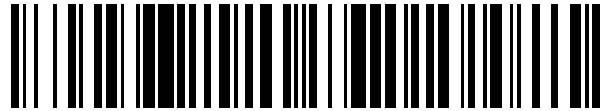


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 369**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2005 E 05854682 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 1827078**

54 Título: **Plantas transgénicas con rasgos agronómicos potenciados**

30 Prioridad:

**21.12.2004 US 638099 P**

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

**09.05.2014**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)  
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD  
ST. LOUIS, MISSOURI 63167, US**

72 Inventor/es:

**LUND, ADRIAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 459 369 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

Plantas transgénicas con rasgos agronómicos potenciados

**Campo de la invención**

5 En la presente memoria se desvelan invenciones en el campo de la genética y biología del desarrollo de las plantas. Más específicamente, las invenciones proporcionan células vegetales de maíz con ADN recombinante para proporcionar un rendimiento potenciado en una planta de maíz transgénico, plantas de maíz que comprenden tales células, semilla y polen derivados de tales plantas de maíz, procedimientos de preparación y uso de tales células, plantas, semillas y polen. En particular, el ADN recombinante expresa un factor de transcripción con dominios de caja homeótica.

**Antecedentes de la invención**

10 Se desean plantas transgénicas con rasgos agronómicos mejorados tales como rendimiento, tolerancia al estrés medioambiental, resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas, composiciones de semilla mejoradas, y similares tanto por agricultores como por consumidores. El documento US 2004/0019 927 describe plantas transgénicas con elevado rendimiento debido a la expresión en exceso de un factor de transcripción. Aunque esfuerzos considerables en el cultivo de plantas han proporcionado logros significativos en rasgos deseados, la capacidad para introducir ADN específico en  
15 genomas de planta proporciona más oportunidades para la generación de plantas con rasgos mejorados y/o únicos. La simple introducción de ADN recombinante en un genoma de planta no siempre produce una planta transgénica con un rasgo agronómico potenciado. Se requieren procedimientos para seleccionar eventos transgénicos individuales de una población para identificar aquellos eventos transgénicos que se caracterizan por el rasgo agronómico potenciado.

**Sumario de la invención**

20 La presente invención desvela ADN recombinante para la expresión de proteínas que son útiles para conferir rendimiento potenciado a plantas de maíz transgénico. El ADN recombinante se proporciona en una construcción que comprende un promotor que es funcional en células vegetales y que está operativamente ligado a ADN que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos el 90 % con respecto a la longitud completa de SEC ID N°: 5. Según el aspecto de la invención se proporcionan células vegetales de maíz transgénico que comprenden el anterior ADN recombinante, plantas transgénicas que comprenden una pluralidad de tales células vegetales, semilla  
25 transgénica de prole y polen transgénico de tales plantas. Las plantas de maíz que comprenden dichas células vegetales de maíz presentan un rendimiento potenciado con respecto a plantas de control que no tienen dicho ADN recombinante. Tales células vegetales de maíz son obtenibles seleccionando de una población de plantas transgénicas regeneradas a partir de células vegetales transformadas con ADN recombinante y que expresan la proteína seleccionando  
30 plantas transgénicas en la población para un rendimiento potenciado con respecto a plantas de control que no tienen dicho ADN recombinante.

En otro aspecto más de la invención las células vegetales, plantas, semillas y polen comprenden además ADN que expresa una proteína que proporciona tolerancia a la exposición a un herbicida aplicado a niveles que son letales para un tipo natural de dicha célula vegetal. Tal tolerancia es especialmente útil no solo como rasgo ventajoso en tales plantas,  
35 sino que también es útil en una etapa de selección en los procedimientos de la invención. En aspectos de la invención el agente de tal herbicida es un compuesto de glifosato, dicamba o glufosinato.

Otros aspectos adicionales de la invención proporcionan plantas transgénicas que son homocigóticas para el ADN recombinante y semilla transgénica de la invención de plantas de maíz. En otras realizaciones importantes para la práctica de diversos aspectos de la invención en Argentina el ADN recombinante se proporciona en células vegetales derivadas de líneas de maíz que son y mantienen la resistencia al virus del Mal de Río Cuarto o el hongo *Puccinia sorghi* o  
40 ambos.

La presente invención también proporciona procedimientos para fabricar semilla transgénica no natural que puede usarse para producir un cultivo de plantas de maíz transgénico con un rasgo potenciado resultante de la expresión de ADN recombinante establemente integrado, para expresar una proteína que tiene SEC ID N°: 5. Más específicamente, el procedimiento comprende (a) seleccionar una población de plantas para un rendimiento potenciado y un ADN  
45 recombinante, en el que plantas individuales en la población pueden presentar el rendimiento a un nivel inferior a, esencialmente el mismo que o superior al nivel al que el rasgo se presenta en plantas de control que no expresan el ADN recombinante, (b) seleccionar de la población una o más plantas que presentan el rasgo a un nivel superior al nivel al que se presenta dicho rasgo en plantas de control, (c) verificar que el ADN recombinante está establemente integrado en dichas plantas seleccionadas, (d) analizar tejido de una planta seleccionada para determinar la producción de una proteína que tiene la función de una proteína codificada por nucleótidos en una secuencia de SEC ID N°: 1; y (e) recoger semilla de una planta seleccionada. En un aspecto de la invención, las plantas en la población comprenden además ADN que expresa una proteína que proporciona tolerancia a la exposición a un herbicida aplicado a niveles que son letales para  
50 células vegetales naturales y la selección se efectúa tratando la población con el herbicida, por ejemplo, un compuesto de

glifosato, dicamba o glufosinato. En otro aspecto de la invención las plantas se seleccionan identificando plantas con el rasgo potenciado. Los procedimientos son especialmente útiles para fabricar semilla de maíz. En otro aspecto, las plantas comprenden además un ADN que expresa una segunda proteína que proporciona células vegetales con uno o más rasgos agronómicos potenciados.

5 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento de producción de semilla de maíz híbrido que comprende adquirir semilla de maíz híbrido de una planta de maíz tolerante a herbicida que también tiene ADN recombinante establemente integrado que comprende un promotor que es (a) funcional en células vegetales y (b) está operativamente  
10 ligado a ADN que codifica una proteína que tiene SEC ID N°: 5; en el que una planta transgénica de progenie regenerada a partir de una copia de dicha célula presenta un rendimiento potenciado con respecto a una planta de control sin dicha construcción de ADN; y en el que dicha célula está seleccionada de una población de células transformada con dicha construcción de ADN seleccionando plantas de progenie de células en dicha población para un rendimiento potenciado con respecto a dicha planta de control. Los procedimientos comprenden además producir plantas de maíz a partir de dicha semilla de maíz híbrido, en los que una fracción de las plantas producidas a partir de dicha semilla de maíz híbrido es homocigótica para dicho ADN recombinante, una fracción de las plantas producidas a partir de dicha semilla de maíz  
15 híbrido es hemicigótica para dicho ADN recombinante, y una fracción de las plantas producidas a partir de dicha semilla de maíz híbrido no tiene ninguno de dicho ADN recombinante; seleccionar plantas de maíz que son homocigóticas y hemicigóticas para dicho ADN recombinante tratando con un herbicida; recoger semilla de plantas de maíz supervivientes tratadas con herbicida y sembrar dicha semilla para producir adicionalmente plantas de progenie de maíz; repetir las etapas de selección y recogida al menos una vez para producir una línea endógama de maíz; y cruzar la línea endógama de maíz con una segunda línea de maíz para producir semilla híbrida.

Adicionalmente se desvela un procedimiento de selección de una planta que comprende células vegetales de maíz de la invención usando un anticuerpo inmunorreactivo para detectar la presencia de proteína expresada por ADN recombinante en tejido de semilla o planta.

#### Descripción detallada de la invención

25 Como se usa en la presente memoria, una “célula vegetal” significa una célula vegetal que se transforma con ADN recombinante no natural establemente integrado, por ejemplo, por transformación mediada por *Agrobacterium* o por bombardeo usando micropartículas recubiertas con ADN recombinante u otros medios. Una célula vegetal de la presente invención puede ser una célula vegetal originalmente transformada que existe como microorganismo o como célula de progenie de planta que se regenera en tejido diferenciado, por ejemplo, en una planta transgénica con ADN recombinante  
30 no natural establemente integrado, o semilla o polen derivado de una planta transgénica de progenie.

Como se usa en la presente memoria, una “planta transgénica” significa una planta cuyo genoma ha sido alterado por la integración estable de ADN recombinante. Una planta transgénica incluye una planta regenerada a partir de una célula vegetal originalmente transformada y plantas transgénicas de progenie de generaciones posteriores o cruces de una planta transformada.

35 Como se usa en la presente memoria, “ADN recombinante” significa ADN que se ha manipulado genéticamente y construido fuera de una célula que incluye ADN que contiene ADN o ADNc que se producen naturalmente o ADN sintético.

40 Como se usa en la presente memoria, la “secuencia consenso” significa una secuencia artificial de aminoácidos en una región conservada de un alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas, por ejemplo, como se ha determinado por un alineamiento CLUSTALW de secuencia de aminoácidos de proteínas homólogas.

Como se usa en la presente memoria, “homólogo” significa una proteína en un grupo de proteínas que realizan la misma función biológica, por ejemplo, proteínas que pertenecen a la misma familia de proteínas Pfam y que proporcionan un rasgo común potenciado en plantas transgénicas de la presente invención. Los homólogos se expresan por genes homólogos. Los genes homólogos incluyen alelos que se producen naturalmente y variantes artificialmente creadas. La degeneración del código genético proporciona la posibilidad de sustituir al menos una base de la secuencia codificante de proteínas de un gen con una base diferente sin causar el cambio de la secuencia de aminoácidos del polipéptido producido a partir del gen. Por tanto, un polinucleótido útil en la presente invención puede tener cualquier secuencia de bases que se haya cambiado de la SEC ID N°: 1 por sustitución según degeneración del código genético. Los homólogos son proteínas que, cuando se alinean óptimamente, tienen al menos el 90 % de identidad con respecto a la longitud completa de una proteína identificada como que está asociada con conferir un rasgo potenciado cuando se expresa en células vegetales.  
50

Los homólogos van a identificarse por comparación de secuencia de aminoácidos, por ejemplo, manualmente o por el uso de una herramienta basada en ordenador usando algoritmos de búsqueda basados en homología conocidos tales como aquellos comúnmente conocidos y denominados BLAST, FASTA y Smith-Waterman. Un programa de alineamiento de secuencias local, por ejemplo, BLAST, puede usarse para buscar en una base de datos de secuencias para encontrar  
55

secuencias similares, y el valor de esperanza (valor E) resumen usado para medir la similitud de bases de secuencia. Como un éxito de proteína con el mejor valor de E para un organismo particular puede no ser necesariamente un ortólogo o el único ortólogo, en la presente invención se usa una búsqueda recíproca para filtrar secuencias de éxito con valores de E significativos para la identificación de ortólogos. La búsqueda recíproca implica la búsqueda de éxitos significativos

5 contra una base de datos de secuencias de aminoácidos del organismo base que son similares a la secuencia de la proteína de búsqueda. Un éxito es un ortólogo probable, cuando el mejor éxito de búsqueda recíproco es la propia proteína de búsqueda o una proteína codificada por un gen duplicado después de la especiación. Otro aspecto comprende proteínas homólogas funcionales que se diferencian en uno o más aminoácidos de aquellos de una proteína desvelada como resultado de sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, las sustituciones son entre:

10 aminoácidos ácidos (negativamente cargados) tales como ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos básicos (positivamente cargados) tales como arginina, histidina y lisina; aminoácidos polares neutros tales como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; aminoácidos no polares neutros (hidrófobos) tales como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas

15 tales como serina y treonina; aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina; aminoácidos naturalmente conservativos tales como valina-leucina, valina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutámico y asparagina-glutamina. Otro aspecto de los homólogos codificados por ADN útil en las plantas transgénicas de la invención son aquellas proteínas que se diferencian de una proteína desvelada como resultado de delección o inserción de uno o más aminoácidos en una secuencia nativa.

Como se usa en la presente memoria, "identidad en porcentaje" significa el grado al que dos segmentos de ADN o proteína óptimamente alineados son invariantes por toda una ventana de alineamiento de componentes, por ejemplo,

25 secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos. Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos que son compartidos por secuencias de los dos segmentos alineados dividido entre el número total de componentes de secuencia en el segmento de referencia durante una ventana de alineamiento que es la más pequeña de la secuencia de prueba completa o la secuencia de referencia completa. "Porcentaje de identidad" ("% de identidad") es las veces de la fracción de identidad.

Como se usa en la presente memoria "Pfam" se refiere a una gran colección de alineamientos múltiples de secuencias y modelos ocultos de Markov que cubren muchas familias de proteínas comunes, por ejemplo, la versión de Pfam 18.0 (agosto de 2005) contiene alineamientos y modelos para 7973 familias de proteínas y se basa en las bases de datos de secuencias de proteínas Swissprot 47.0 y SP-TrEMBL 30.0. Véase S.R. Eddy, "Profile Hidden Markov Models", Bioinformatics 14:755-763, 1998. Pfam es actualmente mantenida y actualizada por un consorcio de Pfam. Los

30 alineamientos representan alguna estructura evolutiva conservada que tiene implicaciones para la función de las proteínas, los perfiles de modelos ocultos de Markov (perfiles de HMM) construidos a partir de los alineamientos de Pfam son útiles para reconocer automáticamente que una nueva proteína pertenece a una familia de proteínas existente, aunque la homología por alineamiento parezca ser baja. Una vez se identifica un ADN como que codifica una proteína que confiere un rasgo potenciado cuando se expresa en plantas transgénicas, otras proteínas que codifican ADN en la misma familia de proteínas se identifican buscando la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por ADN candidato contra el modelo oculto de Markov que caracteriza el dominio de Pfam usando el software HMMER, una versión actual del cual se proporciona en el listado informático adjunto. Las proteínas candidatas que cumplen el corte de reunión para el alineamiento de un Pfam particular están en la familia de proteínas y tienen ADN similar que es útil en construir ADN recombinante para el uso en las células vegetales de la presente invención. Las bases de datos de los modelos

35 ocultos de Markov para su uso con el software HMMER en identificar ADN que expresa proteína en un Pfam común para ADN recombinante en las células vegetales de la presente invención también están incluidas en el listado informático adjunto. El software HMMER y las bases de datos de Pfam son la versión 18.0 y se usaron para determinar que la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5 se caracteriza por dos dominios de Pfam, es decir, dominio de caja homeótica y el dominio HALZ. Se identificó que el dominio de caja homeótica comprendía residuos de aminoácidos entre las posiciones 130 y 193 con una puntuación de 70,1 que superaba el corte de reunión de -4. Se identificó que el dominio HALZ comprendía residuos de aminoácidos entre las posiciones 194 y 238 con una puntuación de 71,9 que superaba el

40 corte de reunión de 17.

Al software HMMER y a las bases de datos para identificar los dominios de caja homeótica y HALZ se accede desde cualquier sitio web de Pfam y pueden proporcionarse por el solicitante, por ejemplo, en un listado informático adjunto.

Como se usa en la presente memoria, "promotor" significa ADN regulador para iniciar la transcripción. Un "promotor de planta" es un promotor que puede iniciar la transcripción en células vegetales tanto si su origen es, como si no, una célula vegetal, por ejemplo, es muy conocido que los promotores de *Agrobacterium* sean funcionales en células vegetales. Así, promotores de planta incluyen ADN promotor obtenido de plantas, virus de planta y bacterias tales como bacterias

55

*Agrobacterium* y *Bradyrhizobium*. Ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que inician preferencialmente la transcripción en ciertos tejidos tales como hojas, raíces o semillas. Tales promotores se denominan “preferidos para tejido”. Los promotores que inician la transcripción solo en ciertos tejidos se denominan “específicos para tejido”. Un promotor específico para “tipo de célula” acciona principalmente la expresión en ciertos tipos de células en uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares en raíces u hojas. Un promotor “inducible” o “represible” es un promotor que está bajo el control medioambiental. Ejemplos de condiciones medioambientales que pueden efectuar la transcripción por promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias, o ciertos productos químicos o la presencia de luz. Los promotores específicos para tejido, preferidos para tejido, específicos para tipo de célula e inducibles constituyen la clase de promotores “no constitutivos”. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones.

Como se usa en la presente memoria, “operativamente ligado” significa la asociación de dos o más fragmentos de ADN en una construcción de ADN de manera que la función del uno, por ejemplo, ADN que codifica proteína, está controlada por el otro, por ejemplo, un promotor.

Como se usa en la presente memoria, “expresado” significa producido, por ejemplo, una proteína se expresa en una célula vegetal cuando su ADN similar se transcribe en ARNm que se traduce en la proteína.

