



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 127 698**

② Número de solicitud: 9700657

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 15/29

C12N 15/60

C12N 15/11

A01H 5/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.03.97**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.99**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.99

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE CORDOBA**
Rectorado Universidad de Córdoba
Alfonso XIII, n° 13
14001 Córdoba, ES

⑦ Inventor/es: **Muñoz Blanco, Juan y**
Caballero Repullo, José Luis

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Moléculas de ADN y promotores y Genes estructurales que codifican para la pectato liasa de fresa, y su utilización en la obtención de fresas transgénicas.**

⑤ Resumen:

Moléculas de ADN y promotores y Genes estructurales que codifican para la pectato liasa de fresa, y su utilización en la obtención de fresas transgénicas. Se proporcionan secuencias de ADN y promotores de gen que codifican para la pectato liasa de fresa. Dichos ADN y promotores tienen aplicación en la producción biotecnológica de plantas de interés agronómico, en especial de fresas transgénicas.

ES 2 127 698 A1

DESCRIPCION

Moléculas de ADN y promotores y Genes estructurales que codifican para la pectato liasa de fresa, y su utilización en la obtención de fresas transgénicas.

5 **Campo técnico de la invención**

Dentro del amplio campo de la Biología Molecular y sus aplicaciones en Agricultura y Horticultura, la presente invención se encuadra dentro del campo de la obtención de productos agrícolas transgénicos.

10 Más concretamente, la presente invención se refiere a una nueva molécula de ADNc y al promotor del gen que codifica para la pectato liasa de fresa y a su utilización en la obtención de fresas transgénicas.

Estado de la técnica anterior

15 La maduración de los frutos se caracteriza por ser un proceso en el que el fruto al final de su maduración sufre un reblandecimiento debido a una degradación de las paredes celulares de las células del fruto. Ello hace, que la gran mayoría de los frutos sean muy perecederos y que una vez maduros éstos sean de difícil recolección, almacenamiento, transporte y comercialización.

20 El reblandecimiento se debe fundamentalmente a la inducción en los últimos estadios de maduración de enzimas hidrolíticas de pared celular que degradan la misma. Una de las hidrolasas más potentes en la maceración de las paredes celulares es la pectato liasa enzima que cataliza la hidrólisis de las pectinas atacando enlaces glicosídicos 1,4 que unen los monómeros de ácido galacturónico, que son los constituyentes principales de las pectinas.

25 La aplicación de las técnicas de Biología Molecular ha permitido la modificación genética positiva de determinadas plantas, permitiendo la obtención de frutos transgénicos que presentan importantes ventajas comerciales.

30 Un claro ejemplo lo constituye el tomate. Mediante la tecnología del ARN antisentido se han conseguido frutos transgénicos de tomate que poseen actividades reducidas de las enzimas poligalacturonasa (PG) y pectin metil esterasa (PE).

35 Así, en los tomates transgénicos FLAVR SAVRTM, que actualmente se comercializan en Estados Unidos por la multinacional Calgene, se ha conseguido que la actividad PG se reduzca a menos de un 1 % de la actividad de tomates normales. Estos tomates transgénicos son más resistentes al resquebrajamiento y al daño mecánico que los tomates de variedades no transgénicas, por lo que presentan ventajas a la hora de su recolección, transporte y almacenamiento. También presentan la ventaja de que no necesitan ser recolectados hasta que no se encuentran en sus últimos estadios de maduración, que es cuando el sabor y otras propiedades organolépticas de los tomates son mejores. Además, hay que resaltar que este tipo de tomate también presenta una mayor viscosidad y un mayor contenido de sólidos. Estos tomates transgénicos han sido comercializados por ZENECA (U.K.) para la obtención de una nueva clase de pasta de tomate.

45 También se han conseguido, utilizando técnicas de ARN antisentido, tomates transgénicos que presentan unos niveles muy bajos de PE, y como consecuencia de ello, una mayor viscosidad de la pulpa de tomate.

50 Además, de los tomates, se han obtenido otras plantas transgénicas ya patentadas de gran interés agronómico.

Sin embargo, como puede observarse por los comentarios anteriores, todavía no se ha trabajado en el campo de la fresa, fruto altamente delicado y perecedero de gran interés comercial.

