caccagatg ctgatgatgc tccatttctt ccaggatttg aggtgttht tagaccaggt	600
	gctgttgatt atggactcac taggttcgat cacgttggg gaaatgttcc agaaatggga	660

## ES 2 555 386 T3

	ccagtgatcg attacatcaa gggattcatg ggattccatg agttcgtga gtttactgct	720
5	gaggatggtg gaactactga gtctggactt aactctgttg tgcttgctaa caactctgag	780
	gctgttcttt tgccacttaa tgagccagtt cacggcacta agagaagatc tcagattcag	840
	acttaccttg agtaccatgg tggaccaggt gttcaacata ttgctcttgc ttcactctgat	900
10	gtgcttagga ctcttagaga gatgcaagct agatctgcta tgggaggatt tgagtttatg	960
	gctccaccac aacctaagta ttacgagggg gttagaagga ttgctggtga tgttctttcc	1020
15	gaggctcaaa tcaaagagtg tcaagagctt ggagtgcttg tggatagaga tgatcagggg	1080
	gtgcttctcc agattttcac taagccagtt ggagataggc caacattctt cttggagatg	1140
	attcagagga tcggctgcat ggaaaaggat gagagaggtc aagagtatca aaagggcgga	1200
20	tgtggtgat ttggaaaggg aaatttctcc gagcttttca agtccatcga ggattacgag	1260
	aagtctcttg aggctaagca atctgctggt gctcaacagt cttga	1305
25	<210> 60 <211> 1323 <212> ADN <213> <i>Lolium multiflorum</i>	
30	<400> 60 atgcctccga caccggcaac cgcaaccggg gctgcagcag cagcagttac accggaacat	60
	gcagcacgta gctttccgcg tgttgttcgt gttaatccgc gtagcgcgag ttttccggtt	120
35	ctgagctttc atcatgttga actgtggtgt gccgatgcag caagcgcagc aggtcgtttt	180
	agctttgcac tgggtgctcc gctggcagcc cgtagcgcag tgagcaccgg taatagcgca	240
40	catgcaagcc tgctgctgcg tagcggtgca ctggcatttc tgtttaccgc accgtatgca	300
	ccgcctccgc aggaagcagc aaccgcagct gcaaccgcaa gcattccgag ctttagcgca	360
	gatgcagccc gtacctttgc agcagcacat ggtctggcag ttcgtagcgt tgggttctgt	420
45	gttgccgatg cagcggaaagc atttctgtgt agcgttgccg gtggtgcaag tccggcattt	480
	gcaccggcag atctgggtca tggttttggt ctggccgaag ttgaactgta tggatgatgt	540
50	gttctgcggt ttgtagcta tccggatgaa accgatctgc cgtttctgcc gggttttgaa	600
	cgtgtagca gtccgggtgc cgttgattat ggtctgacct gttttgatca tgttggtggt	660
	aatgttccgg aatggcacc ggttattgat tatatgaaag gctttctggg ctttcatgaa	720
55	tttgcagaat ttaccgcaga agatgttggc accaccgaaa gcggtctgaa tagcgttgtt	780
	ctggcaaata atagcgaata tgttctgctg ccgctgaatg aaccggtgca tggcaccaaa	840
60	cgtagtagcc agattcagac ctatctggat tatcatggtg gtccgggtgt tcagcatatt	900
	gcactggcaa gcaccgatgt tctgctgacc ctgctgaaa tgcgtgcacg taccctgatg	960
	ggtggttttg aatttatggc accgccgcag gcaaaatatt atgaaggtgt tcgctgtatt	1020
65	gccggtgatg ttctgagcga agaacaatt aaagaatgct aggaactggg cgttctggtt	1080
	gatcgtgatg atcaggggtg tctgctgcag atttttacca aaccggttgg tgatcgtccg	1140

## ES 2 555 386 T3

	accttttttc tggaaatgat tcagcgtatt ggctgcatgg aaaaagatga agttggtcag	1200
	gaatadcaga aaggcggttg tgggtggttt ggtaaaggta attttagcga actgtttaa	1260
5	agcattgaag attatgaaaa aaccctggaa gccaaacaga gcgttgttgc acagaaaagc	1320
	taa	1323
10	<210> 61 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
15	<400> 61 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
20	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
25	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
30	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgct	480
	ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttcagg atttgagagg	600
35	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctcaactagg tcgatcacgt tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttgatt ccatgagttc	720
40	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
45	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct	1020
50	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat	1080
	agagatgata aggggtgtgct tctccagatt ttactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
55	tacccaaaag gcggatgtgg tggatttggg aagggaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
60	<210> 62 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
65	<400> 62 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60

## ES 2 555 386 T3

	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
5	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
10	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
15	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
20	gtttcatctc cagggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacat tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttggatt ccatgagttc	720
	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
25	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac cagggtttca acatattgct	900
30	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tctcgtggat	1080
35	agagatgatac aggggtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
40	tacaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
45	<210> 63 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
50	<400> 63 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
55	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
60	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
65	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600

## ES 2 555 386 T3

	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacct tgtgggaaat	660
5	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
10	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
	cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
15	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggttag aaggattgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagct tctcgtggat	1080
	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
20	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
	taccaaaagg gcggtatggt tggatttggg aagggaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
25	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
	<210> 64	
	<211> 1320	
	<212> ADN	
30	<213> Avena sativa	
	<400> 64	
	atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
35	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtttaaccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggagattt	180
40	tcttttctc ttggtgctcc acttctgctg aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
45	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttctg	480
50	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat	660
55	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
60	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
	cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
65	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggttag aaggattgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagct tctcgtggat	1080