Como se usa en la presente memoria, una “planta de control” es una planta que no contiene el ADN recombinante que expresó una proteína que confiere un rasgo potenciado. Una planta de control es para identificar y seleccionar una planta transgénica que tiene un rasgo potenciado. Una planta de control adecuada puede ser una planta no transgénica de la línea parental usada para generar una planta transgénica, es decir, que carece de ADN recombinante. Una planta de control adecuada puede en algunos casos ser una progenie de una línea de planta transgénica hemicingótica que no contiene el ADN recombinante, conocida como segregante negativo.

Como se usa en la presente memoria, un “rendimiento potenciado” incluye elevado rendimiento bajo condiciones de no estrés y elevado rendimiento bajo condiciones de estrés medioambiental. Las condiciones de estrés pueden incluir, por ejemplo, sequía, sombra, enfermedad fúngica, enfermedad viral, enfermedad bacteriana, infestación por insectos, infestación por nematodos, exposición a temperaturas bajas, exposición al calor, estrés osmótico, disponibilidad reducida de nutrientes de nitrógeno, disponibilidad reducida de nutrientes de fósforo y alta densidad de plantas. El “rendimiento” puede afectarse por muchas propiedades que incluyen, sin limitación, altura de la planta, número de vainas, posición de las vainas en la planta, número de entrenudos, incidencia de rotura de vainas, tamaño de grano, eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno, eficiencia de la asimilación de nutrientes, resistencia a estrés biótico y abiótico, asimilación de carbono, arquitectura de la planta, resistencia al encamado, porcentaje de germinación de semillas, vigor de los plantones y rasgos juveniles. El rendimiento también puede afectarse por la eficiencia de germinación (incluyendo germinación en condiciones de estrés), velocidad de crecimiento (incluyendo velocidad de crecimiento en condiciones de estrés), número de espigas, número de semillas por espiga, tamaño de la semilla, composición de la semilla (almidón, aceite, proteína) y características del relleno de la semilla.

El aumento del rendimiento de una planta transgénica de la presente invención puede medirse de varias formas, que incluyen peso de prueba, número de semillas por planta, peso de la semilla, número de semillas por unidad de área (es decir, semillas, o peso de semillas, por acre), fanegas por acre (fan/ac), toneladas por acre, toneladas por acre, kilogramos por hectárea. Por ejemplo, el rendimiento del maíz puede medirse como la producción de granos de maíz envainado por unidad de área de producción, por ejemplo, en fanegas por acre o toneladas métricas por hectárea, frecuentemente informadas en una base ajustada a la humedad, por ejemplo, al 15,5 por ciento de humedad. El aumento del rendimiento puede resultar de la utilización mejorada de compuestos bioquímicos clave tales como nitrógeno, fósforo e hidrato de carbono, o de respuestas mejoradas a estreses medioambientales tales como frío, calor, sequía, sal y ataque por plagas o patógenos. El ADN recombinante usado en esta invención también puede usarse para proporcionar plantas que tienen crecimiento y desarrollo mejorados y, por último lugar, aumento del rendimiento, como resultado de la expresión modificada de reguladores del crecimiento de las plantas o modificación del ciclo celular o rutas de fotosíntesis. También es de interés la generación de plantas transgénicas que demuestran rendimiento potenciado con respecto a un componente de semilla que puede o puede no corresponderse con un aumento en el rendimiento global de la planta. Tales propiedades incluyen potenciamientos en el aceite de la semilla, moléculas de semilla tales como tocoferol, proteína y almidón, o aceite, componentes de aceite particulares que pueden manifestarse por una alteración en las relaciones de componentes de semilla.

Un subconjunto de las moléculas nucleicas incluye fragmentos del ADN recombinante desvelado que consisten en oligonucleótidos de al menos 15, preferentemente al menos 16 ó 17, más preferentemente al menos 18 ó 19, e incluso más preferentemente al menos 20 o más, nucleótidos consecutivos. Tales oligonucleótidos son fragmentos de las moléculas más grandes que tienen una secuencia de SEC ID N°: 1 y se usan, por ejemplo, como sondas y cebadores para la detección de los polinucleótidos descritos en la presente memoria.

Las construcciones de ADN se ensamblan usando procedimientos muy conocidos para expertos habituales en la materia

y normalmente comprenden un promotor operativamente ligado a ADN, cuya expresión proporciona el rasgo agronómico potenciado. Otros componentes de construcción pueden incluir elementos reguladores adicionales tales como conductores e intrones de 5' para potenciar la transcripción, regiones sin traducir de 3' (tales como señales y sitios de poliadenilación), ADN para péptidos de tránsito o señal.

5 En la bibliografía se han descrito numerosos promotores que son activos en células vegetales. Éstos incluyen promotores presentes en genomas de la planta, además de promotores de otras fuentes, que incluyen promotor de nopalina sintasa (NOS) y promotores de octopina sintasa (OCS) llevados sobre plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*, promotores de caulimovirus tales como promotores del virus del mosaico de la coliflor. Por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. n° 5.858.742 y 5.322.938 que desvelan versiones del promotor constitutivo derivado del virus del  
10 mosaico de la coliflor (CaMV35S), patente de EE.UU. 5.641.876 que desvela un promotor de actina de arroz, documento US 2002/0192813A1 que desvela elementos de 5', 3' y de intrón útiles en el diseño de vectores de expresión de plantas eficaces, documento U.S. 2004/0216189 que desvela un promotor de aldolasa de cloroplastos del maíz, documento U.S. 2004/0216189 que desvela un promotor de aldolasa de maíz (FDA) y el documento U.S. 2003/0131377 que desvela un promotor de nicotianamina sintasa del maíz. Estos y numerosos otros promotores que funcionan en células vegetales son  
15 conocidos para aquellos expertos en la materia y están disponibles para su uso en polinucleótidos recombinantes de la presente invención para proporcionar la expresión de genes deseados en células vegetales transgénicas.

En otros aspectos de la invención se desea la expresión preferencial en tejidos verdes de planta. Promotores de interés para tales usos incluyen aquellos de genes tales como la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco) de *Arabidopsis thaliana* (Fischhoff y col. (1992) Plant Mol Biol. 20:81-93), aldolasa y piruvato ortofosfato  
20 dicinasa (PPDK) (Taniguchi y col. (2000) Plant Cell Physiol. 41(1):42-48).

Además, los promotores pueden alterarse para contener múltiples "secuencias potenciadoras" para ayudar en la elevación de la expresión génica. Tales potenciadores se conocen en la técnica. Incluyendo una secuencia potenciadora con tales construcciones, la expresión de la proteína seleccionada puede potenciarse. Estos potenciadores frecuentemente se encuentran 5' con respecto al inicio de la transcripción en un promotor que funciona en células eucariotas, pero pueden  
25 frecuentemente insertarse aguas arriba (5') o aguas abajo (3') con respecto a la secuencia codificante. En algunos casos, estos elementos potenciadores de 5' son intrones. Particularmente útiles como potenciadores son los intrones de 5' de la actina 1 de arroz (véase la patente de EE.UU. 5.641.876) y los genes de actina 2 de arroz, el intrón del gen de alcohol deshidrogenasa de maíz, el intrón del gen de la proteína de choque térmico 70 del maíz (patente de EE.UU. 5.593.874) y el gen reducido 1 de maíz.

30 En otros aspectos de la invención se desea expresión suficiente en tejidos de semilla de planta para efectuar mejoras en la composición de la semilla. Promotores a modo de ejemplo para su uso para la modificación de la composición de la semilla incluyen promotores de genes de la semilla tales como napina (documento U.S. 5.420.034), oleosina L3 de maíz (documento U.S. 6.433.252), zeína Z27 (Russell y col. (1997) Transgenic Res. 6(2):157-166), globulina 1 (Belanger y col. (1991) Genetics 129:863-872), glutelina 1 (Russell (1997) arriba) y antioxidante de peroxirredoxina (Per1) (Stacy y col. (1996) Plant Mol Biol. 31(6):1205-1216). Las construcciones de ADN recombinante preparadas según la invención también incluirán generalmente un elemento de 3' que normalmente contiene una señal y sitio de poliadenilación. Elementos de 3' muy conocidos incluyen aquellos de genes de *Agrobacterium tumefaciens* tales como *nos 3'*, *tml 3'*, *tmr 3'*, *tms 3'*, *ocs 3'*, *tr7 3'*, por ejemplo, desvelados en el documento U.S. 6.090.627; elementos de 3' de genes de planta tales como la proteína 17 de choque térmico (*Hsp17 3'*) de trigo (*Triticum aestivum*), un gen de ubiquitina de trigo, un gen de fructosa-1,6-bisfosfatasa de trigo, un gen de glutelina de arroz, un gen de lactato deshidrogenasa de arroz y un gen de beta-tubulina de arroz, todos los cuales se desvelan en el documento U.S. 2002/0192813; y el gen de ribulosa bifosfato carboxilasa (*rbs 3'*) de guisante (*Pisum sativum*), y elementos de 3' de los genes dentro de la planta huésped.

Las construcciones y los vectores también pueden incluir un péptido de tránsito para elegir como diana un gen diana para un orgánulo de la planta, particularmente para un cloroplasto, leucoplasto u otro orgánulo plástido. Para descripciones del uso de péptidos de tránsito de cloroplastos véanse las patentes de EE.UU. 5.188.642 y 5.728.925. Para la descripción de la región del péptido de tránsito de un gen EPSPS de *Arabidopsis* útil en la presente invención véase Klee, H.J. y col. (MGG (1987) 210:437-442).

Las plantas transgénicas que comprenden o se derivan de células vegetales de la presente invención transformadas con ADN recombinante pueden potenciarse adicionalmente con rasgos apilados, por ejemplo, una planta de cultivo que tiene un rasgo potenciado resultante de la expresión de ADN desvelado en la presente memoria en combinación con rasgos de resistencia a herbicidas y/o a plagas. Por ejemplo, los genes descritos en la presente invención pueden apilarse con otros rasgos de interés agronómico, tales como un rasgo que proporciona resistencia a herbicidas, o resistencia a insectos, tal como usando un gen de *Bacillus thuringiensis* que proporciona resistencia contra lepidópteros, coleópteros, homópteros, hemiópteros y otros insectos. Los herbicidas para los que se ha demostrado tolerancia a plantas transgénicas y el procedimiento de la presente invención pueden aplicarse incluyen los herbicidas glifosato, dicamba, glufosinato, sulfonilurea, bromoxinilo y norflurazon. Las moléculas de polinucleótidos que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas son muy conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, una molécula de polinucleótido

que codifica 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfat sintasa (EPSPS) desvelada en las patentes de EE.UU. 5.094.945; 5.627.061; 5.633.435 y 6.040.497 para conferir tolerancia a glifosato; moléculas de polinucleótidos que codifican una glifosato oxidoreductasa (GOX) desvelada en la patente de EE.UU. 5.463.175 y una glifosato-N-acetiltransferasa (GAT) desvelada en el documento U.S. 2003/0083480 también para conferir tolerancia a glifosato; dicamba monooxigenasa desvelada en el documento U.S. 2003/0135879 para conferir tolerancia a dicamba; una molécula de polinucleótido que codifica bromoxinil nitrilasa (*Bxn*) desvelada en la patente de EE.UU. 4.810.648 para conferir tolerancia a bromoxinilo; una molécula de polinucleótido que codifica fitoeno desaturasa (*crf*) descrita en Misawa y col., (1993) Plant J. 4:833-840 y Misawa y col., (1994) Plant J. 6:481-489 para tolerancia a norflurazon; una molécula de polinucleótido que codifica acetohidroxiácido sintasa (AHAS, aka ALS) descrita en Sathasivan y col. (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188-2193 para conferir tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; moléculas de polinucleótidos conocidas como genes *bar* desvelados en DeBlock, y col. (1987) EMBO J. 6:2513-2519 para conferir tolerancia a glufosinato y bialafos; moléculas de polinucleótidos desveladas en el documento U.S. 2003/010609 para conferir tolerancia a ácido N-aminometilfosfónico; moléculas de polinucleótidos desveladas en la patente de EE.UU. 6.107.549 para conferir resistencia a herbicidas de piridina; moléculas y procedimientos para conferir tolerancia a múltiples herbicidas tales como glifosato, atrazina, inhibidores de ALS, isoxofluto y herbicidas de glufosinato se desvelan en la patente de EE.UU. 6.376.754 y el documento U.S. 2002/0112260. Moléculas y procedimientos para conferir resistencia a insectos/nematodos/virus se desvelan en las patentes de EE.UU. 5.250.515; 5.880.275; 6.506.599; 5.986.175 y el documento U.S. 2003/0150017. En realizaciones particulares, los inventores contemplan el uso de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que se unen a las proteínas desveladas en la presente memoria. Medios para preparar y caracterizar anticuerpos son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los procedimientos para generar anticuerpos monoclonales (mAb) generalmente empiezan a lo largo de las mismas líneas que aquellos para preparar anticuerpos policlonales. Brevemente, un anticuerpo policlonal se prepara inmunizando un animal con una composición inmunogénica y recogiendo antiseros de ese animal inmunizado. Puede usarse una amplia variedad de especies animales para la producción de antiseros. Normalmente, el animal usado para la producción de antiseros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. Debido al volumen de sangre relativamente grande de los conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

Como es bien conocido en la técnica, una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Por tanto, frecuentemente es necesario reforzar el sistema inmunitario del huésped, como puede lograrse acoplando un inmunogén de péptido o polipéptido a un vehículo. Vehículos a modo de ejemplo y preferidos son hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). También pueden usarse otras albúminas tales como albúmina de huevo, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo como vehículos. Medios para conjugar un polipéptido con una proteína transportadora son muy conocidos en la técnica e incluyen usar glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Como también es bien conocido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición de inmunogén particular puede potenciarse por el uso de estimulantes no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Adyuvantes a modo de ejemplo y preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulante no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta), adyuvante incompleto de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de composición de inmunogén usada en la producción de anticuerpos policlonales varía con la naturaleza del inmunogén, además del animal usado para la inmunización. Puede usarse una variedad de vías para administrar el inmunogén (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales puede monitorizarse muestreando sangre del animal inmunizado en diversos puntos tras la inmunización. También puede administrarse una segunda inyección de refuerzo. El procedimiento de refuerzo y titulación se repite hasta que se logra un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel de inmunogenicidad deseado, el animal inmunizado puede sangrarse y el suero aislarse y guardarse, y/o el animal puede usarse para generar mAb.

Los mAb pueden prepararse fácilmente mediante el uso de técnicas muy conocidas, tales como aquellas ejemplificadas en la patente de EE.UU. n° 4.196.265. Normalmente, esta técnica implica inmunizar un animal adecuado con una composición de inmunogén seleccionada, por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido antifúngico purificado o parcialmente purificado. La composición inmunizante se administra de un modo eficaz para estimular las células productoras de anticuerpos. Los roedores tales como ratones y ratas son animales preferidos, sin embargo, el uso de células de conejo, oveja o rana también es posible. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, 1986, pág. 60-61), pero se prefieren ratones, siendo el ratón BALB/c el más preferido ya que éste es el más rutinariamente usado y generalmente da un mayor porcentaje de fusiones estables.

Tras la inmunización, las células somáticas con posibilidad de producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo de generación de mAb. Estas células pueden obtenerse a partir de bazo de biopsia, amígdalas o ganglios linfáticos, o a partir de una muestra de sangre periférica. Se prefieren células del bazo y glóbulos sanguíneos periféricos, siendo las primeras debido a que son una fuente rica en células productoras de anticuerpos que están en la etapa de división de plasmablastos, y las últimas debido a que la sangre periférica está

fácilmente accesible. Frecuentemente se habrá inmunizado un panel de animales y el bazo de animal con el mayor título de anticuerpos se extraerá y los linfocitos del bazo se obtendrán homogeneizando el bazo con una jeringuilla. Normalmente, un bazo de un ratón inmunizado contiene  $5 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  linfocitos.

5 Entonces, los linfocitos B productores de anticuerpos del animal inmunizado se fusionan con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente una de las mismas especies del animal que se inmunizó. Las líneas de células de mieloma aptas para uso en procedimientos de fusión productores de hibridomas son preferentemente no productoras de anticuerpos, tienen alta eficiencia de fusión, y deficiencias de enzimas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solo las células fusionadas deseadas (hibridomas).

10 Puede usarse una cualquiera de varias células de mieloma, como son conocidas para aquellos expertos en la materia (Goding, 1986, pág. 65-66; Campbell, 1984, pág. 75-83). Por ejemplo, si el animal inmunizado es un ratón puede usarse P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas puede usarse R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 son todas útiles a propósito de fusiones de células humanas.