55 Pues bien, el solicitante ha investigado intensamente en el campo de la fresa obteniendo unos resultados espectaculares que constituyen la base de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a moléculas de ADNc y promotores y genes que codifican para la pectato liasa de fresa, y a su aplicación en la obtención de fresas transgénicas.

ES 2 127 698 A1

Como es sabido, la fresa (*Fragaria X ananassa*, C.V. Chandler) es una planta rosácea con tallos rastre-
ros y con estolones, hojas pecioladas, vellosas, blancas por el envés, divididas en tres segmentos aovados
y con dientes gruesos en el margen. Las flores son pedunculadas blancas o amarillentas solitarias o en
5 corimbos poco nutridos.

El fruto casi redondo, y rojo está formado por aquenios dispuestos sobre el receptáculo floral y es muy
apreciado por su succulento sabor y su fragancia.

10 Las fresas, aunque se utilizan ampliamente para la fabricación de compotas y mermeladas, son también
muy apreciadas para su consumo directo al natural.

Sin embargo, se trata de un fruto sumamente delicado que se estropea con mucha facilidad durante
su manipulación y almacenamiento, lo que repercute en grandes pérdidas económicas.

15 El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, en sus investi-
gaciones sobre los procesos de maduración de las fresas ha conseguido clonar genes de la fresa así como
sus ADNc correspondientes, que codifican para una pectato liasa.

20 La utilización de estos genes, sus promotores y ADNc correspondientes, por técnicas de ARN antisen-
tido y de sobreexpresión genética permite la obtención de fresas transgénicas con mejores cualidades de
dureza de sus paredes celulares. En efecto, se consigue disminuir la cantidad de actividad de pectato liasa
en fresa lo que permite la obtención de frutos con mayor resistencia, viscosidad y mejores propiedades
organolépticas.

25 Estas propiedades son altamente ventajosas desde el punto de vista de recolección, almacenamiento,
transporte y comercialización de la fresa, lo que redundará en un valor económico añadido al producto.

30 Concretamente, el ADNc se ha obtenido mediante un escrutinio diferencial de una genoteca substra-
ctiva de ADNc de fruto de fresa. La librería substractiva se construyó en fago lambda ZAP II de la casa
Stratagene mediante técnicas convencionales (Medina-Escobar y col., *Analytical Biochemistry*, "Cloning
and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening
process by a MAST-PCR-SBDS method", pendiente de publicación). La genoteca se exploró utilizando
como sondas ADNc correspondiente a frutos verdes (inmaduros) y frutos rojos (maduros).

35 La secuencia completa del ADNc así obtenido se muestra en la SEQ ID. No:1, y la secuencia de su
correspondiente proteína se muestra en la SEQ ID. No: 2.

40 Para el aislamiento del promotor de la pectato liasa, se procedió a la construcción de una genoteca
de ADN genómico de fresa en fago Lambda FIX (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones de la
casa suministradora del fago. Dicha genoteca se exploró utilizando como sonda el ADNc correspondiente
a la pectato liasa de fresa.

45 Las secuencias completas promotoras y codificantes así obtenidos se indican en las SEQ ID. No: 3,
SEQ. ID. No: 4 o SEQ. ID No: 5.

Para la utilización del ADNc y promotores indicados anteriormente en la producción de fresas
transgénicas, se emplearon técnicas habituales en el campo de la Biología Molecular.

50 Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos que no pretenden
ser limitativos de su alcance.

55 Ejemplo 1

Extracción del ADN genómico de fresa.