## ES 2 555 386 T3

	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
5	taccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
10	<210> 65 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
15	<400> 65 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
20	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
25	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
30	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgct	480
	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
35	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctcaactagg tcatcacgt tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttgatt ccatgagttc	720
40	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
45	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatgaagcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct	1020
50	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tctcgtggat	1080
	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
55	taccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
60	<210> 66 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
65	<400> 66 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60

## ES 2 555 386 T3

	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttccttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
5	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
10	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
15	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
20	gtttcatctc cagggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
25	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac cagggtttca acatattgct	900
30	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatgattcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tctcgtggat	1080
35	agagatgatac aggggtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
40	tacaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
45	<210> 67 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
50	<400> 67 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
55	ctttccttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
60	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
65	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600

## ES 2 555 386 T3

	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat	660
5	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
10	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
	cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
15	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggaggct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagct tctcgtggat	1080
	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
20	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
	tacccaaagg gcggtatggt tggatttggg aagggaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
25	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
	<210> 68	
	<211> 1320	
	<212> ADN	
30	<213> Avena sativa	
	<400> 68	
	atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
35	gctgctagat cttttccaag ggttgtaga gtttaaccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggagattt	180
40	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
45	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttctg	480
50	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat	660
55	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
60	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
	cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
65	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggatgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagct tctcgtggat	1080

## ES 2 555 386 T3

	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
5	tacaaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
10	<210> 69 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
15	<400> 69 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
20	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
25	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
30	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttctg	480
	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
35	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctcaactagg tcatcacgt tgtgggaaat	660
	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttggatt ccatgagttc	720
40	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
45	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggtgcgct	1020
50	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tctcgtggat	1080
	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
55	tacaaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
60	<210> 70 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
65	<400> 70 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60

## ES 2 555 386 T3

	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
5	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
10	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
15	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
20	gtttcatctc cagggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat	660
	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttggatt ccatgagttc	720
	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
25	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac cagggtttca acatattgct	900
30	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tctcgtggat	1080
35	agagatgatac aggggtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
40	tacaaaagg gcggatgtgg tagatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
45	<210> 71 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
50	<400> 71 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
55	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
60	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
65	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600

## ES 2 555 386 T3

	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacgt tgtgggaaat	660
5	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	720 780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
10	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	900 960
	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct	1020
15	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttactaagc cagttggaga taggccaaca	1080 1140
20	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag taccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaatt tctccgagct tttcaagtcc	1200 1260
25	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
	<210> 72 <211> 1320 <212> ADN	
30	<213> Avena sativa	
	<400> 72	
	atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
35	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggagattt	120 180
40	tcttttctc ttggtgtcc acttctgctt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct cacgcttctt tgctttttag gtctgtgtgt cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	240 300
	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
45	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttctg	420 480
50	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt cttcgtttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	540 600
	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacat tgtgggaaat	660
55	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	720 780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
60	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	900 960
65	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat	1020 1080

## ES 2 555 386 T3

	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
5	tacaaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
10	<210> 73 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
15	<400> 73 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
20	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
25	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
30	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgct	480
	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
35	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctcaactagg tcatcacat tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttgatt ccatgagttc	720
40	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
45	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatggctcc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggattgct	1020
50	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat	1080
	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
55	tacaaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
60	<210> 74 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
65	<400> 74 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60

## ES 2 555 386 T3

	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttccttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
5	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
10	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
15	ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
20	gtttcatctc cagggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacat tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
25	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac cagggtttca acatattgct	900
30	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggattgct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tctcgtggat	1080
35	agagatgata aggggtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
40	tacaaaagg gcggatgtgg tggatttggga aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
45	<210> 75 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
50	<400> 75 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
55	ctttccttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
60	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
65	ccagctgata ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600

## ES 2 555 386 T3

	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacat tgtgggaaat	660
5	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	720 780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
10	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	900 960
	ggatttgagt ttatgaagcc accacaagct aagtattacg aggggttag aaggattgct	1020
15	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1080 1140
20	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcattgaaa aggatgaagt tggacaagag taccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaatt tctccgagct tttcaagtcc	1200 1260
25	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
	<210> 76 <211> 1320 <212> ADN	
30	<213> Avena sativa	
	<400> 76	
	atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
35	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggagattt	120 180
40	tcttttctc ttggtgctcc acttctgctt aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	240 300
	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
45	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttctgct	420 480
50	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt cttcgtttctg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	540 600
	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacct tgtgggaaat	660
55	gttccagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc gctgagtta ctgctgagga tgttgaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	720 780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
60	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct cttgcttcta acgatgtgct taggactcct agagagatga gagctagaac tccaatggga	900 960
65	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggttag aaggattgct ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat	1020 1080

## ES 2 555 386 T3

	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
5	tacaaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
10	<210> 77 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
15	<400> 77 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtgaga gtaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
20	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaaagatt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
25	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttgg agttagagtt	420
30	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttctg	480
	ccagctgatc ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttgtt	540
	cttcgtttgc tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
35	gtttcatctc caggtgctgt tgattatgga ctcaactagg tcatcacat tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaagggat tccttggatt ccatgagttc	720
40	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac caggtgttca acatattgct	900
45	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtgtag aaggaggct	1020
50	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttggagt tatggtggat	1080
	agagatgatc aggggtgtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
55	tacaaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
60	<210> 78 <211> 1320 <212> ADN <213> Avena sativa	
65	<400> 78 atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60