15 Una célula de mieloma murina preferida es la línea NS-1 de células de mieloma (también llamada P3-NS-1-Ag4-1), que está fácilmente disponible del Depósito de Células Mutantes Humanas del NIGMS solicitando el número de depósito de la línea celular GM3573. Otra línea de células de mieloma de ratón que puede usarse es la línea celular no productora de mieloma murino de ratón resistente a 8-azaguanina SP2/0. Los procedimientos para generar híbridos de bazo productor de anticuerpos o células linfáticas del ganglio y células de mieloma normalmente comprenden mezclar células somáticas con células de mieloma en una relación 2:1, aunque la relación puede variar de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que promueven la fusión de membranas celulares. Se han descrito procedimientos de fusión usando el virus de Sendai (Kohler y Milstein, 1975; 1976), y aquellos usando polietilenglicol (PEG), tales como 37 % (v/v) de PEG (Geffer y col., 1977). También es apropiado el uso de procedimientos de fusión eléctricamente inducidos (Goding, 1986, pág. 71-74).

25 Los procedimientos de fusión normalmente producen híbridos viables a bajas frecuencias, a  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-8}$ . Sin embargo, esto no plantea un problema, ya que los híbridos fusionados viables se diferencian de las células sin fusionar parentales (particularmente las células de mieloma sin fusionar que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) cultivando en un medio selectivo. El medio selectivo es generalmente uno que contiene un agente que bloquea la síntesis de novo de nucleótidos en los medios de cultivo de tejido. Agentes a modo de ejemplo y preferidos son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis de novo de tanto purinas como pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea solo la síntesis de purinas. Si se usa aminopterina o metotrexato, el medio se complementa con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Si se usa azaserina, el medio se complementa con hipoxantina.

35 El medio de selección preferido es HAT. Solo células que pueden operar en rutas de rescate de nucleótidos pueden sobrevivir en medio HAT. Las células de mieloma son defectuosas en enzimas clave de la ruta de rescate, por ejemplo, hipoxantina fosforibosil transferasa (HPR1), y no pueden sobrevivir. Los linfocitos B pueden operar esta ruta, pero tienen una duración limitada en cultivo y generalmente mueren en el plazo de aproximadamente dos semanas. Por tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en los medios selectivos son aquellos híbridos formados a partir de mieloma y linfocitos B.

40 Este cultivo proporciona una población de hibridomas de la que se seleccionan hibridomas específicos. Normalmente, la selección de hibridomas se realiza cultivando las células por dilución de un único clon en placas de microtitulación, seguido de prueba de los sobrenadantes clónicos individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad deseada. El ensayo debe ser sensible, simple y rápido, tal como radioinmunoensayos, enzimoimmunoensayos, ensayos de citotoxicidad, ensayos en placa y ensayos de inmununión por puntos.

45 Los hibridomas seleccionados se diluirían entonces en serie y se clonarían en líneas celulares productoras de anticuerpos individuales, cuyos clones pueden luego propagarse indefinidamente para proporcionar mAb. Las líneas celulares pueden explotarse para la producción de mAb de dos formas básicas. Una muestra del hibridoma puede inyectarse (frecuentemente en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se usó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido de células fusionadas. Los fluidos corporales del animal, tales como suero o líquido ascítico, pueden entonces emplearse para proporcionar mAb en alta concentración. Las líneas celulares individuales podrían también cultivarse *in vitro*, si los mAb se secretan naturalmente en el medio de cultivo a partir del cual pueden obtenerse fácilmente en altas concentraciones. Los mAb producidos por cualquier medio pueden purificarse adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos procedimientos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

55 **Procedimientos de transformación de células vegetales**



En la técnica se conocen numerosos procedimientos para transformar células vegetales con ADN recombinante y pueden usarse en la presente invención. Dos procedimientos comúnmente usados para la transformación de plantas son transformación mediada por *Agrobacterium* y bombardeo con microproyectiles. Los procedimientos de bombardeo con microproyectiles se ilustran en las patentes de EE.UU. 5.015.580 (soja); 5.550.318 (maíz); 5.538.880 (maíz); 5.914.451 (soja); 6.160.208 (maíz); 6.399.861 (maíz) y 6.153.812 (trigo) y la transformación mediada por *Agrobacterium* se describe en las patentes de EE.UU. 5.159.135 (algodón); 5.824.877 (soja); 5.591.616 (maíz); y 6.384.301 (soja). Para el sistema de transformación de plantas basado en *Agrobacterium tumefaciens*, elementos adicionales presentes en las construcciones de transformación incluirán secuencias de la frontera izquierda y derecha del T-ADN para facilitar la incorporación del polinucleótido recombinante en el genoma de la planta.

En general es útil introducir ADN recombinante al azar, es decir, en una localización no específica, en el genoma de una línea de planta diana. En casos especiales puede ser útil elegir como diana la inserción de ADN recombinante con el fin de lograr la integración específica para sitio, por ejemplo, para sustituir un gen existente en el genoma, para usar un promotor existente en el genoma de la planta o para insertar un polinucleótido recombinante en un sitio predeterminado conocido por ser activo para la expresión génica. Existen varios sistemas de recombinación específicos para sitio que son conocidos por funcionar en plantas incluyendo cre-lox como se desvela en la patente de EE.UU. 4.959.317 y FLP-FRT como se desvela en la patente de EE.UU. 5.527.695. Los procedimientos de transformación se ponen preferentemente en práctica en cultivo de tejido en medios y en un entorno controlado. "Medios" se refiere a las numerosas mezclas nutritivas que se usan para cultivar células *in vitro*, es decir, fuera del organismo vivo intacto. Dianas de células receptoras incluyen, pero no se limitan a, células de meristemo, callo, embriones inmaduros y células gaméticas tales como microesporas, polen, esperma y óvulos. Se contempla que cualquier célula a partir de la cual pueda regenerarse una planta fértil es útil como célula receptora. El callo puede iniciarse a partir de fuentes de tejido que incluyen, pero no se limitan a, embriones inmaduros, meristemos apicales de plántones, microesporas y similares. Células que pueden proliferar como callo también son células receptoras para transformación genética. Los procedimientos de transformación y los materiales prácticos para producir plantas transgénicas de la presente invención, por ejemplo, diversos medios y células receptoras diana, transformación de embriones inmaduros y posterior regeneración de plantas transgénicas fértiles, se desvelan en las patentes de EE.UU. 6.194.636 y 6.232.526.

Las semillas de plantas transgénicas pueden recogerse de plantas transgénicas fértiles y usarse para cultivar generaciones de progenie de plantas transformadas de la presente invención que incluyen línea de planta híbrida para la selección de plantas que tienen un rasgo potenciado. Además de la transformación directa de una planta con un ADN recombinante, las plantas transgénicas pueden prepararse cruzando una primera planta que tiene un ADN recombinante con una segunda planta que carece del ADN. Por ejemplo, el ADN recombinante puede introducirse en la primera línea de la planta que es susceptible a transformación para producir una planta transgénica que puede cruzarse con una segunda línea de planta para introducir el ADN recombinante en la segunda línea de planta. Una planta transgénica con ADN recombinante que proporciona un rasgo potenciado, por ejemplo, rendimiento potenciado, puede cruzarse con la línea de la planta transgénica que tiene otro ADN recombinante que confiere otro rasgo, por ejemplo, resistencia a herbicida o resistencia a plagas, para producir plantas de progenie que tienen ADN recombinante que confiere ambos rasgos. Normalmente, en tal cultivo para combinar rasgos, la planta transgénica que dona el rasgo adicional es una línea masculina y la planta transgénica que lleva los rasgos base es la línea femenina. La progenie de este cruce se segregará de forma que algunas de las plantas lleven el ADN para ambos rasgos parentales y algunos llevarán el ADN para un rasgo parental; tales plantas pueden identificarse por marcadores asociados a ADN recombinante parental, por ejemplo, identificación de marcadores por análisis para ADN recombinante o, en el caso en el que un marcador de selección esté ligado al recombinante, por aplicación del agente de selección tal como un herbicida para su uso con una tolerancia a marcador de herbicida, o por selección del rasgo potenciado. Las plantas de progenie que llevan ADN para ambos rasgos parentales pueden retrocruzarse múltiples veces en la línea parental femenina, por ejemplo, normalmente 6 a 8 generaciones, para producir una planta de progenie con sustancialmente el mismo genotipo que una línea parental transgénica original, pero para el ADN recombinante de la otra línea parental transgénica.

En la práctica de la transformación, el ADN se introduce normalmente en solo un pequeño porcentaje de células de la planta diana en un experimento de transformación cualquiera. Se usan genes marcadores para proporcionar un sistema eficiente para la identificación de aquellas células que se transforman establemente recibiendo e integrando una construcción de ADN transgénica en sus genomas. Genes marcadores preferidos proporcionan marcadores selectivos que confieren resistencia a un agente selectivo, tal como un antibiótico o herbicida. Cualquiera de los herbicidas a los que las plantas de la presente invención pueden ser resistentes son agentes útiles para marcadores selectivos. Células potencialmente transformadas se exponen al agente selectivo. En la población de células supervivientes habrá aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia se integre y exprese a niveles suficientes para permitir la supervivencia de células. Las células pueden probarse adicionalmente para confirmar la integración estable del ADN exógeno. Los genes marcadores selectivos comúnmente usados incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos tales como kanamicina y paromomicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) o resistencia a herbicidas tales como glufosinato (*bar* o *pat*) y glifosato (*aroA* o EPSPS). Ejemplos de tales de selección se ilustran en las patentes de EE.UU. 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 y 6.118.047. Los marcadores de selección que proporcionan una

capacidad para identificar visualmente transformantes también pueden emplear, por ejemplo, un gen que expresa una proteína coloreada o fluorescente tal como una luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP) o un gen que expresa un gen *beta*-glucuronidasa o *uidA* (GUS) para el que se conocen diversos sustratos cromogénicos.

5 Las células vegetales que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o células que han sido puntuadas positivas en un ensayo de cribado, pueden cultivarse en medios de regeneración y permitir que maduren en plantas. Las plántulas en desarrollo regeneradas a partir de células vegetales transformadas pueden transferirse a mezcla de crecimiento de plantas y aclimatarse, por ejemplo, en una cámara medioambientalmente controlada a aproximadamente el 85% de humedad relativa, 600 ppm de CO<sub>2</sub> y 25-250 microeinsteins m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luz antes de transferirse a un invernadero o cámara de crecimiento para maduración. Las plantas se regeneran de aproximadamente 6 semanas a 10 meses después de identificarse un transformante, dependiendo del tejido inicial. Las plantas pueden polinizarse usando procedimientos de cultivo de plantas convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia y producir semilla, por ejemplo, comúnmente se usa la autopolinización con maíz transgénico. La planta transformada regenerada o su semilla de progenie o plantas pueden probarse para la expresión del ADN recombinante y seleccionarse para la presencia de rasgo agronómico potenciado.

15 **Plantas y semillas transgénicas**

Las plantas transgénicas derivadas de las células vegetales de maíz de la presente invención se cultivan para generar plantas transgénicas que tienen un rasgo potenciado con respecto a una planta de control y producen semilla transgénica y polen haploide de la presente invención. Tales plantas con rendimiento potenciado se identifican por selección de plantas transformadas o semilla de progenie para el rendimiento potenciado. Para la eficiencia se diseña un procedimiento de selección para evaluar múltiples plantas transgénicas (eventos) que comprenden el ADN recombinante, por ejemplo, múltiples plantas de 2 a 20 o más eventos transgénicos. Las plantas transgénicas cultivadas a partir de semilla transgénica proporcionada en la presente memoria demuestran rasgos agronómicos mejorados que contribuyen al elevado rendimiento u otro rasgo que proporciona elevado valor de la planta, que incluye, por ejemplo, calidad mejorada de la semilla. Son de particular interés plantas que tienen eficiencia potenciada del uso del agua, tolerancia potenciada al frío, elevado rendimiento, eficiencia potenciada del uso de nitrógeno, proteína potenciada de la semilla y aceite potenciado de la semilla.

La Tabla 1 proporciona una lista de ADN que codifica proteína (“genes”) que son útiles como ADN recombinante para la producción de plantas transgénicas con rasgo agronómico potenciado, los elementos de la Tabla 1 se describen por referencia a:

30 “SEC PEP” que identifica una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5.

“SEC NUC” que identifica una secuencia de ADN de SEC ID N°: 1.

“Vector base” que identifica un plásmido base usado para la transformación del ADN recombinante.

“NOMBRE DE PROTEÍNA” que es un nombre común para la proteína codificada por el ADN recombinante.

35 “ID de plásmido” que identifica un nombre arbitrario para el plásmido de transformación de plantas que comprende ADN recombinante para expresar el ADN recombinante en células vegetales.

Tabla 1

SEC ID N° PEP	SEC ID N° NUC	Vector base	NOMBRE DE PROTEÍNA	ID de plásmido
5	1	pMON65154	Arabidopsis G1543	pMON68392
5	1		Arabidopsis G1543	pMON74775
5	1	pMON74537	Arabidopsis G1543	pMON83062

**Procedimientos de selección de plantas transgénicas con rendimiento potenciado**

40 Muchos eventos transgénicos que sobreviven a plantas transgénicas fértiles que producen semillas y plantas de progenie no presentarán un rendimiento potenciado. La selección es necesaria para identificar la planta transgénica de la presente invención. Las plantas transgénicas que tienen rendimiento potenciado se identifican de poblaciones de plantas transformadas como se describe en la presente memoria evaluando el rendimiento en una variedad de ensayos para detectar un rendimiento potenciado. Estos ensayos también pueden tomar muchas formas, que incluyen análisis para detectar cambios en la composición química, biomasa, propiedades fisiológicas, morfología de la planta. Los cambios en

las composiciones químicas tales como composición nutricional del grano pueden detectarse por análisis de la composición de la semilla y contenido de proteína, aminoácidos libres, aceite, ácidos grasos libres, almidón o tocoferoles. Los cambios en las características de la biomasa pueden hacerse en plantas cultivadas en invernadero o en el campo y pueden incluir la altura de la planta, diámetro del tallo, pesos secos de la raíz y brotes; y, para plantas de maíz, longitud y diámetro de las mazorcas. Los cambios en propiedades fisiológicas pueden identificarse evaluando respuestas a condiciones de estrés, por ejemplo, ensayos que usan condiciones de estrés impuestas tales como déficit de agua, deficiencia de nitrógeno, condiciones de crecimiento frías, ataque de patógenos o insectos o deficiencia de luz, o elevada densidad de la planta. Los cambios en la morfología pueden medirse por observación visual de la tendencia de una planta transformada con un rasgo agronómico potenciado a también parecer que es una planta normal en comparación con cambios hacia pobladas, más altas, más gruesas, hojas más estrechas, hojas rayadas, rasgo nodoso, clorosis, albinas, producción de antocianinas, o panojas, mazorcas o raíces alteradas. Otras propiedades de selección incluyen días hasta la liberación de polen, días hasta la emisión de estigmas, velocidad de extensión de las hojas, contenido de clorofila, temperatura de las hojas, posición, vigor de las plantas de semillero, longitud entrenudos, altura de la planta, número de hojas, área de las hojas, macollamiento, raíces de anclaje, capacidad de permanecer verde, encamado del tallo, encamado de las raíces, salud de la planta, esterilidad/prolificidad, quebrado en verde y resistencia a plagas. Además, pueden evaluarse características fenotípicas del grano cosechado, que incluyen número de granos por fila en la mazorca, número de filas de granos en la mazorca, aborto de granos, peso del grano, tamaño del grano, densidad de granos y calidad física de los granos.

Las semillas para plantas transgénicas con rasgos agronómicos potenciados de la presente invención son plantas de maíz.

#### **Selección de rendimiento elevado**

Muchas plantas de maíz transgénico de la presente invención presentan rendimiento potenciado con respecto a una planta de control. El rendimiento potenciado puede resultar del potencial de captación potenciado de la semilla, es decir, el número y tamaño de células del endospermo o granos y/o la fuerza de captación potenciada, es decir, la tasa de biosíntesis de almidón. El potencial de captación puede establecerse muy pronto durante el desarrollo de los granos, ya que el número de células del endospermo y el tamaño de las células se determinan dentro de los primeros días después de la polinización.

Gran parte del aumento en el rendimiento del maíz de varias décadas anteriores ha resultado de un aumento en la densidad de siembra. Durante ese periodo, el rendimiento del maíz ha aumentando a una tasa de 29,91/ha/año (2,1 fanegas/acre/año), pero la densidad de siembra ha aumentado a una tasa de 618 plantas/ha/año (250 plantas/acre/año). Una característica del maíz híbrido moderno es la capacidad de estas variedades para sembrarse a alta densidad. Muchos estudios han mostrado que una densidad de siembra superior a la actual debe producir más producción de biomasa, pero los actuales germoplasmas no rinden bien a estas mayores densidades. Un enfoque para aumentar el rendimiento es aumentar el índice de cosecha (IC), la proporción de biomasa que se asigna al grano en comparación con la biomasa total, en siembras de alta densidad.