60 El ADN genómico de fresa se extrajo como sigue: se mantuvieron hojas jóvenes en agua destilada
en la oscuridad a 4°C durante dos días. Después de ello, se trituraron 2 g de las hojas bajo nitrógeno
líquido para obtener un polvo fino, que se resuspendió suavemente en 25 ml de una solución tampón (50
mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA., 1 % β -mercapto etanol, 4 % SDS y 6 % polivinilpo-

ES 2 127 698 A1

lipirrolidona) caliente (65°C). El β -mercaptoetanol, SDS y PVP se añadieron justo antes de su uso. La mezcla se incubó en un horno rotatorio a 65°C durante 1 hora con suave rotación. Después se añadieron 8 ml de acetato potásico 3M, pH 4,8, y la mezcla resultante se incubó en hielo y después se centrifugó a 10.000 rpm en una microcentrifuga, durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró suavemente a través de una doble capa de "mira-cloth". Se añadieron dos volúmenes de etanol enfriado con hielo y se extrajo el DNA con un microcapilar, se lavó 23 veces en etanol enfriado con hielo y se secó a temperatura ambiente.

Ejemplo 2

10 *Obtención del clon genómico de la Rectato liasa de fresa.*

Una vez plaqueada la genoteca a una densidad de 50.000 pfu/placa (10 placas) esta se transfirió a filtros de nylon mediante procedimientos estándares. Los filtros se prehibridaron durante 4 h a 65°C en una solución constituida por 5 X SSC, % X Denhardt's 0,1% SDS y 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de ADN de esperma de salmón. A continuación se añadió una sonda radioactiva procedente de ADNc de la pectato liasa de fresa, generada por procedimientos estándares utilizando el "kit oligolabelling" de la casa Pharmacia, a una concentración de 10^6 cpm. ml^{-1} . Los clones positivos se aislaron y se subclonaron en plasmido pbluescript KS+ de acuerdo a procedimientos estándares y se procedió a su secuenciación en un sistema de secuenciación automático de la casa Applied Biosystems y utilizando el Kit de secuenciación AmpliTaq DNA Polymerase, PS de la casa Perkin-Elmer.

Lista de secuencias

INFORMACION GENERAL:

25 SOLICITANTE:

NOMBRE: Universidad de Córdoba

30 CALLE: Alfonso XIII, n° 13

CIUDAD: Córdoba

PROVINCIA: Córdoba

35 PAIS: España

CODIGO POSTAL: 14001

TITULO DE LA INVENCION: Moléculas de ADN y promotores y genes estructurales que codifican para la pectato liasa de fresa, y su utilización en la obtención de fresas transgénicas.

40 NUMERO DE SECUENCIAS: 5

FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

45 TIPO DE SOPORTE: disco de 3 1/4"

ORDENADOR: compatible

SISTEMA OPERATIVO: Windows 95

50 SOFTWARE: Microsoft Word para Windows 95

DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

NUMERO DE SOLICITUD: 9700657

55 FECHA DE SOLICITUD: 26 de marzo de 1.997

INFORMACION SOBRE EL REPRESENTANTE/AGENTE:

NOMBRE: Javier Ungría López

60 NUMERO DE REGISTRO: 392/1

ES 2 127 698 A1

INFORMACION SOBRE TELECOMUNICACION:

TELEFONO: 914136062

FAX: 914136417

INFORMACION DE LA SEQ ID NO:1:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 1408 nucleótidos