## ES 2 555 386 T3

	gctgctagat cttttccaag ggttgtagaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggaagattt	180
5	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
10	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgct actgcttcta ttccatcttt ttcagctgat	360
	gctgcaagga cttttgctgc tgctcatgga cttgctgtta gatctgttg agttagagtt	420
	gctgatgcag ctgaggcttt cagagtttct gttgctggtg gtgctagacc agcttttgc	480
15	ccagctgatac ttggacatgg atttggactt gctgaggttg agctttacgg tgatgttggt	540
	cttcgtttcg tgtcttacc agatgagact gatcttccat tccttccagg atttgagagg	600
20	gtttcatctc cagggtgctgt tgattatgga ctactaggt tcgatcacct tgtgggaaat	660
	gttcagaaa tggctccagt gatcgattac atgaaggat tccttgatt ccatgagttc	720
	gctgagttta ctgctgagga tgttggaaact actgagtctg gacttaactc tgttgtgctt	780
25	gctaacaact ctgaggctgt tcttttgcca cttaatgagc cagttcacgg cactaagaga	840
	agatctcaga ttcagactta ccttgagtac catggtggac cagggtttca acatattgct	900
30	cttgcttcta acgatgtgct taggactctt agagagatga gagctagaac tccaatggga	960
	ggatttgagt ttatgagacc accacaagct aagtattacg aggggtttag aaggaggct	1020
	ggtgatgttc tttccgagga acagatcaaa gagtgtcaag agcttgagat tatggtggat	1080
35	agagatgatac aggggtgct tctccagatt ttcactaagc cagttggaga taggccaaca	1140
	ttcttcttgg agatgattca gaggatcggc tgcatggaaa aggatgaagt tggacaagag	1200
40	tacccaaaagg gcggatgtgg tggatttggg aagggaaatt tctccgagct tttcaagtcc	1260
	atcgaggatt acgagaagtc tcttgaggtt aagcagtctg ttgtggctca gaagtcttga	1320
45	<210> 79 <211> 1305 <212> ADN <213> Poa annua	
50	<400> 79 atgccaccaa ctactgctac tgctacagct gctgctactg ttactccaga acatgctgct	60
	agaaggttcc caagagttgt tagagttaac ccaaggtctg ataggttccc agttctttct	120
55	ttccaccacg ttgaattttg gtgtgctgat gctgcttctg ctgctggaag attttctttt	180
	gctcttggtg ctccacttgc tgctagatct gatttgtcta ctggaaattc tgctcacgct	240
	tctttgcttt tgaggctctgg tgctcttgc ttccttttta ctgctcctta tgctccacaa	300
60	ccacaggatg ctgatactgc atcaattcca tctttctcag ctgatgctgc aagggtttt	360
	tctgctgctc atggattggc tgtagatct gttgctgtta gagttgctga tgcagctgat	420
65	gctttcagag cttctattgc tgcaggtgct agaccagctt ttgctccagc tgatcttggg	480
	agaggatttg gacttctga ggttgagctt tacggatgat ttgttcttag attcgtgtct	540
	caccagatg ctgatgatgc tccatttctt ccaggatttg aggctgtttc tagaccaggt	600

## ES 2 555 386 T3

	gctggtgatt atggactcac taggttcgat cacgttgagg gaaatgttcc agaaatggga	660
5	ccagtgatcg attacatcaa gggattcatg ggattccatg agttcgctga gtttactgct	720
	gaggatggtg gaactactga gtctggactt aactctggtg tgcttgctaa caactctgag	780
	gctggtcttt tgccacttaa tgagccagtt cacggcacta agagaagatc tcagattcag	840
10	acttaccttg agtaccatgg tggaccaggt gttcaacata ttgctcttgc ttcactctgat	900
	gtgcttagga ctcttagaga gatgcaagct agatctgcta tgggaggatt tgagtttatg	960
15	aggccaccac aacctaagta ttacgagggg gttagaagga ttgctggtga tgttctttcc	1020
	gaggctcaaa tcaaagagtg tcaagagctt ggagtgatgg tggatagaga tgatcagggg	1080
	gtgcttctcc agattttcac taagccagtt ggagataggc caacattctt cttggagatg	1140
20	attcagagga tcggctgcat ggaaaaggat gagagaggtc aagagtatca aaagggcgga	1200
	tgtggtggat ttggaaaggg aaatttctcc gagcttttca agtccatcga ggattacgag	1260
25	aagtctcttg aggctaagca atctgctggt gctcaacagt cttga	1305
	<210> 80	
	<211> 1305	
	<212> ADN	
30	<213> Poa annua	
	<400> 80	
	atgccaccaa ctactgctac tgctacagct gctgctactg ttactccaga acatgctgct	60
35	agaaggttcc caagagtgtg tagagttaac ccaaggtctg ataggttccc agttctttct	120
	ttccaccacg ttgaattttg gtgtgctgat gctgcttctg ctgctggaag attttctttt	180
40	gctcttggtg ctccacttgc tgctagatct gatttgctta ctggaaatc tgctcacgct	240
	tctttgcttt tgaggtctgg tgctcttgc ttccttttta ctgctcctta tgctccacaa	300
	ccacaggatg ctgatactgc atcaattcca tctttctcag ctgatgctgc aagggtttt	360
45	tctgctgctc atggattggc tgttagatct gttgctgcta gagttgctga tgcagctgat	420
	gctttcagag cttctattgc tgcaggtgct agaccagctt ttgctccagc tgatcttggg	480
50	agaggatttg gacttctga ggttgagctt tacggatgag ttgttcttag attcgtgtct	540
	caccagatg ctgatgatgc tccatttctt ccaggatttg aggctgtttc tagaccaggt	600
	gctggtgatt atggactcac taggttcgat cacattgtgg gaaatgttcc agaaatggga	660
55	ccagtgatcg attacatcaa gggattcatg ggattccatg agttcgctga gtttactgct	720
	gaggatggtg gaactactga gtctggactt aactctggtg tgcttgctaa caactctgag	780
60	gctggtcttt tgccacttaa tgagccagtt cacggcacta agagaagatc tcagattcag	840
	acttaccttg agtaccatgg tggaccaggt gttcaacata ttgctcttgc ttcactctgat	900
	gtgcttagga ctcttagaga gatgcaagct agatctgcta tgggaggatt tgagtttatg	960
65	aggccaccac aacctaagta ttacgagggg gttagaagga ttgctggtga tgttctttcc	1020
	gaggctcaaa tcaaagagtg tcaagagctt ggagtgatgg tggatagaga tgatcagggg	1080