La eficaz selección del rendimiento de maíz transgénico usa progenie híbrida del evento transgénico sobre múltiples localizaciones con plantas cultivadas bajo prácticas de gestión de la producción óptimas, y control de plagas máximo. Un objetivo útil para el rendimiento potenciado es un aumento del 5 % al 10 % en el rendimiento con respecto al rendimiento producido por plantas cultivadas a partir de semilla para una planta de control. La útil selección en múltiples y diversas localizaciones geográficas, por ejemplo, hasta 16 o más localizaciones, a lo largo de una o más estaciones de siembra, por ejemplo, al menos dos estaciones de siembra para distinguir estadísticamente da mejora de los efectos medioambientales naturales. Es plantar múltiples plantas transgénicas, plantas de control positivas y negativas, y plantas polinizadoras en parcelas convencionales, por ejemplo, parcelas de 2 filas, 6,1 m (20 pies) de largo por 1,5 m (5 pies) de ancho con 76 cm (30 pulgadas) de distancia entre las filas y un callejón de 91 cm (3 pies) entre campos. Los eventos transgénicos pueden agruparse por construcciones de ADN recombinante con grupos situados al azar en el campo. Una parcela polinizadora de una línea de maíz de alta calidad se planta por cada dos parcelas para permitir la polinización abierta si se usan eventos transgénicos estériles macho. Una densidad de siembra útil es aproximadamente 74.100 plantas/ha (30.000 plantas/acre).

Los indicadores sustitutos para seleccionar la mejora del rendimiento incluyen capacidad de la fuente (biomasa), salida de la fuente (sacarosa y fotosíntesis), componentes de captación (tamaño del grano, tamaño de la mazorca, almidón en la semilla), desarrollo (respuesta a la luz, altura, tolerancia a la densidad), madurez, rasgo de florecimiento temprano y respuestas fisiológicas a siembra de alta densidad, por ejemplo, a 111.200 plantas/ha (45.000 plantas por acre), por ejemplo, como se ilustra en la Tabla 2. Cuando se selecciona para la mejora del rendimiento, un enfoque de medición estadística útil comprende tres componentes, es decir, modelado de la autocorrelación espacial del campo de pruebas por separado para cada localización, ajuste de los rasgos de los eventos de ADN recombinante para la dependencia espacial para cada localización y realización de un análisis de localización cruzada. La primera etapa en el modelado de la autocorrelación espacial es estimar los parámetros de covarianza del semivariograma. Se asume un modelo de

covarianza esférica para modelar la autocorrelación espacial. Debido al tamaño y naturaleza del ensayo, es probable que la autocorrelación espacial pueda cambiar. Por tanto, también se supone anisotropía junto con la estructura de covarianza esférica.

Tabla 2

Momento	Evaluación	Descripción	comentarios
V2-3	Posición inicial	Puede tomarse cualquier tiempo después de la germinación y antes de la eliminación de cualquier planta.	
Liberación de polen	GDU al 50 % de liberación	GDU al 50 % de plantas Liberación del 50 % de panoja.	
Emisión de estigmas	GDU al 50 % de emisión de estigmas	GDU al 50 % de plantas que muestran estigmas.	
Madurez	Altura de la planta	Altura desde la superficie de la tierra hasta la unión de la hoja bandera (pulgadas).	10 plantas por parcela – Ayuda del equipo de rendimiento
Madurez	Altura de la mazorca	Altura desde la superficie de la tierra hasta el nodo de unión de la mazorca primaria.	10 plantas por parcela - Ayuda del equipo de rendimiento
Madurez	Hojas por encima de la mazorca	Puntuaciones visuales: erecta, tamaño, ondulado	
Madurez	Tamaño de las panojas	Puntuaciones visuales +/- frente a WT	
Pre-cosecha	Posición final	Recuento de la posición final antes de la cosecha, excluir retoños	
Pre-cosecha	Encamado del tallo	Ningún tallo roto por debajo de la unión de la mazorca primaria. Excluir inclinación de retoños	
Pre-cosecha	Encamado de las raíces	Ningún tallo se inclina >45° de ángulo de la perpendicular.	
Pre-cosecha	Capacidad de permanecer verde	Después de la madurez fisiológica y cuando son evidentes las diferencias entre genotipos: escala 1 (90-100 % de tejido verde) - 9 (0-19 % de tejido verde).	
Cosecha	Rendimiento del grano	Rendimiento del grano/parcela (peso de la vaina)	

5

El siguiente conjunto de ecuaciones describe la forma estadística del modelo de covarianza esférica anisotrópica.

$$C(h; \theta) = \nu I(h = 0) + \sigma^2 \left( 1 - \frac{3}{2}h + \frac{1}{2}h^3 \right) I(h < 1)$$

en la que  $I(\bullet)$  es la función indicadora

$$h = \sqrt{\dot{x}^2 + \dot{y}^2}$$

10 y

$$\dot{x} = [\cos(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) - \sin(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_x$$

$$\dot{y} = [\sin(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) + \cos(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_y$$

en las que  $s_1 = (x_1, y_1)$  son las coordenadas espaciales de una localización y  $s_2 = (x_2, y_2)$  son las coordenadas espaciales de la segunda localización. Hay 5 parámetros de covarianza

$$\theta = (v, \sigma^2, \rho, \omega_n, \omega_j)$$

5

en la que  $v$  es el efecto pepita,  $\sigma^2$  es la meseta parcial,  $\rho$  es una rotación en grados en el sentido de las agujas del reloj desde el norte,  $\omega_n$  es un parámetro de escala para el eje menor y  $\omega_j$  es un parámetro de escala para el eje mayor de una elipse anisotrópica de igual covarianza. Los cinco parámetros de la covarianza que definen la tendencia espacial se estimarán entonces usando los datos de parcelas polinizadoras muy replicadas mediante enfoque de probabilidad máxima limitada. En un ensayo en campos de multilocalización, la tendencia espacial se modela por separado para cada localización.

10

Después de obtener los parámetros de la varianza del modelo, se genera una estructura varianza-covarianza para el conjunto de datos que va a analizarse. Esta estructura varianza-covarianza contiene información espacial requerida para ajustar los datos de rendimiento para la dependencia espacial. En este caso, un modelo anidado que representa mejor el tratamiento y diseño experimental del estudio se usa junto con la estructura varianza-covarianza para ajustar los datos de rendimiento. Durante este procedimiento, los efectos del vivero o de los lotes de semillas también pueden modelarse y estimarse para ajustar el rendimiento para cualquier paridad de rendimiento producida por diferencias de lotes de semillas.

15

Después de generarse datos espacialmente ajustados de las diferentes localizaciones, todos los datos ajustados se combinan y analizan suponiendo localizaciones como replicaciones. En este análisis, las varianzas intra e inter-localización se combinan para estimar el error estándar de rendimiento de plantas transgénicas y plantas de control. Se usan comparaciones medias relativas para indicar mejoras de rendimiento estadísticamente significativas.

20

Los siguientes ejemplos ilustran aspectos de la invención.

### Ejemplo 1

25

Este ejemplo ilustra la construcción de plásmidos para transferir ADN recombinante en células vegetales que pueden regenerarse en plantas transgénicas de la presente invención. Los cebadores para la amplificación por PCR de nucleótidos codificantes de proteína de ADN recombinante se diseñaron en o cerca de los codones de inicio y de terminación de la secuencia codificante, con el fin de eliminar la mayoría de las regiones sin traducir de 5' y 3'. Cada ADN recombinante que codifica una proteína identificada en la Tabla 1 se amplificó por PCR antes de la inserción en el sitio de inserción de uno de los vectores base como se menciona en la Tabla 1.

30

Un vector de transformación de planta base pMON65154 se fabricó para su uso en preparar ADN recombinante para transformación en tejido de maíz usando sistemas de vectores de expresión en plantas GATEWAY™ Destination (disponibles de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Con referencia a los elementos descritos en la Tabla 3 a continuación y SEC ID N°: 9, pMON65154 comprende un casete de expresión del marcador de selección y un casete de expresión de ADN recombinante de molde. El casete de expresión del marcador comprende un promotor CaMV 35S operativamente ligado a un gen que codifica neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) seguido de una región 3' de un gen nopalina sintasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión de ADN recombinante de molde está posicionado cola a cola con el casete de expresión del marcador. El casete de expresión de ADN recombinante de molde comprende ADN regulador en 5' que incluye un promotor de actina 1 de arroz, exón e intrón, seguido de un sitio de inserción GATEWAY™ para ADN recombinante, seguido de una región de 3' de un gen de inhibidor II de proteinasa de patata (*pinII*). Una vez el ADN recombinante se ha insertado en el sitio de inserción, el plásmido es útil para la transformación de plantas, por ejemplo, por bombardeo con microproyectiles.

35

40

Tabla 3

<b>FUNCIÓN</b>	<b>ELEMENTO</b>	<b>REFERENCIA</b>
Gen de planta del casete de expresión de interés	Promotor 1 de actina de arroz	Patente de EE.UU. 5.641.876
	Exón 1 de actina 1 de arroz, intrón 1 potenciador	Patente de EE.UU. 5.641.876
Gen del sitio de inserción de interés	<i>AttR1</i>	Manual de instrucciones de la tecnología de clonación GATEWAY™
	Gen CmR	Manual de instrucciones de la tecnología de clonación GATEWAY™
	Genes <i>ccdA</i> , <i>ccdB</i>	Manual de instrucciones de la tecnología de clonación GATEWAY™
	<i>attR2</i>	Manual de instrucciones de la tecnología de clonación GATEWAY™
Gen de planta del casete de expresión de interés	Región 3' de pinll de patata	An y col. (1989) Plant Cell 1:115-122
Casete de expresión del marcador de selección de planta	Promotor CaMV 35S	Patente de EE.UU. 5.858.742
	Marcador de selección de nptII	Patente de EE.UU. 5.858.742
	Región 3' de <i>nos</i>	Patente de EE.UU. 5.858.742
Mantenimiento en <i>E. coli</i>	Origen de replicación de ColE1	
	Origen de replicación de <i>F1</i>	
	Resistencia a ampicilina por <i>Bla</i>	

Se construyó plásmido de vector base similar pMON72472 (SEC ID N°: 10) para su uso en procedimientos mediados por *Agrobacterium* de transformación de plantas similar a pMON65154, excepto (a) el ADN regulador de 5' en el casete de expresión de ADN recombinante de molde fue un promotor de actina de arroz y un intrón de actina de, (b) las secuencias límite de T-ADN izquierda y derecha de *Agrobacterium* se añaden con la secuencia límite derecha localizada 5' con respecto al promotor de actina 1 de arroz y la secuencia límite izquierda localizada 3' con respecto al promotor 35S y (c) ADN se añade para facilitar la replicación del plásmido en tanto *E. coli* como *Agrobacterium tumefaciens*. El ADN añadido al plásmido fuera de las secuencias límite de T-ADN incluye un origen de amplia gama de huéspedes *oriV* de replicación de ADN funcional en *Agrobacterium*, un origen pBR322 de replicación funcional en *E. coli* y un gen de resistencia a espectinomocina/estreptomocina para la selección en tanto *E. coli* como *Agrobacterium*. pMON74775 se construye en un vector base esencialmente el mismo que pMON72472.

### Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la transformación de plantas útil en producir las plantas de maíz transgénico de la presente invención. Plantas de maíz de una línea fácilmente transformable se cultivan en el invernadero y las mazorcas se recogen cuando los embriones tienen 1,5 a 2,0 mm de longitud. Las mazorcas se esterilizan superficialmente pulverizando o sumergiendo las mazorcas en 80 % de etanol, seguido de secado al aire. Los embriones inmaduros se aíslan de granos individuales sobre las mazorcas esterilizadas en la superficie. Antes de la inoculación de células de maíz, las células de *Agrobacterium* se cultivan durante la noche a temperatura ambiente. Los embriones de maíz inmaduros se inoculan con *Agrobacterium* poco después de la escisión, y se incuban a temperatura ambiente con *Agrobacterium* durante 5-20 min. Entonces, los embriones inmaduros se co-cultivan con *Agrobacterium* durante 1-3 d a 23 °C en la oscuridad. Los embriones co-cultivados se transfieren a medios de selección y se cultivan durante aproximadamente dos semanas para permitir que se desarrolle callo embriogénico. El callo embriogénico se transfiere a medio de cultivo que contiene 100 mg/l de

paromomicina y se subcultiva a intervalos de aproximadamente dos semanas. Los transformantes se recuperan 6 a 8 semanas después del inicio de la selección.

Se preparan vectores de plásmido clonando ADN identificado en la Tabla 1 en la base identificada para su uso en transformación de maíz para producir plantas de maíz transgénico y semilla.

5 Para transformación mediada por *Agrobacterium* de callo de maíz, los embriones inmaduros se cultivan durante aproximadamente 8-21 d después de la escisión para permitir que se desarrolle callo. Entonces, el callo se incuba durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente con la suspensión de *Agrobacterium*, seguido de eliminación del líquido por aspiración. El callo y *Agrobacterium* se co-cultivan sin selección durante 3-6 d seguido de selección en paromomicina durante aproximadamente 6 semanas, con transferencias bisemanales a medios frescos, y el callo resistente a  
10 paromomicina se identificó como que contenía el ADN recombinante en un casete de expresión.

Para la transformación por bombardeo con microproyectiles, embriones de maíz inmaduros se aíslan y se cultivan 3-4 d antes del bombardeo. Antes del bombardeo con microproyectiles se prepara una suspensión de partículas de oro sobre la que se precipitan casetes de expresión de ADN recombinante deseados. El ADN se introduce en células de maíz como se describe en las patentes de EE.UU. 5.550.318 y 6.399.861 usando el dispositivo de liberación de genes de aceleración de  
15 partículas de descarga eléctrica. Tras el bombardeo con microproyectiles, el tejido se cultiva en la oscuridad a 27 °C.

Para regenerar plantas de maíz transgénico, callo transgénico resultante de la transformación se dispone sobre medios para iniciar el desarrollo de brotes en plántulas que se transfieren a tierra de maceta para el crecimiento inicial en una cámara de crecimiento a 26 °C seguido de un banco de niebla antes de trasplantar a macetas de 12,7 cm (5 pulgadas) en las que las plantas se cultivan hasta la madurez. Las plantas se autofecundan y la semilla se recoge para selección como  
20 semilla, plantas de semillero o plantas de progenie R2 o híbridos, por ejemplo, para ensayos de rendimiento en las selecciones indicadas anteriormente.

**Ejemplo 3**

Este ejemplo ilustra adicionalmente la producción e identificación de semilla transgénica para maíz transgénico que tiene un elevado rendimiento con respecto a plantas de control. La semilla de maíz transgénico y plantas que comprenden ADN  
25 recombinante de cada uno de los genes clonados en uno de los vectores base como se ha identificado en la Tabla 1 se preparan por transformación. Muchos eventos transgénicos que sobreviven a plantas transgénicas fértiles que producen semillas y plantas de progenie no presentarán un rasgo agronómico potenciado. Las plantas transgénicas y semillas que tienen rasgos agronómicos potenciados de la presente invención se identifican seleccionando la eficiencia de uso de nitrógeno, rendimiento, eficiencia de uso de agua y tolerancia al frío. Las plantas transgénicas que proporcionan semillas con composiciones de semilla mejoradas se identifican analizando las composiciones de semilla que incluyen niveles de  
30 proteína, aceite y almidón.

**Rendimiento**

Las plantas transgénicas con rendimiento potenciado proporcionadas por la presente invención se seleccionaron mediante el procedimiento de selección según el procedimiento convencional descrito anteriormente y el rendimiento de  
35 estas plantas transgénicas se muestra en las Tablas 4 y 5 a continuación que indican el cambio en el rendimiento de maíz medido en fanegas por acre.