TIPO: secuencia de nucleótidos

NUMERO DE CADENAS: 1

TOPOLOGIA: lineal

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1

```
1  tttttttttt tgtttcttctc tttcttctctc tccttcattt ctcaaagaga aaccagatac
20 61  atatagctgt gagatatata cagagcaatg aggttagcta gctc gatagc cacaatgcac
121 ttctacatga ctcccttgct gcttcttttg gccttgctcg tttg cgtatc ggcttccgta
181 gagaatggca agcctgtaca gtcgaggttt gtggaagtag tagaggagcc aaggagctcc
25 241 ttcaactcgt caatggcaga cagggtccaac gaccactgga atgagcacgc agtagataat
301 cgggaggaga tcgcgtctct ggtcgatacg agcattcgt acagttccac tagaagagaa
361 ttgggatatt tctcatgtgc gacaggggaat cccattgatg actgctggag atgtgacccg
30 421 caatggcagc gccaccgcaa gaggccagcc aactgcbgta ttggattcgg ccgcaacgcc
481 gtcgggtggcc gtgatggaaa gtactacggt gtaagtgacc ctggtcatga tgaccggta
35 541 aacccccggc ccggaaccct ccgtcacgct gtcacccaag acaggccttt gtggattgtg
601 ttcaagcgtg acatgggtgat cacattgaag caggagctta taatgaacag cttcaagacc
661 attgacgcta gaggtgtcaa tgtccacatt gcttatggag gttgcattac tattcagttt
40 721 gttactaatg tgatcatcca tggctctacac atccacgact gcaagcctac cggaaatgcc
781 atggtccgga gctcgcgag tcattacggg tggaggacta tggctgatgg tgatggtata
841 tccatattcg gatctagcca catttggggt gatcacaact cgctctcgaa ttgcbccgat
45 901 ggctcattg atgctatcat gggttctact gccattacca tttccaacaa ctacttcact
961 caccataatg aggttatgct gttggggcat agtgactcct acacaagga caagcagatg
1021 caagtgacca ttgcttacia tcattttggt gaaggactta tccaaagaat gccaagatgt
50 1081 agacatgggt atttccatgt ggtgaacaat gactacactc actgggagat gtatgccatt
1141 ggtggaagtg ctgatcctac cattaacagt cagggaata gatatctcgc ccctaacaac
1201 cgttttgcca aagaggtgac acatagagtt cagaccactg gcagatggag gcactggaac
55 1261 tggagatcag agggagacct actcctaac ggagcctatt tctaaacaat ttgatatgtg
1321 aatgggtgta tattgaatga tttcaattgt acaaaactat gccataatat acaagttcca
1381 gaagctattc taggtaaaaa aaaaaaaaa
```

INFORMACION DE LA SEQ ID NO:2:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 127 698 A1

LONGITUD: 396 aminoácidos

TIPO: secuencia de aminoácidos

NUMERO DE CADENAS : 1

5

TOPOLOGIA: lineal

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2

10 M HFYMT PLLLL LALLV 16
CVSAS VENCK PVQSR FVEVV 36
EEPRS SFNSS MADRS NDHWN 56
EHAVD NPEEI ASLVD TSIRN 76
15 SSTRR ELGYF SCATG NPIDD 96
CWRCD PQWQR HRKRP ANCGI 116
GFGRN AVGGR DGKYY VVSDP 136
GHDDP VNPRP GTLRH AVIQD 156
RPLWI VFKRD MVITL KQELI 176
20 MNSFK TIDAR GNVNH IAYGG 196
CITIQ FVTNV IIHGL HIHDC 216
KPTGN AMVRS SPSHY GWRTM 236
ADGDG ISIFG SSHIW VDHNS 256
25 LSNCA DGLID AIMGS TAITI 276
SNNYF THHNE VMLLG HSDSY 296
TRDKQ MQVTI AYNHF GEGLI 316
QRMPR CRHGY FHVVN NDYTH 336
WEMYA IGGSA DPTIN SQGNR 356
30 YLAPN NRFAK EVTHR VQTTG 376
RWRHW NWRSE GDLLL NGAYF 396

INFORMACION DE LA SEQ ID NO:3:

35

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 900 nucleótidos

TIPO: secuencia de nucleótidos

40

NUMERO DE CADENAS : 1

TOPOLOGIA: lineal

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3

45

1 CATTTCATCA ATGGCGGCCA GGTGGGTTTT CTTTGGACCC AACCAGAGTT
51 AATTATTTTC AGTTTTGTTT TCTACTTTTG TCCACGTGGA CGGATCTCAA
50 101 CCGTCGTGTG TCTTCCTTCT CGTTTCTGAG CCGTTGGGGT TAACCGTACA
151 TGGCAATCAC AGCCGTTGAG ATCCAGATCC CTAGATCTGG GCCGTTATGT
201 TCGTTCCCTC GGATTCCACC CTTCTTCCTT TCACCGCATT TCCAAATTTA
55 251 CCCTCACCAC CGACTCTAAT TTACTCTT CACCTACTC CTCATGATGT
301 TTATCCTCGG GGGCAATTCC GTCACGGGAT TCGCACC GCC GACTAACTGC
351 CCCTAACCGT TTCTACTCGA CACTGTCTGC ACTCGCCTCT CGGGCACAGT
60 401 GTCCCCACAG TAAATCGTGT CTCCCACCTA AACGTGTCTC GCTCTGATTG