## ES 2 555 386 T3

	gtgcttctcc agattttcac taagccagtt ggagataggc caacattctt cttggagatg	1140
	attcagagga tcggctgcat ggaaaaggat gagagaggtc aagagtatca aaagggcgga	1200
5	tgtggtggat ttggaaaggg aaatttctcc gagcttttca agtccatcga ggattacgag	1260
	aagtctcttg aggctaagca atctgctggt gctcaacagt cttga	1305
10	<210> 81 <211> 1323 <212> ADN <213> <i>Alopecurus mycosuroides</i>	
15	<400> 81 atgccaccaa ctactgctac tgctacaggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagaa ggttcccaag agttgttaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
20	cttgctttcc atcatgttga gttttggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggaaagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
	cacgcttctc accttttgag atctggtgct cttgctttcc ttttactgc tccttatgct	300
25	ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc tttttcaact	360
	gaggctgcta ggactttctc ttctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
30	gttgcagatg ctgcagaggc tttccatact tctgttgctg gtggtgctag accagctttt	480
	gctccagctg atcttgatc tggatttgga cttgctgagg ttgagcttta cggatgatgtt	540
	gttcttagat tcgtgtctca cccagatggt gatgatgttc catttcttcc aggattcgag	600
35	ggtgttagta gaccaggtgc tatggattat ggactcacta ggttcgatca cgttgtggga	660
	aatgttccag aatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg atttcatgag	720
40	ttcgctgagt tcaactgctga ggatgttgga actgctgagt ctggacttaa ctctgttggtg	780
	cttgctaaca actctgaggc tgttcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840
	agaagatctc agattcagac ttacctgat taccatggtg gaccaggtgt tcaacatatt	900
45	gctcttgctt catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
	ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaagggtg tagaaggctt	1020
50	gctggtgatg ttctttctga ggctcaaadc aaagagtgcc aagagcttgg agttatggtg	1080
	gatagagatg atcaggggtg gcttctccag attttacta agccagttgg agataggcca	1140
	acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
55	gagtaccaa agggcggatg tgggtgattt ggaaaggga atttctccga gcttttcaag	1260
	tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
60	tga	1323
65	<210> 82 <211> 1323 <212> ADN <213> <i>Alopecurus mycosuroides</i>	
	<400> 82	

## ES 2 555 386 T3

	atgccaccaa ctactgctac tgctacaggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagaa ggttcccaag agttgtaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
5	cttgctttcc atcatgttga gttttggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
10	cacgcttctc accttttgag atctgggtgct cttgctttcc ttttcaactgc tccttatgct	300
	ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc tttttcaact	360
	gaggctgcta ggactttctc ttctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
15	gttgcagatg ctgcagaggc tttccatact tctgttgctg gtggtgctag accagctttt	480
	gctccagctg atcttgatc tggatttggc cttgctgagg ttgagcttta cggatgatgtt	540
20	gttcttagat tctgtctca cccagatggg gatgatgttc catttcttcc aggattcagag	600
	ggtgttagta gaccaggtgc tatggattat ggactcacta ggttcgatca cattgtggga	660
	aatgttccag aatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg atttcatgag	720
25	ttcgctgagt tcaactgctga ggatgttggc actgctgagt ctggacttaa ctctgttgtg	780
	cttgctaaca actctgaggc tgttcttttg ccacttaatg agccagtcca cggcactaag	840
30	agaagatctc agattcagac ttacctcgat taccatggtg gaccaggtgt tcaacatatt	900
	gctcttgctt catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
	ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaaggtgt tagaaggctt	1020
35	gctggtgatg ttctttctga ggctcaaatac aaagagtgcc aagagcttgg agttatggtg	1080
	gatagagatg atcagggtgt gcttctccag attttcaacta agccagttgg agataggcca	1140
40	acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
	gagtacaaa agggcggatg tgggtgattt ggaaagggaa atttctccga gcttttcaag	1260
	tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
45	tga	1323
	<210> 83	
	<211> 217	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Petunia x hybrida</i>	
	<400> 83	
55	atggcacaaa ttaacaacat ggcacaaggg atacaaacc ttaatccaa ttccaatttc	60
	cataaacccc aagttcctaa atcttcaagt tttcttgtt ttggatctaa aaaactgaaa	120
	aattcagcaa attctatggt ggttttgaaa aaagattcaa tttttatgca aaagttttgt	180
60	tccttttagga tttcagcatc agtggctaca gcctgcc	217
	<210> 84	
	<211> 1323	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Avena sativa</i>	
	<400> 84	