Tabla 4

Evento	Rendimiento por acre de extensión		Rendimiento de alta densidad
	Año 1	Año 2	
24861	3,9	-2,22	-5,3
24862	0,51	-1,86	2,8
24870	2,33	5,41	7,81
24874	5,21	2,61	8,21
26391	1,13	-3,59	5,1

Tabla 5

Evento	Delta	Porcentaje de cambio	Valor de p
ZM M81660	-6,20	-3,47	0,05
ZM M81671	-21,99	-12,32	0,00
ZM M81675	-23,94	-13,41	0,00
ZM M81677	-3,71	-2,08	0,23
ZM M81682	-5,58	-3,12	0,11
ZM M81684	-14,72	-8,25	0,00
ZM M81687	4,83	2,71	0,13
ZM M81688	-14,64	-8,20	0,00

**Ejemplo 4**

- 5 Este ejemplo ilustra plantas transgénicas con rendimiento potenciado mediante combinaciones. Como se ilustra en el Ejemplo 3, las plantas transgénicas con rendimiento potenciado se generan empleando el ADN recombinante de cada uno de los genes identificados en la Tabla 1. Para producir el potenciamiento adicional de rasgos agronómicos en plantas transgénicas, los genes de la Tabla 1 se combinan con uno o más genes adicionales que potencian rasgos agronómicos para generar una planta transgénica con mayor potenciamiento en uno o más rasgos agronómicos que cualquier gen solo. Esta combinación se logra tanto mediante transformación como cultivo. El siguiente ejemplo ilustra este principio.
- 10 Una planta de maíz transgénico establemente transformada con una construcción, pMON74923, que contiene el gen fitocromo B (phyB) de *Zea mays* (SEC ID N°: 15) bajo el control de un promotor de aldolasa (FDA) de maíz (solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 09/757.089) se cruzó con una planta de maíz transgénico establemente transformada con pMON68392. El cruce demostró un aumento del rendimiento (fan/ac) del 7,2 % en comparación con la planta de maíz que contiene el gen phyB solo (2,4 %).
- 15 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Monsanto Technology LLC
- Lund, Adrian
- Deikman, Jill
- Anstrom, Donald
- 20 Chomet, Paul
- Heard, Jacqueline
- <120> Plantas transgénicas con rasgos agronómicos potenciados
- 25 <130> 38-21(53720)C
- <150> 60/638.099
- <151> 21-12-2004
- 30 <150> 60/660.320



ES 2 459 369 T3

<151> 10-03-2005

<160> 15

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 828

<212> ADN

10 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```
atgataaaac tactatttac gtacatatgc acatacacat ataaactata tgctctatat 60
catatggatt acgcatgCGT gtgtatgtat aaatataaag gcatCGTcac gcttcaagtt 120
tgtctctttt atattaaact gagagttttc ctctcaaact ttaccttttc ttcttCGatc 180
ctagctctta agaaccctaa taattcattg atcaaaataa tggcgatttt gccgaaaac 240
tcttcaaact tggatcttac tatctcCGtt ccaggcttct cttcatcccc tctctcCGat 300
gaaggaagtG gcggaaggaag agaccagcta aggctagaca tgaatCGgtt accgctCGtct 360
gaagacgGag acgatgaaga attcagTcac gatgatggct ctgctcctcc gcgaaagaaa 420
ctcCGtctaa ccagagaaca gtcacgTctt cttgaagata gtttcagaca gaatcatacc 480
cttaatccca aacaaaagga agtacttgcc aagcatttga tgctacggcc aagacaaatt 540
gaagtttggt ttcaaaaccg tagagcaagg agcaaattga agcaaaccga gatggaatgc 600
gagtatctca aaaggtggtt tggttcatta acggaagaaa accacaggct ccatagagaa 660
gtagaagagc ttagagccat aaaggttggc ccaacaacgg tgaactctgc ctCGagcctt 720
actatgtgtc ctCGctgCGa gcgagttacc cctgCGCGa gcccttCGag gCGgtggtg 780
ccggttccg ctaagaaaac gtttccgCG caagagCGtg atCGttga 828
```

15

<210> 2

<211> 678

<212> ADN

<213> Zea mays

20

<400> 2

ES 2 459 369 T3

atgggggtcca cttctccttc aggcctggag ctcacatgg ctgtcccggg cctcagctcc 60  
 tcctctggct cagaggggtt tggatgcaac aacaacaacg ggagcgggaa cggaacaac 120  
 atgagggacc tggacatgaa ccagccggcg agcggcggcg aggaggagga gttcccaatg 180  
 gggagcgtgg aggaggagga ggacgagcgc ggcggcggcg gcgggcccga ccgcgccaag 240  
 aagctccggc tgtccaagga gcagtcccgc ctctggagg agagcttccg cctcaaccac 300  
 accctcacac cgaagcaaaa ggaggccttg gctgtcaagc tcaagctgcg gcccaggcag 360  
 gtggaggctt ggttccagaa ccgcagggct aggacgaagc ttaagcagac ggagctggag 420  
 tgcgagtacc tgaagcgtg ctctggctcg ctgaccgagg agaaccggcg gctgcagcgg 480  
 gaggtggagg agctgcgcgc gatgcgggtg gccccgcca ccgtgctctc cccgcacacc 540  
 cggcagccgc tcccggcgtc cgcgctcacc atgtgccgc gctgcgagcg catcaccgcc 600  
 gcaacggccg cgcgcacccc acgcccggcg ccgcgcgca gcccttcca cccgcgcgc 660  
 ccgtccgcgg cgttttag 678

<210> 3

<211> 642

5

<212> ADN

<213> Glicina max

<400> 3

atggcggttt taccaagtag ctctcaagc ttggaattga ccatatctgt acctggtttt 60  
 gcttcttcac caacccttct tccctcatca tctgtgaaag aattggacat aatcaagta 120  
 cctcttgaag aagattgat ggcataaac atggaagatg aagaagaaag cagcaatgga 180  
 gaacctctc gaaagaaact ccgtctcaca aaggaacaat ctcttctcct tgaagaaagc 240  
 tttagacaaa acccacggtt gaaccocaaag cagaaagagt ctttggaat gcaactgaag 300  
 ctgcgaccaa ggcaagtgga ggtgtggttt cagaaccgta gggccaggag caagctgaag 360  
 cagacagaga tggagtgcga gtacctcaag aggtggttcg gttccctcac agagcagaac 420  
 cggaggctcc agagggaggt ggaggagctg cgagcatta aggtgggccc acccaccgtg 480  
 atctcccctc actcctgcga accgctcccg gcctccacac tttccatgtg tcccgcgtgc 540  
 gagcgtgtca cctccaccgc cgacaaaccg ccctccggcg cggccacttt gtccgctaaa 600  
 10 gtgccgcaa ctcaatccg ccaaccctcc gggcctgtt ag 642

<210> 4

<211> 690

<212> ADN

ES 2 459 369 T3

<213> *Oryza sativa*

<400> 4

```
atgatggggg ccacttctcc gtcaggcctg gagctcacca tggctgtccc cggcctcagc      60
tcctctgggt cagaaggggc cggttgcaac aacaacaacg ccggtggcgg ctgcaacatg     120
agggacctgg acatcaacca gccggcgagc ggcggcgagg aggaggagt cccgatgggc     180
agcgtggagg aggacgagga ggagaggggc gtcggtgggc cccaccgccc caagaagctc     240
cgcctctcca aggagcagtc ccgcctctc gaggagagct tccgcctcaa ccataccctc     300
acgccgaagc aaaaggaggc cttggcgatc aaactgaagc tgcggccgag gcaggtggag     360
gtctggtttc agaaccgtag ggcaaggacg aagctgaagc agacggagat ggagtgcgag     420
tacctgaagc gctgcttcgg gtcgctgacg gaggagaacc gccggctgca gcgggaggtg     480
gaggagctgc gggcgatgcg ggtggccccc cccacggtgc tctcgccgca caccaggcag     540
ccgctcccgg cgtccgcgct caccatgtgc ccccgtgcg agcgcatac cgccgccacc     600
ggcccgcctg ccgtgcgccc gccgcgctg tcagccgccc ccgcccgcc ctcgcccttc     660
5 caccctcgcc gccctctgc ggccttctag                                     690
```

<210> 5

<211> 275

<212> PRT

10 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 5

ES 2 459 369 T3

Met Ile Lys Leu Leu Phe Thr Tyr Ile Cys Thr Tyr Thr Tyr Lys Leu  
1 5 10 15

Tyr Ala Leu Tyr His Met Asp Tyr Ala Cys Val Cys Met Tyr Lys Tyr  
20 25 30

Lys Gly Ile Val Thr Leu Gln Val Cys Leu Phe Tyr Ile Lys Leu Arg  
35 40 45

Val Phe Leu Ser Asn Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ile Leu Ala Leu Lys  
50 55 60

Asn Pro Asn Asn Ser Leu Ile Lys Ile Met Ala Ile Leu Pro Glu Asn  
65 70 75 80

Ser Ser Asn Leu Asp Leu Thr Ile Ser Val Pro Gly Phe Ser Ser Ser  
85 90 95

Pro Leu Ser Asp Glu Gly Ser Gly Gly Gly Arg Asp Gln Leu Arg Leu  
100 105 110

Asp Met Asn Arg Leu Pro Ser Ser Glu Asp Gly Asp Asp Glu Glu Phe  
115 120 125

Ser His Asp Asp Gly Ser Ala Pro Pro Arg Lys Lys Leu Arg Leu Thr  
130 135 140

Arg Glu Gln Ser Arg Leu Leu Glu Asp Ser Phe Arg Gln Asn His Thr  
145 150 155 160

Leu Asn Pro Lys Gln Lys Glu Val Leu Ala Lys His Leu Met Leu Arg  
165 170 175

Pro Arg Gln Ile Glu Val Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Arg Ser Lys  
180 185 190

Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr Leu Lys Arg Trp Phe Gly  
195 200 205

Ser Leu Thr Glu Glu Asn His Arg Leu His Arg Glu Val Glu Glu Leu  
210 215 220

Arg Ala Ile Lys Val Gly Pro Thr Thr Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu  
225 230 235 240

Thr Met Cys Pro Arg Cys Glu Arg Val Thr Pro Ala Ala Ser Pro Ser  
245 250 255

Arg Ala Val Val Pro Val Pro Ala Lys Lys Thr Phe Pro Pro Gln Glu  
260 265 270

Arg Asp Arg  
275

ES 2 459 369 T3

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> Zea mays

5

<400> 6

```
Met Gly Ser Thr Ser Pro Ser Gly Leu Glu Leu Thr Met Ala Val Pro
 1           5           10           15
Gly Leu Ser Ser Ser Ser Gly Ser Glu Gly Phe Gly Cys Asn Asn Asn
          20           25           30
Asn Gly Ser Gly Asn Gly Asn Asn Met Arg Asp Leu Asp Met Asn Gln
```



ES 2 459 369 T3

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

Lys Glu Leu Asp Ile Asn Gln Val Pro Leu Glu Glu Asp Trp Met Ala  
 35 40 45

Ser Asn Met Glu Asp Glu Glu Glu Ser Ser Asn Gly Glu Pro Pro Arg  
 50 55 60

Lys Lys Leu Arg Leu Thr Lys Glu Gln Ser Leu Leu Leu Glu Glu Ser  
 65 70 75 80

Phe Arg Gln Asn His Thr Leu Asn Pro Lys Gln Lys Glu Ser Leu Ala  
 85 90 95

Met Gln Leu Lys Leu Arg Pro Arg Gln Val Glu Val Trp Phe Gln Asn  
 100 105 110

Arg Arg Ala Arg Ser Lys Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr  
 115 120 125

Leu Lys Arg Trp Phe Gly Ser Leu Thr Glu Gln Asn Arg Arg Leu Gln  
 130 135 140

Arg Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Val Gly Pro Pro Thr Val  
 145 150 155 160

Ile Ser Pro His Ser Cys Glu Pro Leu Pro Ala Ser Thr Leu Ser Met  
 165 170 175

Cys Pro Arg Cys Glu Arg Val Thr Ser Thr Ala Asp Lys Pro Pro Ser  
 180 185 190

Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Lys Val Pro Pro Thr Gln Ser Arg Gln  
 195 200 205

Pro Ser Ala Ala Cys  
 210

<210> 8

<211> 229

5 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 8

10 Met Met Gly Ala Thr Ser Pro Ser Gly Leu Glu Leu Thr Met Ala Val





ES 2 459 369 T3

<223> vector

<400> 9