ES 2 127 698 A1

```

451  GTCCCACCCA CCCTCAACGG TTCTGGGCCC GAGAGTGAAA TGTTTTGGAC
501  TCACATGGGG TTAAAACTGT AATTACCTAA TTCATTTTTT TGTGAGATAA
5 551  TTCATTTTTA TTTTTTGGTA TGATTGAATA ttcttcaggg tgaatgagaa
601  tgatgatgga gggttgaata agcatgcagt tgagaaccag atgaatgctg
651  ccatgggtga catgttgegt tcctctcttt cctctatgGG ATAATGACAG
10 701  CTAACTTATA TATGGTCCTA CCCAATTTTA TTTCTGATTA, TGATTATATA
751  TATATATATA TATATTTATA TATATATATA TATATATATA TATATATAGG
801  AAATTACTAC CTCACTTTAC CATGAATATG ACATGAACTA TCTGTCTGCT
15 851  TGTTTGTAC TGGGGCATGA TCATGCTTGA TTATGTTTGA ACAGTTTTTTT

```

INFORMACION DE LA SEQ ID NO:4:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

```

20 LONGITUD: 2438 nucleótidos
    TIPO: secuencia de nucleótidos
    NUMERO DE CADENAS : 1
25 TOPOLOGIA: lineal

```

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4

```

30 1  CATTTCATCA ATGGCGGCCA GGTGGGTTTT CTTTTGACCC AACCAGAGTT
51  AATTATTTTC AGTTTTGTTT TCTACTTTTG TCCACGTGGA CGGATCTCAA
101 CCGTCGTGTG TCTTCCTTCT CGTTTCTGAG CCGTTGGGGT TAACCGTACA
35 151  TGGCAATCAC AGCCGTTGAG ATCCAGATCC CTAGATCTGG GCCGTTATGT
201 TCGTTCCCTC GGATTCCACC CTTCTTCCTT TCACCGCATT TCCAAATTTA
251 CCCTCACCAC CGACTCTAAT TTACACTCTT CACCTCACTC CTCATGATGT
40 301  TTATCCTCGG GGGCAATTCC GTCACGGGAT TCGCACCGCC GACTAACTGC
351 CCCTAACCGT TTCTACTCGA CACTGTCTGC ACTCGCCTCT CGGGCACAGT
401 GTCCCCACAG TAAATCGTGT CTCCCACCTA AACGTGTCTC GCTCTGATTG
45 451  GTCCCACCCA CCCTCAACGG TTCTGGGCCC GAGAGTGAAA TGTTTTGGAC
501  TCACATGGGG TTAAAACTGT AATTACCTAA TTCATTTTTT TGTGAGATAA
551  TTCATTTTTA TTTTTTGGTA TGATTGAATA ttcttcaggg tgaatgagaa
50 601  tgatgatgga gggttgaata agcatgcagt tgagaaccag atgaatgctg
651  ccatgggtga catgttgegt tcctctcttt cctctatgGG ATAATGACAG
701  CTAACTTATA TATGGTCCTA CCCAATTTTA TTTCTGATTA TGATTATATA
55 751  TATATATATA TATATTTATA TATATATATA TATATATATA TATATATAGG
801  AAATTACTAC CTCACTTTAC CATGAATATG ACATGAACTA TCTGTCTGCT
60 851  TGTTTGTAC TGGGGCATGA TCATGCTTGA TTATGTTTGA ACAGTTTTTTT