## ES 2 555 386 T3

	atgccaccaa ctccagctac tgctactggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagat cttttccaag ggttgtagaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
5	ctttctttcc accacgttga actttggtgt gctgatgcag cttctgctgc tggagattt	180
	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct aggtctgatt tgtctactgg aaattctgct	240
10	cacgcttctt tgcttttgag gtctggtgct cttgctttcc tttttactgc tccttatgct	300
	ccaccaccac aagaagctgc tacagctgca gctactgctt ctattccatc tttttcagct	360
	gatgctgcaa ggacttttgc tgctgctcat ggacttgctg ttagatctgt tggagttaga	420
15	gttgctgatg cagctgaggc tttcagagtt tctggtgctg gtggtgctag accagctttt	480
	gctccagctg atcttgaca tggatttggc cttgctgagg ttgagcttta cggatgattt	540
20	gttcttcggt tcggtgctta cccagatgag actgatcttc cattccttcc aggatttgag	600
	aggggttcat ctccagtgct tgttgattat ggactcacta ggttcgatca cattgtggga	660
	aatgttccag aatggctcc agtgatcgat tacatgaagg gattccttgg attccatgag	720
25	ttcgctgagt ttactgctga ggatggttga actactgagt ctggacttaa ctctgttgtg	780
	cttgctaaca actctgaggc tgttcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840
30	agaagatctc agattcagac ttaccttgag taccatggtg gaccaggtgt tcaacatatt	900
	gctcttgctt ctaacgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag aactccaatg	960
	ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaggggtg tagaaggatt	1020
35	gctggtgatg ttctttccga ggaacagatc aaagagtgtc aagagcttgg agttatggtg	1080
	gatagagatg atcaggggtg gcttctccag attttacta agccagttgg agataggcca	1140
40	acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga agttggacaa	1200
	gagtacaaa agggcggatg tgggtgattt ggaaaggaa atttctccga gcttttcaag	1260
	tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gttaaagcagt ctggttggtg tcagaagtct	1320
45	tga	1323
	<210> 85	
	<211> 1323	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Alopecurus myosuroides</i>	
	<400> 85	
55	atgccaccaa ctactgctac tgctacaggt gctgctgctg cagctgttac tccagaacat	60
	gctgctagaa ggttccaag agttgttaga gttaacccaa ggtctgatag gttcccagtt	120
	cttgctttcc atcatgttga gttttggtgt gctgatgctg cttctgctgc tggagattt	180
60	tcttttgctc ttggtgctcc acttgctgct agatctgatt tgtctactgg aaactcttct	240
	cacgcttctc accttttgag atctggtgct cttgctttcc ttttactgc tccttatgct	300
	ccaccaccac aagatgctgc agatgcagca gctactgctt ctattccatc tttttcaact	360
65	gaggctgcta ggactttctc ttctgctcat ggattggctg ttagatctgt ggctattaga	420
	gttgcagatg ctgcagaggc tttccatact tctggtgctg gtggtgctag accagctttt	480

## ES 2 555 386 T3

	gctccagctg atcttggatc tggatttggga cttgctgagg ttgagcttta cggatgatgtt	540
5	gttcttagat tcgtgtctca cccagatggt gatgatgttc catttcttcc aggattcagag	600
	ggtgttagta gaccaggtgc tatggattat ggactcacta ggttcgatca ccttgtggga	660
	aatgttccag aaatggctcc agttgctgct tacatgaagg gattcactgg atttcatgag	720
10	ttcgctgagt tcaactgctga ggatgttggga actgctgagt ctggacttaa ctctgttgtg	780
	cttgctaaca actctgaggc tgttcttttg ccacttaatg agccagttca cggcactaag	840
15	agaagatctc agattcagac ttacctcgat taccatgggtg gaccaggtgt tcaacatatt	900
	gctcttgctt catctgatgt gcttaggact cttagagaga tgagagctag atctgctatg	960
	ggaggatttg agtttatgag accaccacaa gctaagtatt acgaaggtgt tagaaggagag	1020
20	gctggatgatg ttctttctga ggctcaaadc aaagagtgcc aagagcttgg agttatgggtg	1080
	gatagagatg atcaggggtg gcttctccag attttacta agccagttgg agataggcca	1140
25	acattcttct tggagatgat tcagaggatc ggctgcatgg aaaaggatga gattggacaa	1200
	gagtacaaa agggcgatg tgggtggattt ggaaaggaa atttctccga gcttttcaag	1260
	tccatcgagg attacgagaa gtctcttgag gctaagcaat ctgctgttgc tcaacagtct	1320
30	tga	1323
35	<210> 86 <211> 70 <212> ADN <213> Virus del mosaico del tabaco	
40	<400> 86 tatttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaacaa acattacaat tactatttac	60
	aattacacat	70
45	<210> 87 <211> 744 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Secuencia de ADN del promotor 35S doble	
55	<400> 87 aacatggtgg agcacgacac acttgtctac tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa	60
	gaccaaaggg caattgagac ttttcaacaa agggtaatat cggaaacct cctcggattc	120
	cattgccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac	180
60	aatgccatc attgagataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtgg	240
	cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg	300
	tcttcaaagc aagtggattg atgtgataac atggtggagc acgacacact tgttactcc	360
65	aaaaatatca aagatacagt ctcagaagac caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg	420
	gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag	480