```

actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg      60
ctgccataac catgagtgat aacctgCGG ccaacttact tctgacaacg atcggaggac      120
cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt      180
gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag      240
caatggcaac aacgttgCGc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc      300
aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc      360
ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta      420
tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg      480
ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga      540
ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac      600
ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa      660
tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat      720
cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc      780
taccagcggT ggtttgtttg cggatcaag agctaccaac tctttttcCG aaggttaactg      840
gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc      900
acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg      960
ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggga ctcaagacga tagttaccgg     1020
ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa     1080
cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcGCC acgcttcccG     1140
aaggagagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga     1200
gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc tgcggggttt cgccacctct     1260
gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggCG gagcctatgg aaaaacGCCa     1320
gcaacgcggc ctttttaCGg ttctggcct tttgctggcc ttttgctcAc atgttctttc     1380
ctgcgttata ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg     1440
ctcgcCGcag ccgaacgacc gagcgcagCG agtcagtgag cgaggaagCG gaagagcGCC     1500
caatacGcaa accgcctctc cccgcgcgTt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca     1560
ggtttcccga ctggaaaCGg ggcagtgagc gcaacGcaat taatgtgagT tagctcactc     1620

```

5

ES 2 459 369 T3

attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga 1680  
 gcgataaca atttcacaca ggaacagct atgaccatga ttacgccaag ctcgaaatta 1740  
 accctcacta aaggaacaa aagctggagc tgagtactgg cgcgcctgcg gccgcctcga 1800  
 ggtcattcat atgcttgaga agagagtcgg gatagtccaa aataaaacaa aggtaagatt 1860  
 acctggtcaa aagtgaaaac atcagttaaa aggtggtata aagtaaaata tcggtataaa 1920  
 aaggtggccc aaagtgaaat ttactctttt ctactattat aaaaattgag gatgtttttg 1980  
 tcggtacttt gatacgtcat ttttztatga attggttttt aagttttatc gcttttggaa 2040  
 atgcataatc gtatttgagt cgggttttaa gttcgtttgc ttttgtaaat acagagggat 2100  
 ttgtataaga aatatcttta aaaaaacca tatgctaatt tgacataatt tttgagaaaa 2160  
 atatatattc aggcgaattc tcacaatgaa caataataag attaaaatag ctttcccccg 2220  
 ttgcagcgca tgggtatttt ttctagtaaa aataaaagat aaacttagac tcaaacatt 2280  
 tacaaaaaca acccctaag ttctaagc ccaaagtgc atccacgac cattagcaag 2340  
 gccagccc acccaacca acccaacca cccagtcga gccaaactgga caatagtctc 2400  
 ccccccgcc actatcaccg tgagttgtcc gcaccaccgc acgtctcgca gccaaaaaaa 2460  
 aaaaagaaa gaaaaaaaag aaaaagaaa acagcaggtg ggtccgggtc gtggggggcg 2520  
 gaaaagcgag gaggatcgcg agcagcgagc aggcccgcc ctcctccgc ttcaaagaa 2580  
 agcccccca tcgcactat atacataccc cccctctcc tccatcccc ccaaccctac 2640  
 caccaccacc accaccacct cctccccct cgtgcggga cgaagagctc ctccccctc 2700  
 cccctccgccc gccgcggta accaaccgccc cctctctctc tttctttctc cgtttttttt 2760  
 ttogtctcgg tctcgatctt tggccttgg agtttgggtg gccgagagcg gcttcgctgc 2820  
 ccagatcggg gccggggagg ggcgggatct cgcggctggc gtctccgggc gtgagtcggc 2880  
 ccgcatcctc gccggggaatg gggctctcgg atgtagatct gatccgccgt tgttggggga 2940  
 gatgatgggg ggtttaaata ttccgccatg ctaaacaaga tcaggaagag gggaaaagg 3000  
 cactatggtt tatattttta tatattctg ctgcttcgtc agccttagat gtgctagatc 3060  
 tttctttctt ctttttggg gtagaatttg aatccctcag cattgttcat cggtagtttt 3120  
 tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct cgtgcggagc tttttttag gtagaccgcg 3180  
 ggatatcaca agttgtaca aaaaagctga acgagaaacg taaaatgata taaatatcaa 3240  
 tataataaat tagattttgc ataaaaaaca gactacataa tactgtaaaa cacaacatat 3300  
 ccagtcacta tggcggccgc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg 3360  
 tataatgtgt ggattttgag ttaggatccg tcgagatttt caggagctaa ggaagctaaa 3420  
 atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 3480

ES 2 459 369 T3

cttttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 3540  
 attacggcct ttttaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt 3600  
 cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg 3660  
 gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg ttttccatga gcaaactgaa 3720  
 acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 3780  
 tcgcaagatg tggcgtgta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttattgag 3840  
 aatatgtttt tctgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 3900  
 gccaatatgg acaacttctt cgccccggtt ttcaccatgg gcaaatatta tacccaagggc 3960  
 gacaagggtc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggttccat 4020  
 gtcgagcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgtaa 4080  
 acgctgggat ccggcttact aaaagccaga taacagtatg cgtatttgcg cgctgatttt 4140  
 tgcggtataa gaatatatac tgatatgtat acccgaagta tgtcaaaaag aggtgtgcta 4200  
 tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca gcgacagcta tcagttgctc aaggcatata 4260  
 tgatgtcaat atctccggtc tggtaagcac aaccatgcag aatgaagccc gtcgtctgcg 4320  
 tgccgaacgc tggaaagcgg aaaatcagga agggatggct gaggtcgccc ggtttattga 4380  
 aatgaacggc tcttttgctg acgagaacag gggctgggta aatgcagttt aaggtttaca 4440  
 cctataaaaag agagagccgt tatcgtctgt ttgtggatgt acagagtgat attattgaca 4500  
 cgcccgggcg acggatggtg atccccctgg ccagtgcacg tctgctgtca gataaagtct 4560  
 cccgtgaaat ttaccgggtg gtgcatatcg gggatgaaag ctggcgcatg atgaccaccg 4620  
 atatggccag tgtgccggtc tccgttatcg ggaagaagt ggctgatctc agccaccgcg 4680  
 aaaatgacat caaaaacgcc attaacctga tgttctgggg aatataaatg tcaggctccc 4740  
 ttatacacag ccagtctgca ggtcgaccat agtgactgga tatgttgtgt tttacagtat 4800  
 tatgtagtct gttttttatg caaaatctaa tttaatatat tgatatttat atcattttac 4860  
 gtttctcggt cagctttctt gtacaaagtg gtgatgggga tccccaccc tgcaatgtga 4920  
 ccctagactt gtccatcttc ggatggccaa cttaattaat gtataaataa aaggatgcac 4980  
 acatagtgac atgctaatac ctataatgtg ggcatcaaag ttgtgtgtta tgtgtaatta 5040  
 ctaattatct gaataagaga aagagatcat ccatatttct taccctaat gaatgtcacg 5100  
 tgtctttata attctttgat gaaccagatg cattttatta accaattcca tatacatata 5160  
 aatattaatc atatataatt aatatcaatt gggttagcaa aacaaatcta gtctagggtg 5220  
 gttttgctaa ttattggggg atagtgcaaa aagaaatcta cgttctcaat aattcagata 5280

ES 2 459 369 T3

gaaaacttaa taaagtgaga taatttacat agattgcttt tacccttga tatatgtgaa 5340  
accatgcatg atataaggaa aatagataga gaaataatth ttacatcgt tgaatatgta 5400  
aacaatttaa ttcaagaagc taggaatata aatattgagg agtttatgat tattattatt 5460  
atthtgatgt tcaatgaagt ththththth thcatatgaa gtatacaaaa attcttcata 5520  
gaththtggt tctatgccgt agttatctth aataththtg tggttgaaga aaththtg 5580  
tagaaacgaa tggattgtca atthththth aaagcaata tatatgaaat tatactgtat 5640  
athththtag tcatgattaa aatgtggcct taattgaaac atctthtca thcatthth 5700  
caaaagcata tcaggatgat tgataththt ctathththaa aathaathth aggththcaaa 5760  
thaaaththaa ctthaaagtg thctaacctg agththaaaggt thactththaa aaaatactat 5820  
gaaaaatcta atctthctatg aatcgacctg caggaththaa atccatcgtt ctggggccta 5880  
acgggccaag ctthccgatc ctacctgtca thcatcaaaa aggacagtag aaaaggaag 5940  
tggcacctac aaatgccatc atthcgataa aggaaaggct atcaththcaag atgcctctgc 6000  
cgacagtggc ccaaaagatg gacccccacc cagcaggagc atcgtgaaa aagaagacgt 6060  
thcaaccacg ththcaaaagc aagtggattg atgtgatact thcactgacg taaggatga 6120  
cgcacaatcc cactatctth cgcaagacc thctctata thaggaagth caththcath 6180  
ggagaggaca cgctgaaac accagthctct ctctacaaga thggggatct ctactagac 6240  
gatcgtthcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg thctccggcc gctgggtgg 6300  
agaggctath cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 6360  
thcggctgtc agcgcagggg cgcccgtht ththththca gaccgacctg thcggthccc 6420  
tgaatgaact gcaggacgag gcagcgggc thctgtggct ggccacgacg ggcgthctth 6480  
gcgcagctgt gctcgacctg thcactgaa gcggaaagga ctggctgcta thgggcgaag 6540  
thcgggggca ggatctctctg thcatctacc thgctctgc cgagaaagta thcatcatg 6600  
ctgatgcaat cggcgggctg catacgctth atccggctac ctgcccath gaccaccaag 6660  
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtact ggatggaagc cggthctgtc gatcaggatg 6720  
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gthcgcagg ctcaaggcgc 6780  
gcatgccoga cggcgaggat ctctctgtga ccatggoga thcctgctth ccgaatatca 6840  
thgttgaaaa thggcgctth thtgattca thcactgtgg ccggctgggt gthggcgacc 6900  
gctatcagga catagcgtth gctaccctg atathctga agagctthgc ggcgaatgg 6960  
ctgaccgctth ctctgtctth thcggtatcg ccgctcccga thcgcagcgc atcgcctth 7020  
atcgcctth thcagagth thctgagcgg gactctgggg thcgaagaat thccgatcgt 7080  
thaaacath ggcaataaag ththththaa thgathctg thcggctct thcgtatgatt 7140

ES 2 459 369 T3

atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg 7200  
 ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta atacgcgata 7260  
 gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgtta 7320  
 ctagatcggg gatatcgcgt gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc attttattaa 7380  
 ccaattccat atacatataa atattaatca tatataatta atatcaattg ggtagcaaa 7440  
 acaaatctag tctaggtgtg ttttgctaatt tattggggga tagtgcaaaa agaatctac 7500  
 gttctcaata attcagatag aaaacttaatt aaagtgcgat aatttacata gattgctttt 7560  
 atcctttgat atatgtgaaa ccatgcatga tataaggaaa atagatagag aaataatttt 7620  
 ttacatcgtt gaatatgtaa acaatttaatt tcaagaagct aggaatataa atattgagga 7680  
 gtttatgatt attattatta ttttgatggt caatgaagtt ttttttaatt tcatatgaag 7740  
 tatacaaaaa ttcttcatag atttttgttt ctatgccgta gttatcttta atatatttgt 7800  
 ggtgaagaa atttattgct agaacgaat ggattgtcaa tttttttta aagcaaatat 7860  
 atatgaaatt atactgtata ttattttagt catgattaaa atgtggcctt aattgaatca 7920  
 tcttttcat tcatTTTTTc aaaagcatat caggatgatt gatatttattc ttttttaaaa 7980  
 attaatttaa gggttcaaat taaatttaac ttaaaagtgt cctaaccgta gttaaaggtt 8040  
 tacttttaaaa aaatactatg aaaaatctaa tcttctatga atcgaccgct gatcgatcgc 8100  
 ggcgctggc gcgccagtac tagctagtac ccaattcgcc ctatagttagc tcgtattaca 8160  
 attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta 8220  
 atcgcttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg 8280  
 atcgccctc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gaaattgtaa gcgttaatat 8340  
 tttgttaaaa ttcgcgtaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga 8400  
 aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag ataggggtga gtgttgttcc 8460  
 agtttgaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac 8520  
 cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc taatcaagtt ttttggggtc 8580  
 gaggtgccgt aaagcactaa atcggaacct taaagggagc ccccgattta gagcttgacg 8640  
 gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cggcgctag 8700  
 ggcgctgca agttagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgccc cgcttaatgc 8760  
 gcgctacag ggcgctcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgaggaa cccctatttg 8820  
 tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 8880  
 gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 8940  
 tocctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 9000  
 aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 9060  
 cgtaagatc cttgagagtt ttgcocccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa 9120  
 agttctgcta tgtggcggg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg 9180  
 ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagt 9215

# ES 2 459 369 T3

<210> 10

<211> 9747

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> vector

<400> 10

```

ccgatcctac ctgtcacttc atcaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc acctacaaat      60
gccatcattg cgataaagga aaggctatca ttcaagatgc ctctgccgac agtggtccca      120
aagatggacc cccacccaag aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt      180
caaagcaagt ggattgatgt gatacttcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact      240
atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacacgct      300
gaaatcacca gtctctctct acaagatcgg ggatctctag ctagacgacg gtttcgcatg      360
attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc      420
tatgactggg cacaacagac aatcggtgct tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg      480
caggggccc cggttctttt tgcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag      540
gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc      600
gacgttgtea ctgaagcggg aagggaactg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat      660
ctcctgtcat ctcaccttgc tctgcccag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg      720
cggctgcata cgcttgatcc ggtaoctgac ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac      780
gagcagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag      840
catcaggggc tcgcccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgacggc      900
gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggg ggaaaatggc      960
cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata     1020
gcgttgcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttctc     1080
gtgctttacg gtatcgcgcg tcccgatcgc cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac     1140
gagttcttct gagegggact ctggggttcg aagaattccc gatcgttcaa acatttggca     1200
ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgc atgattatca tataatttct     1260

```

10

# ES 2 459 369 T3

gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg	1320
ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata	1380
gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct atgttactag atcggggata	1440
tcgogtgtct ttataattct ttgatgaacc agatgcattt tattaaccaa ttccatatac	1500
atataaatat taatcatata taattaatat caattggggtt agcaaaaaca atctagtcta	1560
ggtgtgtttt gctaattatt ggggatagtg gcaaaaagaa atctacgttc tcaataattc	1620
agatagaaaa cttaataaag tgagataatt tacatagatt gcttttatcc tttgatatac	1680
gtgaaacat gcatgatata aggaaaatag atagagaaat aattttttac atcgttgaat	1740
atgtaaaca ttttaattcaa gaagctagga atataaatat tgaggagttt atgattatta	1800
ttattatttt gatgttcaat gaagtttttt ttaatttcat atgaagtata caaaaattct	1860
tcatagattt ttgtttctat gccgtagtta tctttaatat atttgtgggtt gaagaaattt	1920
attgctagaa acgaatggat tgtcaatttt tttttaagc aaatatatat gaaattatac	1980
tgtatattat tttagtcatg attaaaatgt ggccctaatt gaatcatctt tctcattcat	2040
tttttcaaaa gcatatcagg atgattgata tttatctatt ttaaaaatta atttaagggt	2100
tcaaatataa ttttaacttaa aagtgtccta accgtagtta aaggtttact ttaaaaaaat	2160
actatgaaaa atctaactct ctatgaatcg accgctgac gatcgcggcc gctggcgcg	2220
cctcgagagg cctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaataaag	2280
atttccgaat tagaataatt tgtttattgc tttcgctat aaatacgaag gatcgtaatt	2340
tgtcgtttta tcaaatgta ctttcatttt ataataacgc tgcggacatc tacatttttg	2400
aattgaaaa aaattgtaa ttactctttc tttttctcca tattgacat catactcatt	2460
gctgatccat gtagatttcc cggacatgaa gccatttaca attgaaatata tcctgccgcc	2520
gctgccgctt tgcacccggt ggagcttga tgttggtttc tacgcagaac tgagccggtt	2580
aggcagataa tttccattga gaactgagcc atgtgcacct tcccccaac acggtgagcg	2640
acggggcaac ggagtgatcc acatgggact tttcctagct tggctgccat ttttgggggtg	2700
aggccgttcg cggccgaggg gcgcagcccc tgggggatg ggaggccgc gttagcgggc	2760
cgggaggggt cgagaagggg gggcacccc cttcgcgctg cgcggtcacg cgcacagggc	2820
gcagccctgg ttaaaaaca ggttataaa tattggttta aaagcaggtt aaagacag	2880
ttagcgggtg ccgaaaaacg ggcgaaacc cttgcaaatg ctggattttc tgctgtgga	2940
cagccctca aatgtcaata ggtgcgcccc tcatctgtca gactctgcc cctcaagtgt	3000
caaggatcgc gccctcatc tgtcagtagt cgcgcccctc aagtgtcaat accgcagggc	3060

# ES 2 459 369 T3

acttatcccc aggcttgtcc acatcatctg tgggaaactc gcgtaaaatc aggcgttttc 3120  
 gccgatttgc gaggetggcc agctccacgt cgccggccga aatcgagcct gccctcatc 3180  
 tgtcaacgcc gcgccgggtg agtcggcccc tcaagtgtca acgtccgccc ctcatctgtc 3240  
 agtgagggcc aagttttccg cgaggtatcc acaacgccgg cggccggccg cgggtgtctg 3300  
 cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 3360  
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg atcgaccgat gcccttgaga 3420  
 gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca tgactacggt atcagctcac 3480  
 tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 3540  
 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 3600  
 aggctccgcc ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 3660  
 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcctctcct 3720  
 gttccgacct tgcgccttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg 3780  
 ctttctcata gctcagctg taggtatctc agttcgggtg agtgcgttcg ctccaagctg 3840  
 ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 3900  
 cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 3960  
 attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 4020  
 ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 4080  
 aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggttttttt 4140  
 gtttgcaagc agcagattac ggcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 4200  
 tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggatcatgagg 4260  
 gaagcgggtg tcgccgaagt atcgactcaa ctatcagagg tagttggcgt catcgagcgc 4320  
 catctcgaac cgacgttgct ggccgtacat ttgtacggct ccgcagtgga tggcggcctg 4380  
 aagccacaca gtgatattga tttgctgggt acggtgaccg taaggcttga tgaacaacg 4440  
 cggcgagctt tgatcaacga ccttttgaa acttcggctt cccctggaga gagcagagatt 4500  
 ctccgcgctg tagaagtcac cattgttgtg cacgacgaca tcattccgtg gcgttatcca 4560  
 gctaagcgcg aactgcaatt tggagaatgg cagcgaatg acattcttgc aggtatcttc 4620  
 gagccagcca cgatogacat tgatctggct atcttgctga caaaagcaag agaacatagc 4680  
 gttgccttg taggtccagc ggcggaggaa ctctttgatc cggttcctga acaggatcta 4740  
 tttgaggcgc taaatgaaac cttaacgcta tggaaactgc cggccgactg ggctggcgat 4800  
 gagcgaaatg tagtgcttac gttgtcccgc atttggtaca gcgcagtaac cggcaaaatc 4860  
 gcgcgaaggt atgtcgtcgc cgactgggca atggagcgcg tgccggccca gtatcagccc 4920



ES 2 459 369 T3

gtcatacttg aagctaggca ggcttatctt ggacaagaag atcgcttggc ctgcgcgcga 4980  
 gatcagttgg aagaatttgt tcactacgtg aaaggcgaga tcaccaaggt agtcggcaaa 5040  
 taatgtctaa caattcgttc aagccgacgc cgcttcgcgg cgcggttaa ctcaagcgtt 5100  
 agatgctgca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg 5160  
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc 5220  
 cttcggctct ccgatcgagg atttttcggc gctgcgctac gtccgcgacc gcgttgaggg 5280  
 atcaagccac agcagccac tcgaccttct agccgacca gacgagcaa gggatctttt 5340  
 tggaatgctg ctccgtcgtc aggctttccg acgtttgggt ggttgaacag aagtcattat 5400  
 cgcacggaat gccaaact cccgagggga accctgtggg tggcatgcac atacaaatgg 5460  
 acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga ttattctaataaacgctctt 5520  
 ttctcttagg tttaccgcc aatatacct gtcaaacact gatagttaa acatgactct 5580  
 cttaaggtag ccaaagcccc ggaattcggc ggcctgcgg ccgcctcgag gtcattcata 5640  
 tgcttgagaa gagagtcggg atagtccaaa ataaaacaaa ggtaagatta cctggtcaaa 5700  
 agtgaaaaca tcagttaaaa ggtgtataaa agtaaaatat cggtaataaa aggtggccca 5760  
 aagtgaatt tactcttttc tactattata aaaattgagg atgtttttgt cggactttg 5820  
 atacgtcatt tttgtatgaa ttggttttta agtttattcg cttttgaaa tgcatatctg 5880  
 tatttgagtc gggttttaag ttcgtttgct tttgtaata cagagggatt tgtataagaa 5940  
 atatctttaa aaaaacccat atgctaattt gacataattt ttgagaaaaa tatatattca 6000  
 ggggaattct cacaatgaac aataataaga ttaaaatagc tttccccgt tgcagcgcac 6060  
 gggatatttt tctagtaaaa ataaaagata aacttagact caaacattt acaaaaacaa 6120  
 cccctaaagt tcctaaagcc caaagtgcta tccacgatcc atagcaagcc cagcccaacc 6180  
 caaccaacc caaccaccc cagtccagcc aactggacaa tagtctccac accccccac 6240  
 tatcaccgtg agttgtccgc acgcaccgca cgtctcgag ccaaaaaaaaaaaaagaaag 6300  
 aaaaaaaaaa aaaagaaaaa acagcaggtg ggtccgggtc gtggggggccg gaaacgcgag 6360  
 gaggatcgcg agccagcgac gaggccggcc ctccctccgc ttccaaagaa acgccccca 6420  
 tcgccactat atacataccc cccctctcc tccatcccc ccaaccctac caccaccacc 6480  
 accaccacct ccacctctc cccctcgtc gccggacgac gagctctcc cccctcccc 6540  
 tccgcgcgcg ccgcgcgggt aaccacccc cccctctct ctttctttct ccgtttttt 6600  
 tttcgtctc ggtctcgatc tttggccttg gtagtttggg tgggcgagag gcggttctg 6660  
 gcgcgccag atcggtgccg gggagggcg gtagctcgcg gctggggctc tcgcggcgt 6720

# ES 2 459 369 T3