```

ES 2 127 698 A1

```

901 TTACAGTTAT GTTAATAGTA GAAACACTTT GGATATTGCA GGAGTATCCG
951 CAACAGCACT GAAAGGAGAA AGCTGGGCTA CTTCTCATGT GGAAGTGGAA
5 1001 ATCCCATTGA TGATTGCTGG CGTTGTGATC CCAACTGGCA AAAGAACGCA
1051 AGCGTCTTGC AGACTGTGGA ATTGGTTTTG GCAGAAATGC GATTGGTGGT
1101 CGTGATGGAC GCTTCTATGT TGTCACTGAT CCTAATGATG ATGATCCCGT
10 1151 TAACCCAGAG CCCGGCACTC TGCGCCATGC TGTCATCCAG GATGAGCCTC
1201 TCTGGATTGT Gttcaaacgt gacatggtga tccaattgaa gccaggagct
1251 tatcatgaat agcttcAAGA CCATTGATGG CCGTGGAGTC AATGTCCACA
15 1301 TTGCTAATGG AGCATGCATT ACAACCCAGT TTGTTACAAA TGTTATAGTT
1351 CATGGTCTGC ATATCCATGA CTGCAAGCCC ACAGGAAATG CTATGGTGGAG
1401 GAGCTCCCCA TCTCACTTTG GATGGAGGAC AATGGCTGAT GGTGATGCTA
20 1451 TCTCCATCTT CGGGTCAAGC CATATCTGGG TTGATCACAA TTCCTCTCC
1501 AATTGTGCTG ATGGTCTTGT TGATGCTGTC ATGGGGTCAA CTGCTATTAC
1551 CACCTCCAAC AACCCACTAA CCCACCACAA TGAAGTATGT CTAATGCCTC
25 1601 TTCCTGATTA ATATTTACTT CCATCTATAT TTTAGTTGTG ATACTGACAT
1651 TTTTATCTAT GCAATTGAAT CAGGTAATGC TGTGGGGCCA CAGCGATTCT
1701 TATACCAGGG ACAAGCAAAT GCAAGTGAAT ATTGCCTACA ACCACTTTGG
30 1751 AGAGGGACTT ATCCAGAGAA TGCCAAGGTA ATTTTTCAAC TAGaaccggc
1801 atatntagct tcccatgtct gatatgtcga tttcaattaa ggatggggtc
1851 tgggacataa aaacttggct tgcaaaaaaa cagcCAACCC TACTTATGAC
35 1901 ATTATTCAAT ATTGAAATCG GATTTTGCCT TGGTAGCAGA GTTGCAATTTG
1951 TTAATGCTGC CATGAACTAT GAATAATGCA GGTGCAGACA TGGATATTTT
2001 CATGTGGTGA ACAACGACTA CACTCACTGG GAAATGTATG CCATCGGTGG
40 2051 AAGTGCAGAC CCCACTATCA ACAGCCAAGG CAACAGATAT GCAGCTCCAA
2101 CCAACCCCTT TGCAAAGGAG GTATTGTCTT AATCGCTACT CACATCTACC
2151 TTTTGATTAT GACGAAGTTT ACATACTAAG TTTTCTGATT ATTGGTGAAA
45 2201 AATTGCGTTG TGAAGGTTAC CAAGAGAGTG GAGACATCGC AAAGTCAAGT
2251 GAGGGGCTGG AACTGGAGGT CAGAAGGTGA TCTTCTACTC AATGGTGCCT
50 2301 TCTTCACTCC:ATCTGGAGCT GGAGCTTCCAG CTGTCTATGC CAGGGCCTCA
2351 AGCTTGGGAG CCAAGTCATC TGCCATGGTG GGAACCATAA CTGCTAGTGC
2401 TGGTGCCTT GGATGCCGCA GAGGACGTAC CTGCTAGT

```

55 INFORMACION DE LA SEQ ID NO: 5:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2908 nucleótidos
TIPO: secuencia de nucleótidos
60 NUMERO DE CADENAS : 1
TOPOLOGIA: lineal