## ES 2 555 386 T3

atagtggaaa aggaaggtgg ctcttacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc 540  
gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccacccac gaggagcatc 600  
5 gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc 660  
actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa 720  
10 ggaagttcat ttcatttggg gagg 744

<210> 88  
<211> 255  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de ADN del terminador Nos

20 <400> 88  
cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttagattg aatcctggtg ccggtcttgc 60  
gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgттаagcat gтаатаatta acatgтаatg 120  
25 catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acattтаata 180  
cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc 240  
30 tatgttacta gatcg 255

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 2;
- 5 b) un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 10 c) un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- d) un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 15 e) un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- f) un polipéptido que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 20 g) un polipéptido que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- h) un polipéptido que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 25 i) un polipéptido que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- j) un polipéptido que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 30 k) un polipéptido que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 35 l) un polipéptido que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- m) un polipéptido que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 40 n) un polipéptido que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- o) un polipéptido que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 45 p) un polipéptido que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 50 q) un polipéptido que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;

- r) un polipéptido que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 5 s) un polipéptido que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- t) un polipéptido que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 10 u) un polipéptido que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- v) un polipéptido que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 15 w) un polipéptido que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que la L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- x) un polipéptido que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 20 y) un polipéptido que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 25 z) un polipéptido que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- aa) un polipéptido que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 30 bb) un polipéptido que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- cc) un polipéptido que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 35 dd) un polipéptido que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 40 ee) un polipéptido que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- ff) un polipéptido que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 45 gg) un polipéptido que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- hh) un polipéptido que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 50

- ii) un polipéptido que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 5 jj) un polipéptido que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- kk) un polipéptido que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 10 ll) un polipéptido que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- mm) un polipéptido que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 15 nn) un polipéptido que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- oo) un polipéptido que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 20 pp) un polipéptido que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 25 qq) un polipéptido que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- rr) un polipéptido que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 30 ss) un polipéptido que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- tt) un polipéptido que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 35 uu) un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 40 vv) un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia G(I,V)LVD(R,K), en el que L se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- ww) un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia DH(V,I,M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 45 xx) un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- yy) un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de a), en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD y comprende la secuencia CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido;
- 50

- zz) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos (L,I,R)(V,A)(G,A)DVL(S,T), en el que la primera L, la I, o la R se sustituye por cualquier otro aminoácido, en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD;
- 5 aaa) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos G(I,V)LVD(R,K), en el que la L se sustituye por cualquier otro aminoácido, en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD;
- bbb) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos DH(V, I, M)VGN, en el que la primera V, la I o la M se sustituye por cualquier otro aminoácido, en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD;
- 10 ccc) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos GGF(E,D)F(M,L)(A,P), en el que la A o la P se sustituye por cualquier otro aminoácido, en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD; y
- ddd) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos CGGFGKGN, en el que la segunda G o la K se sustituye por cualquier otro aminoácido, en el que dicho polipéptido posee actividad enzimática de HPPD.
2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende además una o más sustituciones o supresiones de aminoácidos que corresponden a las sustituciones y supresiones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 1.
- 15 3. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado de la reivindicación 1.
4. El polinucleótido aislado de la reivindicación 3, seleccionado del grupo que consiste en SEC ID NOs: 54.
5. Un polinucleótido aislado que se hibrida en condiciones restrictivas al polinucleótido aislado de la reivindicación 3, en el que las condiciones restrictivas se seleccionan del grupo que consiste en:
- 20 a) 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50 °C con lavado en 2X SSC, 0,1% de SDS a 50 °C;
- b) 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50 °C con lavado en 1X SSC, 0,1% de SDS a 50 °C;
- 25 c) 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50 °C con lavado en 0,5X SSC;
- d) 0,1% de SDS a 50 °C, preferiblemente en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50 °C con lavado en 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 50 °C; y
- e) 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 0,5 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA a 50 °C con lavado en 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 65 °C.
- 30 6. Un casete de expresión que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 3, enlazado operablemente a un promotor que dirige la expresión en una planta o célula vegetal.
7. Un método para conferir resistencia o tolerancia a un inhibidor de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD) en una planta, comprendiendo el método introducir el casete de expresión de la reivindicación 6 en una planta.
8. Una célula vegetal transformada que comprende el casete de expresión de la reivindicación 6.
- 35 9. Una planta, parte de una planta, o semilla que comprende la célula vegetal de la reivindicación 8.