```

ggatccggcc cggatctcgc ggggaatggg gctctcggat gtagatctgc gatccgccgt 6780
tgttggggga gatgatgggg ggtttaaagt ttccgccatg ctaaacaaga tcaggaagag 6840
gggaaaagg cactatggtt tatattttta tatatttctg ctgcttcgtc aggcttagat 6900
gtgctagatc tttctttctt ctttttggg gtagaatttg aatccctcag cattgttcat 6960
cggtagtttt tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct cgtgaggagc tttttttag 7020
gtagaccgcg ggatatcaca agtttgtaca aaaaagctga acgagaaaac taaaatgata 7080
taaatatcaa tatattaaat tagattttgc ataaaaaca gactacataa tactgtaaaa 7140
cacaacatat ccagtcacta tggcggccgc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc 7200
ttccggctcg tataatgtgt ggattttgag ttaggatccg tcgagatttt caggagctaa 7260
ggaagctaaa atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca 7320
tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt 7380
tcagctggat attacgcct ttttaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc 7440
ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat 7500
gaaagaccgt gagctggtga tatgggatag tgttcaccct tgttacaccg tttccatga 7560
gcaaactgaa acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct 7620
acacatatat tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaaac ctggcctatt tcctaaagg 7680
gtttattgag aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga 7740
tttaaaccgt gccaatatgg acaacttctt cgccccggtt ttcaacctgg gcaaatatta 7800
tacgcaaggc gacaagggtc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga 7860
tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcatg agtggcaggg 7920
cggggcgtaa acgcgtggat ccggcttact aaaagccaga taacagtatg cgtatttgcg 7980
cgctgatttt tgcggtataa gaatatatac tgatatgtat accogaagta tgtcaaaaag 8040
aggtatgcta tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca gcgacagcta tcagttgctc 8100
aaggcatata tgatgtcaat atctccggtc tggtaagcac aacctgcag aatgaagccc 8160
gtcgtctcgc tgccgaaccg tggaaagcgg aaaatcagga agggatggct gaggtogccc 8220
ggtttattga aatgaaccgc tcttttctg acgagaaacag gggctggtga aatgcagttt 8280
aaggtttaca cctataaaag agagagccgt tatcgtctgt ttgtggatgt acagagtgat 8340
attattgaca cccccggcg acggatggtg atccccctgg ccagtgacag tctgctgtca 8400
gataaagtct cccgtgaact ttaccgggtg gtgcatatcg gggatgaaag ctggcgcag 8460
atgaccaccg atatggccag tgtgccggtc tccgttatcg ggaagaagt ggctgatctc 8520
agccaccgcg aaaatgacat caaaaacgcc attaacctga tgttctgggg aatataaatg 8580

```

ES 2 459 369 T3

tcaggctccc ttatacacag ccagctctgca ggtogacat agtgactgga tatgttgtgt 8640  
 tttacagtat tatgtagtct gttttttatg caaaatctaa tttaatatat tgatatttat 8700  
 atcattttac gtttctcggt cagctttctt gtacaaagtg gtgatgggga tccccaccc 8760  
 tgcaatgtga ccctagactt gtccatcttc tggattggcc aacttaatta atgtatgaaa 8820  
 taaaggatg cacacatagt gacatgctaa tcactataat gtgggcatca aagttgtgtg 8880  
 ttatgtgtaa ttactaatta tctgaataag agaaagagat catccatatt tcttatccta 8940  
 aatgaatgtc acgtgtcttt ataattcttt gatgaaccag atgcatttta ttaaccaatt 9000  
 ccatatacat ataaatatta atcatatata attaatatca attgggtag caaaacaaat 9060  
 ctagtctagg tgtgttttgc taattattgg gggatagtgc aaaaagaaat ctacgttctc 9120  
 aataattcag atagaaaact taataaagtg agataattta catagattgc ttttatcctt 9180  
 tgatatatgt gaaaccatgc atgatataag gaaaatagat agagaaataa tttttacat 9240  
 cgttgaatat gtaaacaatt taattcaaga agctaggaat ataaatattg aggagttat 9300  
 gattattatt attattttga tgttcaatga agttttttt aatttcatat gaagtataca 9360  
 aaaattcttc atagattttt gtttctatgc cgtagttatc tttaatatat ttgtggttga 9420  
 agaaatttat tgctagaaac gaatggattg tcaattttt tttaaagcaa atatatatga 9480  
 aattatactg tatattattt tagtcatgat taaaatgtgg ccttaattga atcatcttc 9540  
 tcattcatth tttcaaaagc atatcaggat gattgatatt tatctatttt aaaaattaat 9600  
 ttaagggttc aaattaaatt taacttaaaa gtgtcctaac cgtagttaa ggtttacttt 9660  
 aaaaaaatac tatgaaaaat ctaatcttct atgaatcgac ctgcaggatt taaatccatc 9720  
 gttctggggc ctaacggggc aagcttt 9747

<210> 11

<211> 1023

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> promotor

10 <400> 11

Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala  
 20 25 30

Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly

ES 2 459 369 T3

35 40 45

Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Gly Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala  
50 55 60

Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys Thr Cys Thr Thr Ala Gly Cys Thr  
65 70 75 80

Thr Thr Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr  
85 90 95

Thr Gly Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr  
100 105 110

Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ala  
115 120 125

Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala  
130 135 140

Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Cys  
145 150 155 160

Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr  
165 170 175

Thr Ala Cys Cys Cys Thr Ala Gly Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala  
180 185 190

Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr  
195 200 205

Thr Gly Cys Thr Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala  
210 215 220

Thr Gly Thr Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala Ala  
225 230 235 240

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Ala Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala  
245 250 255

Gly Cys Thr Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr  
260 265 270

Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr  
275 280 285

ES 2 459 369 T3

Cys Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr Thr Thr Thr Ala  
 290 295 300

Ala Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr  
 305 310 315 320

Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 325 330 335

Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ala Gly Thr Thr Thr Ala Gly Thr Ala Thr  
 340 345 350

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala  
 355 360 365

Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Cys  
 370 375 380

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly  
 385 390 395 400

Ala Thr Cys Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys  
 405 410 415

Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Cys Thr  
 420 425 430

Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Thr Cys Thr Ala Gly Thr  
 435 440 445

Thr Thr Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala  
 450 455 460

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Thr Ala  
 465 470 475 480

Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala  
 485 490 495

Gly Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ala Cys Thr Ala  
 500 505 510

Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Gly  
 515 520 525

ES 2 459 369 T3

Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Thr Ala Gly Cys Cys Ala Cys Thr  
530 535 540

Cys Gly Thr Ala Cys Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala  
545 550 555 560

Ala Gly Cys Gly Cys Thr Ala Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly  
565 570 575

Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly  
580 585 590

Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala  
595 600 605

Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Ala  
610 615 620

Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly Gly Ala Gly  
625 630 635 640

Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Gly Gly Thr  
645 650 655

Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Thr Thr Cys Ala Cys Gly Ala Ala Thr  
660 665 670

Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly  
675 680 685

Gly Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys  
690 695 700

Cys Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly  
705 710 715 720

Thr Cys Cys Gly Gly Gly Ala Thr Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Gly  
725 730 735

Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Ala Thr Ala Gly Gly  
740 745 750

Gly Gly Cys Gly Cys Gly Thr Gly Thr Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys  
755 760 765

ES 2 459 369 T3

Gly Thr Cys Gly Cys Gly Cys Cys Cys Cys Ala Cys Gly Gly Ala Thr  
 770 775 780

Gly Gly Thr Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Gly  
 785 790 795 800

Cys Ala Thr Thr Cys Cys Gly Cys Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala  
 805 810 815

Thr Thr Cys Ala Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Gly Cys Cys Thr Cys  
 820 825 830

Thr Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Thr Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala  
 835 840 845

Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Ala Cys Ala Cys  
 850 855 860

Ala Cys Cys Cys Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys  
 865 870 875 880

Cys Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly Ala Cys  
 885 890 895

Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Gly Gly Gly Gly  
 900 905 910

Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Gly Thr Ala Gly Thr Ala Ala Gly Cys  
 915 920 925

Ala Gly Cys Thr Cys Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys  
 930 935 940

Thr Cys Cys Cys Cys Thr Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Ala Thr  
 945 950 955 960

Gly Ala Thr Cys Gly Thr Cys Gly Ala Ala Cys Cys Cys Ala Thr Cys  
 965 970 975

Gly Ala Gly Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr  
 980 985 990

Cys Ala Cys Cys Gly Cys Gly Gly Gly Cys Gly Cys Gly Ala Thr Thr  
 995 1000 1005

Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Gly  
 1010 1015 1020

<210> 12

5 <211> 804

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 459 369 T3

<220>

<223> elemento

<400> 12

5

```
accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa      60
tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt aactctgaa      120
atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaaat atagggacat      180
ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct      240
tagcggattt tatttaagca catgttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct      300
gttaatttag gcacaggctt catactacat gggccaatag tatagggatt catattatag      360
gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc      420
tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaata tgtaaacgcc tgaaggaata aatataaatg      480
acgaaatfff gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca      540
cttgttttaa atattgttgt ctgaagaaat aagtactgac agtatattga tgcattgatc      600
tgcttgtttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc ctttttgttg ctctccttac      660
ctcctgatgg tatctagtat ctaccaactg aactatatt gcttctcttt acatacgtat      720
cttgctcgat gccttctccc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt      780
cattgtaatg cagataccaa gcgg                                     804
```

<210> 13

<211> 9754

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> vector

15

<400> 13

```
gatggggatc agattgtcgt ttccgcctt cagtttaaac tatcagtgtt tgacaggata      60
tattggcggg taaacctaaag agaaaagagc gtttattaga ataatcggat atttaaaagg      120
gcgtgaaaag gtttatccgt tcgtccattt gtatgtgcat gccaacccaca gggttccoct      180
cgggagtgct tggcattccg.tgcgataatg acttctgttc aaccacccaa acgtcggaaa      240
gcctgacgac ggagcagcat tccaaaaaga tcccttggct cgtctgggtc ggctagaagg      300
tcgagtgggc tgctgtggct tgatccctca acgcggtcgc ggacgtagcg cagcgcggaa      360
```



# ES 2 459 369 T3

aaatcctcga	tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	gggggatcat	420
gtaactcgcc	ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	480
gacaccacga	tgctgcagc	atctaacgct	tgagttaagc	cgcgccgca	agcggcgtcg	540
gcttgaacga	attgtagac	attatgtgcc	gactaccttg	gtgatctcgc	ctttcacgta	600
gtgaacaaat	tcttccaact	gatctgcgcg	cgaggccaag	cgatcttctt	gtccaagata	660
agcctgccta	gcttcaagta	tgacgggctg	atactgggcc	ggcaggcgt	ccattgccca	720
gtcggcagcg	acatccttcg	gcgcgatfff	gccggttact	gcgctgtacc	aaatgcggga	780
caacgtaagc	actacatttc	gctcatcgcc	agcccagtcg	ggcggcgagt	tccatagcgt	840
taaggtttca	tttagcgct	caaatagatc	ctgttcagga	accggatcaa	agagttcctc	900
cgccgctgga	cctaccaagg	caacgctatg	ttctcttgct	tttgtcagca	agatagccag	960
atcaatgtcg	atcgtggctg	gctcgaagat	acctgcaaga	atgtcattgc	gctgccattc	1020
tccaaattgc	agttcgcgct	tagctggata	acgccacgga	atgatgtcgt	cgtgcacaac	1080
aatggtgact	tctacagcgc	ggagaatctc	gctctctcca	ggggaagccg	aagtttcaa	1140
aaggctggtg	atcaaagctc	gccgcgttgt	ttcatcaagc	cttacggtca	ccgtaaccag	1200
caaatcaata	tcactgtgtg	gcttcaggcc	gccatccact	gcgagccgt	acaaatgtac	1260
ggccagcaac	gtcggttcga	gatggcgctc	gatgacgcca	actacctctg	atagttgagt	1320
cgatacttcg	gcgatcaccg	cttccctcat	gatgtttaac	tcctgaatta	agccgcgccg	1380
cgaagcggtg	tcggcttga	tgaattgtta	ggcgtcatcc	tgtgctcccg	acctgcagca	1440
atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	1500
caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gttgaggac	cacttctgcg	ctcggccctt	1560
ccggctggct	ggtttattgc	tgataaatct	ggagccggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	1620
attgcagcac	tggggcccaga	tgtaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	1680
agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	1740
aagcattggt	aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	1800
catttttaat	ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gacccaaatc	1860
ccttaacgtg	agttttcggt	ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	1920
tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	1980
ccagcggtag	tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	2040
ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	2100
ttcaagaact	ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgtctctc	taatcctggt	accagtggct	2160

ES 2 459 369 T3

gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat 2220  
aaggcgagc ggtcgggctg aacggggggt tegtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 2280  
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggccac gcttcccga 2340  
gggagaaagg cggacaggta tccggtaaag ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 2400  
gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctctg tgggtttctg ccacctctga 2460  
cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 2520  
aacggggcct ttttaagggt cctggccttt tgctggcctt ttgctccat gttctttcct 2580  
gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct 2640  
cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgagcg aggaagcggga agagcgcctg 2700  
atggcgtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatctcac accgcatatg gtgcactctc 2760  
agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg 2820  
actgggtcat ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt 2880  
gtctgctccc ggcacccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc 2940  
agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt 3000  
ggtcgtgaag cgattcacag atgtctgctt gttcatccgc gtccagctcg ttgagttct 3060  
ccagaagcgt taatgtctgg cttctgataa agcgggcat gttaagggcg gtttttct 3120  
gtttggtcac tgatgcctcc gtgtaagggg gatttctgtt catgggggta atgataccga 3180  
tgaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg 3240  
aacgttgtga gggtaaaaaa ctggcgggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc 3300  
agggtcaatg ccagcgcttc gttataacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc 3360  
atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcaggcgc tgacttccgc gttccagac 3420  
ttacgaaac acgaaaaccg aagaccattc atgttgttgc tcaggtcgca gacgttttgc 3480  
agcagcagtc gcttcacggt cgctcgcgta tcggtgatc attctgctaa ccagtaaggc 3540  
aaccccgcca gcctagccgg gtccctcaacg acaggagcac gatcatgcgc acccgtggcc 3600  
aggaccaac gctgcccag atgcgcccgc tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg 3660  
atatgttctg ccaaggggtg gtttgccat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc 3720  
caattcttg agtggtgaat ccgttagcga ggtgccgccc gcttccattc aggtcgaggt 3780  
ggcccgctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcgccgcc 3840  
tacaatccat gccaaaccgt tccatgtgct cgccgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat 3900  
cagcgggtca atgatcgaag ttaggctggt aagagccgcg agcgtcctt gaagctgtcc 3960  
ctgatggctg tcatctacct gcctggacag catggcctgc aacggggca tcccgatgcc 4020

# ES 2 459 369 T3

```

gccggaagcg agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgctc cgaacgccag 4080
caagacgtag cccagcgcgt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgcgcaa 4140
acgtttggtg gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac 4200
cgcaagcgac aggccgatca tcgtcgcgct ccagcgaaaag cggtcctcgc cgaaaatgac 4260
ccagagcgct gccggcacct gtcttacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc 4320
ggcgacgata gtcatgcccc gcgcccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa 4380
gggcatcggc cgatcgaccc tttccgacgc tcaccgggct ggttgccctc gccgctgggc 4440
tgggggccgt ctatggccct gcaaacgcgc cagaaacgcc gtcgaagccg tgtgcgagac 4500
accgcggccg gcgcggcggt ttgtggatac ctgcgggaaa acttggccct cactgacaga 4560
tgaggggocg acgttgacac ttgaggggcc gactcaccgc gcgcggcggt gacagatgag 4620
gggcaggctc gatttcggcc ggcgacgtgg agctggccag cctcgcgaaat cggcgaaaac 4680
gcctgatttt acgcgagttt cccacagatg atgtggacaa gcctggggat aagtgccttg 4740
cggatttgac acttgagggg cgcgactact gacagatgag gggcgcgatc cttgacactt 4800
gaggggcaga gtgctgacag atgaggggoc cacctattga catttgaggg gctgtccaca 4860
ggcagaaaat ccagcatttg caagggttcc cgcccgtttt tcggccaccg ctaacctgtc 4920
ttttaacctg cttttaaac aatatttata aaccttgttt ttaaccaggg ctgcgccttg 4980
tgcgcgtgac cgcgcacgcc gaaggggggt gccccccctt ctggaacct cccggcccgc 5040
taaocggggc ctcccatccc cccaggggct gcgcccctcg gcccggaacg gcctcaccce 5100
aaaaatggca gccaaagctag gaaaagtccc atgtggatca ctccgttgcc ccgtcgtcga 5160
ccgtgttggg gggaaaggtgc acatggctca gttctcaatg gaaattatct gcctaaccgg 5220
ctcagttctg cgtagaaaacc aacatgcaag ctccaccggg tgcaaaagcg cagcggcggc 5280
aggatatatt caattgtaaa tggcttcatg tccgggaaat ctacatggat cagcaatgag 5340
tatgatggtc aatatggaga aaaagaaaga gtaattacca atttttttc aattcaaaaa 5400
tgtagatgtc cgcagcgtta ttataaatg aaagtacatt ttgataaac gacaaattac 5460
gatccgtcgt atttataggc gaaagcaata aacaaattat tctaattcgg aaatctttat 5520
ttcgacgtgt ctacattcac gtccaaatgg gggcttagat gagaaaactc acgatcgatg 5580
cggccaccac tcgagaagct tactagtcaa caattggcca atctttgttc taaattgcta 5640
ataaacgacc atttccgtca attctccttg gttgcaacag tctaccgctc aaatgtttac 5700
taatttataa gtgtgaagtt tgaattatga aagacgaaat cgtattaaaa attcacaaga 5760
ataaacaact ccatagattt tcaaaaaaac agtcacgaga aaaaaaccac agtccgtttg 5820

```

# ES 2 459 369 T3