ES 2 127 698 A1

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

```

1      GGACCACTTT TTATCCTGGT GATTTTAACC TCGTCATGGT CAAAAGCGTG
5
   51  TCGTTTTCTG GTGAGAAACT TGGACCTGGG TTGGAATATA ACTCTGCAAT
 101  TTTCCCAGTT ACTAAAGAAA GCTTCTGTGC TCTTCTCTGG TGGAATTGAA
 151  TTCCCTCTGT CATCTGTATT CCACAATGCC CTTTATTTAT GCGTCTTTAA
10
 201  GGAAATAATT ATAGTTGTTT TCAATAGGCT TTAGTGTGTG TTAACTTTTT
 251  TGGTGAAC TAATTTGGAT TTTGGATTCG AGGAGGAAAC CATGTGTTCT
 301  TGCTCTGCAG TACCATTCTG TCTTCTTTCC TCACATGCCC ATGTCCCCAG
15
 351  ATCCGCCCCT CCCGCTTTTA TTTTTTTCAT TATTTTCCTT TATCTCTTTT
 401  CCTTTCCTTA TCCAATCCTG CATTGCCTTT TCCATCCACA TTTGCCCTCT
 451  TCACCCGTCC ATCATTCTGT AACGGCGAGT GGCAATGTCC GCACCCTAAT
20
 501  TTCAGCTTCC GCTTAGTCGA GAAAAATCAT GAAATTTTCG CATTAGAGTG
 551  CCGCGGAGTC TCGAATATTT GTCTGGTCTA GAGAAAAGAA GAGAGAGTGA
 601  GAGAGTTATA ATGAAATATC TGTTCCATGA TCACTGAGAT GATCACAAGC
25
 651  TGCATGGGGT AGTAGGGTAT AGAAGTTAAA ATGTGTTCCC CATTGCTAGC
 701  CTGTCAAGGC TCAGAAGCTC CAAATCCAAT CATAACATA TCACAGATCT
 751  GGTGCCATTT TAGTACCAGA AGCCAGAATT TTCTTAAAGA TTTAGCTTGT
30
 801  ACATCAGCTC CCCTGGTCTG ACATAAACTA CGTTGTCCAA CATGAACCCA
 851  ATAAATGACT CCATTTTCAA AGAGGTTAAA CCTCTCACCG AACTTTGAC
35
 901  ACGAGACCAG ACTACAGCAA TAAGTTCGTT CTCACCTCCA TATTTATGAT
 951  TTTTTGCTTC TTGAAAATAA ATAAAAAGAA ATCCAGAAGT TCCGTATGGA
1001  CCGTAGCCAT CCGTATCATT CCTGCAAATT TATTCACATG GGCCTCGACC
40
1051  CTA CTACTTGGGA CATGTTACAT TTGCTGCACA TGTTTCATGAG TTACAAGTTG
1101  TTAGCTCCCG AACAAAGAACA AGAACATGTT CCCACACTTG CCCAAGTTAC
1151  AGTAATCTTA ACTTCTTCGA AACTAGTGC TCAA ACTATA GCACGAACAC
45
1201  TTTACACGC TA ACTTACTT GACATTA ACT TGATTTTATT GAGACATTTT
1251  ATGGAGCATC TTAGCTTTCT TG TAGTTTGG AAAGTACTA CTTACTAATA
1301  ATA ACTTTCT CTTTCTTGTT GTTTGAAAGT AACTACTTAC TAATAATAAT
50
1351  GTTCTCTCAA TACTTTCAGG AGCATTCGTA ACAGTTCGC GAGAAGAGAA
1401  TTGGGATATT TCTCATGCGC AACAGGGAAT CCCATTGATG ACTGCTGGAG
1451  ATGTGACCCG CAATGGCAGC GCCACCGCAA GAGGCTAGCC AACTGCGGTA
55
1501  TTGGATTCGG CCGCAACGCC GTCGGTGGCC GTGATGGAAA GTACTACGTC
60