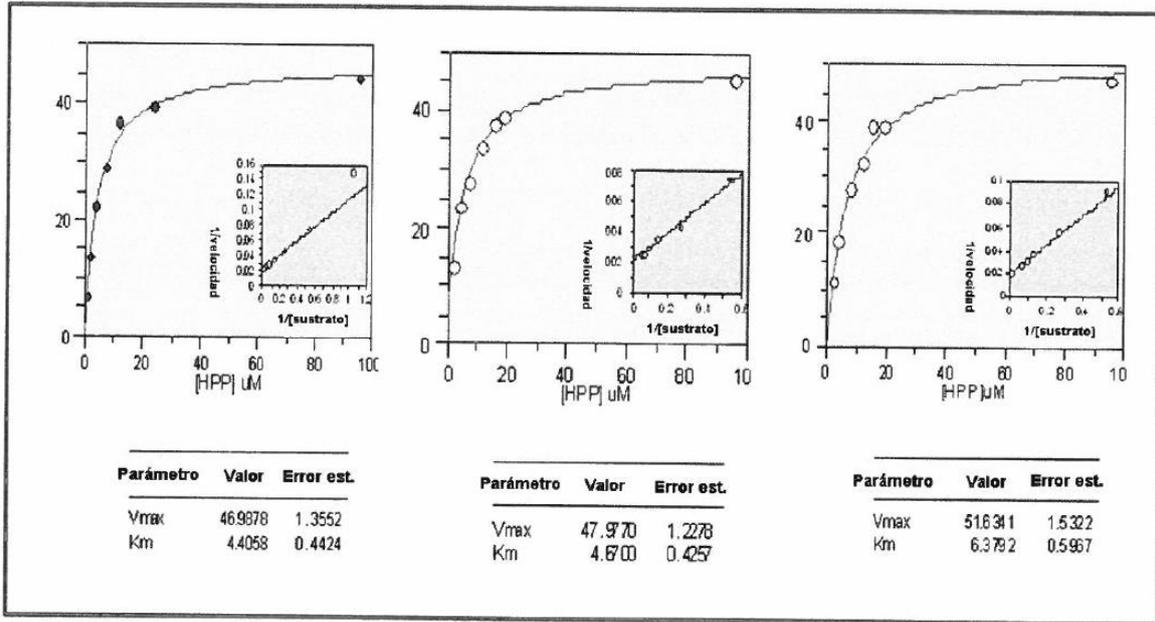


FIGURA 1

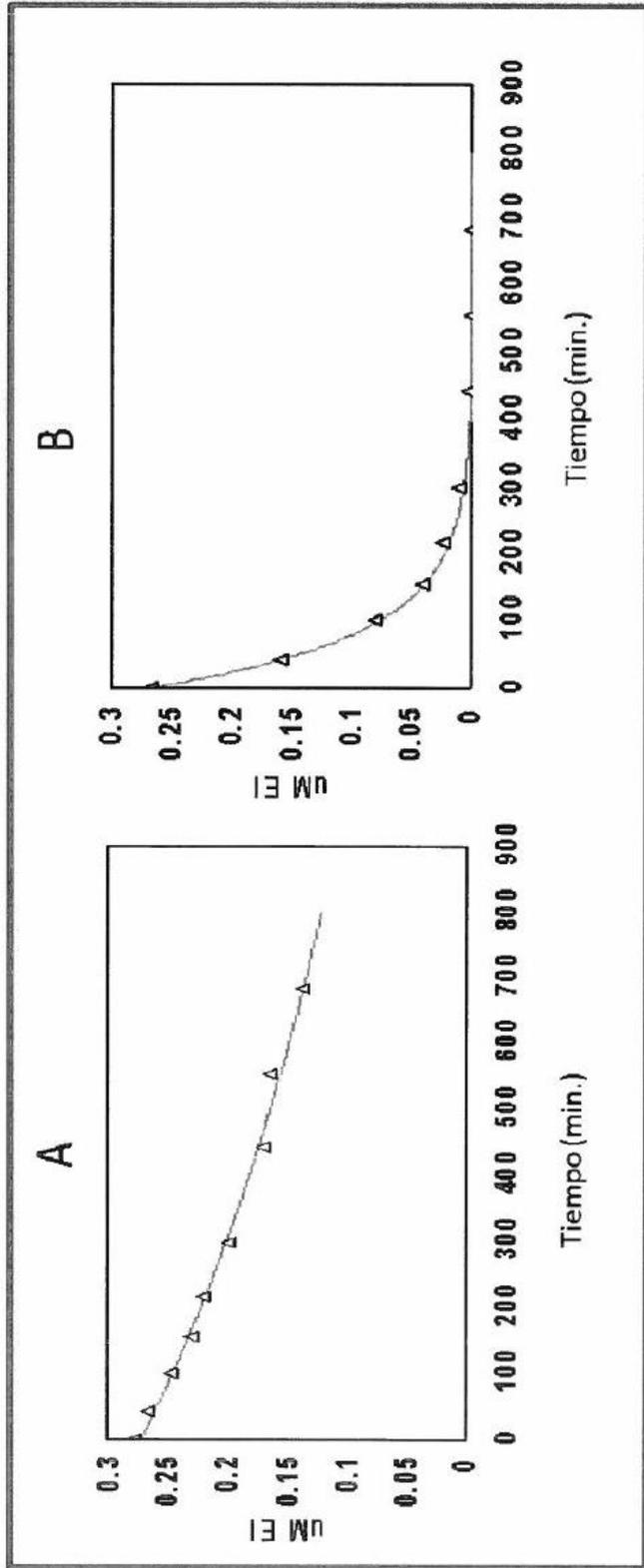


FIGURA 2

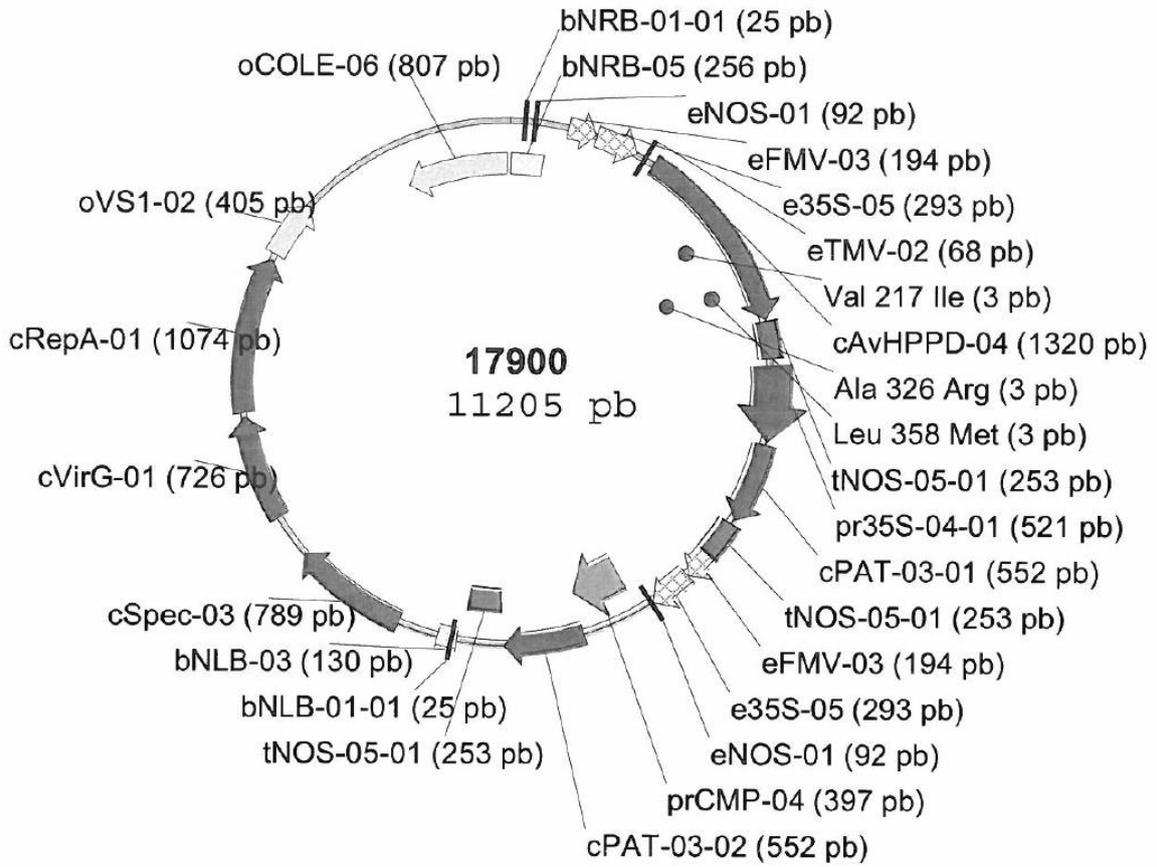


FIGURA 3

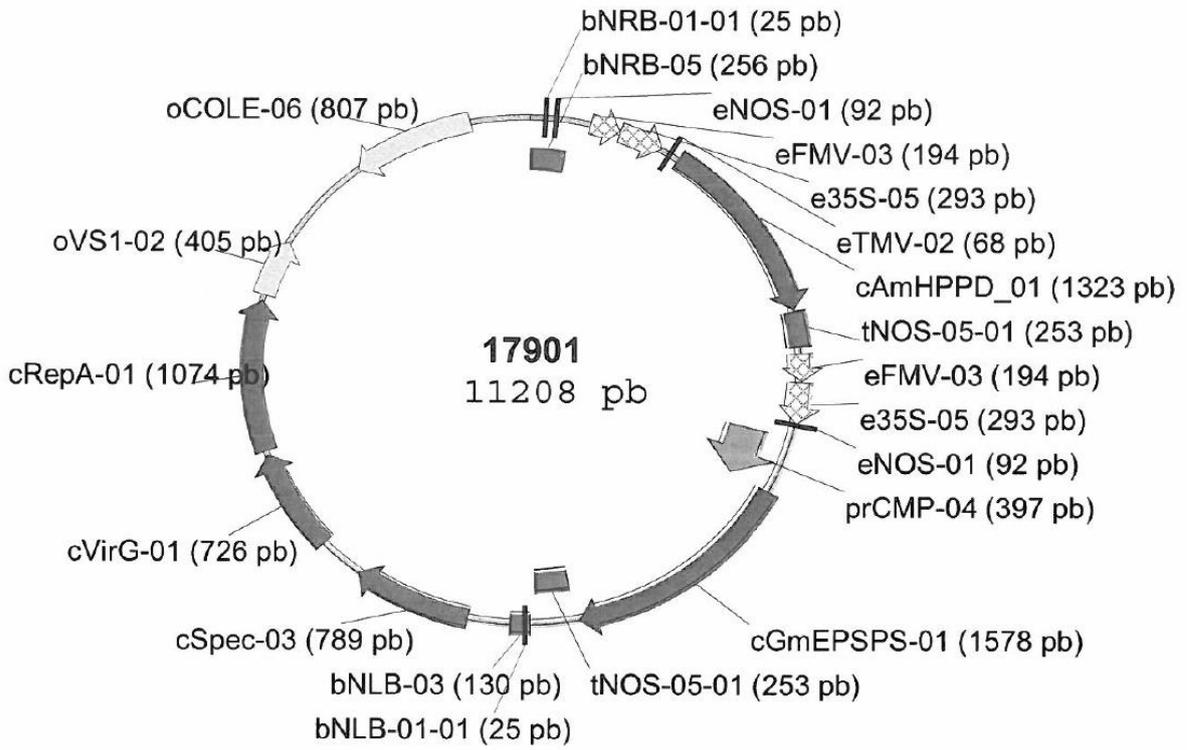


FIGURA 4