```

ES 2 127 698 A1

1551 GTAAGTGACC CCGGTCATGA TGACCCGGTG AACCCCCGGC CGGGAAACCC
 1601 TCCGTCATGC TGTTCATCAA GACAGGCCTT TGTGGATTGT GTTCAAGCGT
 5 1651 GACATGGTGA TCACATTGAA GCAGGAGCTT ATAATGAACA GCTTCAAGAC
 1701 CATTGACGCT AGAGGTGTCA ATGTCCACAT TGCTTATGGA GGTTCATTA
 1751 CTATTAGTT TGTTACTAAT GTGATCATCC ATGGTCTACA CATCCACGAC
 10 1801 TGCAAGCCTA CAGGAAATGC CATGGTCCGG AGCTCGCCGA GTCATTACGG
 1851 GTGGAGGACC ATGGCTGATG GTGATGGTAT ATCCATATTC GGATCTAGCC
 1901 ACATTTGGGT TGATCACAAC TCGCTCTCGA ATTGCGCCGA TGGCCTCATT
 15 1951 GATGCTATCA TGGGTTCTAC TGCCATTACC ATTTCCAACA ACTACTTCAC
 2001 TCACCATCCT GAGGTGTGAT TCTACACTAT CCCATACACC AATTTCTTGT
 2051 GCTTGAAAAT AATTTTGTG CCAAGGGAAA CTAAAAATTG ATGTTGGTTT
 20 2101 ATTGGAACAG GTTATGCTGT TGGGGCATAG TGACTCCTAC ACAAGGGACA
 2151 AGCAGATGCA AGTGACCATT GCTTACAATC ATTTTGGTGA AGGACTTATC
 2201 CAAAGAATGC CAAGGTAAAA TTTCTGAAGT GTTCTTTAAC CTACAAGTAA
 25 2251 CATTTGCATT CCTCACATGA CCAAATGTGC TAACCTCAAT AATTGAACTG
 2301 TGCAGATGTA GACATGGGTA TTTCCATGTG GTGAACAATG ACTACACTCA
 2351 CTGGGAGATG TATGCCATTG GTGGAAGTGC CTGATCCTAC CATCAACAGT
 30 2401 CAGGGCAACA GATATCTCGC CCCTAACAAAC CGTTTTGCTA AAGAGGTA
 2451 TACCATCTTA TTATTAGATA CATGTTATGT CATTAGATTG TTAACTAATT
 2501 TCGACTATTA TAAGAGTAGA TTTTGACAGT TGCAACTAAA TTGGTGTGTC
 35 2551 AGGTGACACA TAGAGTTCAG ACCACTGGCA GATGGAGGCA CTGGAAGTGG
 2601 AGATCAGAGG GAGACCTACT CCTTAACGGA GCCTATTTCCG TCCAATCCGG
 2651 AGCTGGTGCT GCAGCCAGTT ATGCAAGAGC TTCAAGCTTA GGGGCAAAAT
 40 2701 CATCTTCCAT GATTGGCACC ATTACTGCTG GTGCTGGTGT TCTTAACTGC
 2751 CGGTTTGGTC GTCAATGTTA ATTCTCAATC CCATGAAAGA AAAAAAATA
 45 2801 GAAAAAAAAA AATAGAAACA AGAAAAGAAG CAAGAAAATG TTAATCATT
 2851 ATTTCTTGCT TAATTGTTAG GCGCCTACT ATTATTGGTG AGTTTGCAGT
 2901 ATCAAGCT

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ADN **caracterizadas** por tener secuencias codificantes y promotoras de genes de pectato liasa de fresa, (Fragaria X, Ananassa C.V. Chandler).

5

2. Molécula de ADN, según la reivindicación 1, **caracterizada** por tener la secuencia indicada en la SEQ. ID. No: 1.

3. Molécula de ADN, según la reivindicación 1, **caracterizada** por tener la secuencia indicada en la SEQ. ID. No: 3.

10

4. Molécula de ADN, según la reivindicación 1, **caracterizada** por tener la secuencia indicada en la SEQ. ID. No: 4.

5. Molécula de ADN, según la reivindicación 1, **caracterizada** por tener la secuencia indicada en la SEQ. ID. NO: 5.N

15

6. Utilización de las moléculas de ADN de las reivindicaciones 1 a 5 anteriores, en la producción de fresas transgénicas, empleando técnicas estándar de Biología Molecular.

20

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 15/29, 15/60, 15/11, A01H 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9535388 A1 (EPITOPE, INC.) 28.12.1995, ejemplos 7-12.	1-6
A	WO 9535387 A1 (EPITOPE, INC.) 28.12.1995, página 6, línea 30 - página 12, línea 27.	1-6
A	WILKINSON J.Q. et al.: "Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display". Marzo 1995. Vol. 27, n.º 6, páginas 1097-1108.	1-6
A	NYMAN, M. et al. "Transient gene expression in strawberry (Fragaria x ananassa duch.) protoplasts and recovery of transgenic plants". 1992. Vol. 11, páginas 105-108.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

25.02.99

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1