```

tctgctcttc tagtttttat tatttttcta ttaatagttt tttgttattt cgagaataaa 5880
at ttgaaoga tgtccgaacc acaaaagccg agccgataaa tctaagccg agcctaactt 5940
tagccgtaac catcagtcac ggctcccggg ctaattcatt tgaaccgaat cataatcaac 6000
ggtttagatc aaactcaaaa caatctaacg gcaacataga cgcgtcgggtg agctaaaaag 6060
agtgtgaaag ccaggtcacc atagcattgt ctctcccaga ttttttattt gggaaataat 6120
agaagaaata gaaaaaata aaagagttag aaaaatcgta gagctatata ttgcacatg 6180
tactcgtttc gctttcctta gtgttagctg ctgccgctgt tgtttctcct ccatttctct 6240
atctttctct ctgcgtgctt ctggaatctt ctgtatcacc ttcttcttct tcaaggtgag 6300
tctctagatc cgttgccttg attttgctgc togttagtgc ttattggtga ttctctatgc 6360
cgatttcgct agatctgttt agcatgcggt gtggttttat gagaaaatct ttgttttggg 6420
ggttgctgtg tatgtgattc gatccgtgct tgttggtatc atctgagcta attcttaagg 6480
tttatgtgtt agatctatgg agtttgagga ttcttctcgc ttctgtcgat ctctcgtgt 6540
Latttttggt tlllccagtg aagtgaagtt glltagttcg aaatgacttc gtglalgtc 6600
gattgatctg gtttaaatct tcgatctgtt aggtgttgat gtttacaagt gaattctagt 6660
gttttctcgt tgagatctgt gaagttgaa cctagttttc tcaataatca acatatgaag 6720
cgatgtttga gtttcaataa acgctgctaa tcttcgaaac taagttgtga tctgattcgt 6780
gtttacttca tgagcttacc caattcattt cggtttcatt ttactttttt tttagtgaac 6840
catggcgcaa gttagcagaa tctgcaatgg tgtgcagAAC ccatctctta tctccaatct 6900
ctgaaatcc agtcaacgca aatctccctt atcggtttct ctgaagaacc agcagatcc 6960
acgagcttat ccgatttctg ctgcgtgggg attgaagaag agtgggatga cgttaattgg 7020
ctctgagctt cgtcctctta aggtcatgtc ttctgtttcc acggcgtgca tgcttcatgg 7080
agcttcatct aggccagcta ctgccaggaa gtctagcggg ctgagtgga ccgtgcgat 7140
ccctggcgat aaaagtattt cacacaggag ctctatgttc ggaggacttg ctagtggaga 7200
gacgagaatc actggtttgc ttgagggcga agatgttacc aacaccggtg aggcgatgca 7260
agcaatgggt gccagaatcc gaaaagaggg cgatacgtgg atcatcgacg gtgttggtaa 7320
cggaggattg ctgcctccc aagcgcact tgactttggg aacgcagcta cggggtgccg 7380
tcttactatg ggactggtag gcgtgatga ctttgactct accttcatcg gtgacgag 7440
cctcactaag agaccaatgg gacgagtgtc gaatcccctg agggagatgg gtgtccaggt 7500
gaaatctgag gatggtgatc gtcttccggt tactctgcga ggccccaga cccccagcc 7560
aatcacgtac aggtttccga tggcgtcagc acaggtcaag tcagcgttac tctggcggg 7620
cctcaacaca cctggaatca caaccgtgat tgaaccatc atgactagag acccacgga 7680

```

ES 2 459 369 T3

gaagatggtg caggggttcg gcgctaactc aacggtcgaa accgacgccg acggcgtgag 7740  
 gacaatccgc ttggagggca gaggtaaact gactggccaa gtcacgatg tgccctggaga 7800  
 tccctcgtcc acagcgttcc ccctcgtagc tgcgttgctc gtccttgat ctgatgtgac 7860  
 gatcctgaat gtcctcatga atccaactag aaccggcctc atcctcacat tgcaggagat 7920  
 gggtgctgac atcgaggtta tcaatcctag gttggcaggt ggagaggatg tggccgatct 7980  
 gcgcgctgct tctagtagac tcaaaggcgt gaccgtccct gaggatcgcg ctccatccat 8040  
 gatcgacgag taccattc tcgccgttgc tgetgcttt gccgagggcg caactgtaat 8100  
 gaacggcctt gaggagtga gggtaagga gagtgacagg ctgtccgcgg tggcgaatgg 8160  
 cctgaagcta aacggcgtgg actgcgacga aggtgaaacg tccctgtag tccgtggtcg 8220  
 ccagacggg aaggggttg ggaatgctc gggagctgct gtggcgacgc acctgatca 8280  
 tagaatcgc atgtcattc tggatgagg acttgctcc gagaatccg tgaccgtga 8340  
 cgatgctacc atgatcgca cctccttcc tgagttcatg gacctcatg caggcttggg 8400  
 ggccaagatc gagctgtctg atactaaggc cgcttgaatt cccgatcgtt caaacattg 8460  
 gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgcggctctt gcgatgatta tcatataatt 8520  
 tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcacgatg tatttatgag 8580  
 atgggttttt atgattagag tcccgaatt atacattaa tacgcgatag aaaacaaaat 8640  
 atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcgggtca tctatgttac tagatcgggg 8700  
 atcccacgtg cggaccgct gcaggccgcg ttatcaagct aactgcaggc cggatgtgag 8760  
 acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgcc agctatctgt 8820  
 cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat 8880  
 aaaggaaaag ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccca 8940  
 ccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaa gcaagtggat 9000  
 tgatgtgatg gtccgattga gacttttcaa caaaggtaa tatccgaaa cctcctcgga 9060  
 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 9120  
 tacaatgcc atcattgca taaaggaaag gccatcgtt aagatgcctc tgccgacagt 9180  
 ggtcccaaag atggaccccc acccagagg agcatcgtg aaaaagaaga cgttccaacc 9240  
 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctcactg acgtaagga tgacgcacaa 9300  
 tcccactatc cttcgcaaga cccttctct atataaggaa gttcatttca tttggagagg 9360  
 accaggtggt accggcgcgc caggcctggt agtctgatta attaagcgt cgcgggcct 9420  
 gatcacctgt cgtacagtat ttctacattt gatgtgtgat ttgtgaagaa catcaacaa 9480  
 aacaagcact ggctttaata tgatgataag tattatggtg attaattaat tggcaaaaac 9540  
 aacaatgaag ctaaaatatt atttattgag ccttgcggtt aatttctgt gatgatcttt 9600  
 ttttttattt tctaattata tatagtttcc tttgctttga aatgctaaag gtttgagaga 9660  
 gttatgctct tttttctc ctctttctt ttaacttta tcatacaaat tttgaataaa 9720  
 aatgtgagta cattgagctc atttaataa gctt 9754

# ES 2 459 369 T3

<210> 14

<211> 1696

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> elemento

<400> 14

```

caaatttatt atgtgttttt ttccgtggt cgagattgtg tattattcct tagttattac      60
aagactttta gctaaaattt gaaagaattt actttaagaa aatcttaaca tctgagataa     120
tttcagcaat agattatatt ttccattact ctagcagtat ttttgagat caatcgcaac     180
atatatgggt gttagaaaaa atgcactata tatatatata ttattttttc aattaaagt     240
gcatgatata taatatatat atatatatat atgtgtgtgt gtatatggtc aaagaaattc     300
ttatacaaat atacacgaac acatatattt gacaaaatca aagtattaca ctaaacaatg     360
agttgggtgca tggccaaaac aaatatgtag attaaaaatt ccagcctcca aaaaaaatc     420
caagtgttgt aaagcattat atatatatag tagatcccaa atttttgtac aattccacac     480
tgatcgaatt tttaaagttg aatatctgac gtaggatttt tttaatgtct tacctgacca     540
tttactaata acattcatac gttttcattt gaaatatcct ctataattat attgaatttg     600
gcacataata agaaacctaa ttggtgattt attttactag taaatttctg gtgatgggct     660
ttctactaga aagctctcgg aaaatcttgg accaaatcca tattccatga cttcgattgt     720
taaccctatt agttttcaca aacatactat caatatcatt gcaacggaaa aggtacaagt     780
aaaacattca atccgatagg gaagtgatgt aggaggttgg gaagacaggc ccagaaagag     840
atztatctga cttgttttgt gtatagtttt caatgttcat aaaggaagat ggagacttga     900
gaagtttttt ttggactttg tttagctttg ttgggcgctt ttttttttga tcaataactt     960
tgttgggctt atgatttgta atattttcgt ggactcttta gtttatttag acgtgctaac    1020
tttgttgggc ttatgacttg ttgtaacata ttgtaacaga tgacttgatg tgcgactaat    1080
ctttacacat taaacatagt tctgtttttt gaaagttcct attttcattt ttatttgaat    1140
gttatatatt tttctatatt tataattcta gtaaaaggca aattttgctt ttaaatgaaa    1200
aaaatatata ttccacagtt tcacctaatc ttatgcattt agcagtacaa attcaaaaat    1260

```

10

ES 2 459 369 T3

ttcccatttt tattcatgaa tcataccatt atatattaac taaatccaag gtaaaaaaaaa 1320  
 ggtatgaaag ctctatagta agtaaaatat aaattcccca taaggaaagg gccaaagtcca 1380  
 ccaggcaagt aaaatgagca agcaccactc caccatcaca caatttctact catagataac 1440  
 gataagattc atggaattat ctccacgtg gcattattcc agcgggtcaa gccgataagg 1500  
 gtctcaacac ctctccttag gcctttgtgg cggttaccaa gtaaaattaa cctcacacat 1560  
 atccacactc aaaatccaac ggtgtagatc ctagtccact tgaatctcat gtatcctaga 1620  
 ccctccgatc actccaaagc ttgttctcat tgttgttatc attatatata gatgacccaa 1680  
 gcactagacc aaacct 1696

<210> 15

<211> 1696

5

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 15

caaatttatt atgtgttttt ttccogtggc cgagattgtg tattattctt tagttattac 60  
 aagactttta gctaaaattt gaaagaattt actttaagaa aatcttaaca tctgagataa 120  
 ttccagcaat agattatatt ttccattact ctagcagtat ttttgagat caatcgcaac 180  
 atatatgggt gttagaaaaa atgcactata tatatatata ttattttttc aattaaagt 240  
 gcatgatata taatatatat atatatatat atgtgtgtgt gtatatggtc aaagaaattc 300  
 ttatacaaat atacacgaac acatatattt gacaaaatca aagtattaca ctaaacaatg 360  
 agttgggtgca tggccaaaac aaatatgtag attaaaaatt ccagcctcca aaaaaaatc 420  
 caagtgttgt aaagcattat atatatatag tagatcccaa atttttgtac aattccacac 480  
 tgatcgaatt tttaaagttg aatatctgac gtaggatttt tttaatgtct tacctgacca 540  
 ttactaata acattcatac gttttcattt gaaatatcct ctataattat attgaatttg 600  
 gcacataata agaaacctaa ttggtgattt attttactag taaatttctg gtgatgggct 660  
 ttctactaga aagctctcgg aaaatcttgg accaaatcca tattccatga ctccgattgt 720  
 taaccctatt agttttcaca aacatactat caatatcatt gcaacggaaa aggtacaagt 780  
 aaaacattca atccgatagg gaagtgatgt aggaggttgg gaagacaggc ccagaaagag 840  
 atttatctga cttgttttgt gtatagtttt caatgttcat aaaggaagat ggagacttga 900  
 gaagtttttt ttggactttg tttagctttg ttgggcgttt ttttttttga tcaataactt 960  
 tgttgggctt atgatttgta atattttcgt ggactcttta gtttatttag acgtgctaac 1020  
 tttgttgggc ttatgacttg ttgtaacata ttgtaacaga tgacttgatg tgcgactaat 1080  
 ctttacacat taaacatagt tctgtttttt gaaagttctt attttcattt ttatttgaat 1140

10

## ES 2 459 369 T3

gttatatatt	tttctatatt	tataattcta	gtaaaaggca	aattttgctt	ttaaataaaa	1200
aaaatatata	ttccacagtt	tcacctaate	ttatgcattt	agcagtacaa	attcaaaaat	1260
ttcccatttt	tattcatgaa	tcataaccatt	atatattaac	taaatccaag	gtaaaaaaaa	1320
ggtatgaaag	ctctatagta	agtaaaatat	aaattcccca	taaggaaagg	gccaagtcca	1380
ccaggcaagt	aaaatgagca	agcaccactc	caccatcaca	caatttcact	catagataac	1440
gataagattc	atggaattat	cttccacgtg	gcattattcc	agcggttcaa	gccgataagg	1500
gtctcaacac	ctctccttag	gcctttgtgg	ccgttaccaa	gtaaaattaa	cctcacacat	1560
atccacactc	aaaatccaac	ggtgtagatc	ctagtccact	tgaatctcat	gtatcctaga	1620
ccctccgatc	actccaaagc	ttgttctcat	tggtgttata	attatatata	gatgaccaa	1680
gcactagacc	aaacct					1696



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una célula vegetal de maíz que tiene establemente integrada en su genoma un ADN recombinante que comprende un promotor que es funcional en células vegetales y que está operativamente ligado a ADN que codifica una proteína que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos el 90 % con respecto a la longitud completa de SEC ID N°: 5, en la que una planta de maíz que comprende dicha célula vegetal de maíz presenta un rendimiento potenciado con respecto a plantas de control que no tienen dicho ADN recombinante, y en la que dicha célula vegetal es obtenible por selección de una población de células vegetales con dicho ADN recombinante seleccionando plantas que son regeneradas de células vegetales en dicha población para un rendimiento potenciado con respecto a plantas de control que no tienen dicho ADN recombinante.
- 10 2. La célula vegetal de maíz de la reivindicación 1, en la que dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5.
3. La célula vegetal de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además ADN que expresa una proteína que proporciona tolerancia a la exposición a un herbicida aplicado a niveles que son letales para un tipo natural de dicha célula vegetal.
- 15 4. La célula vegetal de la reivindicación 3, en la que el agente de dicho herbicida es un compuesto de glifosato, dicamba o glufosinato.
5. La célula vegetal de maíz de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína comprende un dominio de caja homeótica y un dominio HALZ.
6. Una planta de maíz transgénico o una semilla de maíz transgénico que comprende una pluralidad de la célula vegetal de la reivindicación 1 ó 2.
- 20 7. La planta de maíz transgénico de la reivindicación 6, que es homocigótica para dicho ADN recombinante.
8. La semilla de maíz transgénica de la reivindicación 6, que es una semilla de maíz transgénica no natural que puede producir plantas de maíz que son resistentes a enfermedad del virus del Mal de Río Cuarto o el hongo *Puccinia sorghi* o ambos.
9. La planta de maíz de la reivindicación 6, en la que dicha proteína comprende un dominio de caja homeótica y un dominio HALZ.
- 25 10. Un grano de polen transgénico que comprende un derivado haploide de una célula vegetal de la reivindicación 1 ó 2 y que comprende el ADN recombinante como se menciona en la reivindicación 1 ó 2.
11. Un procedimiento para fabricar semilla transgénica no natural de una planta de maíz que puede usarse para producir una planta de maíz transgénico de la reivindicación 6, comprendiendo dicho procedimiento para fabricar dicha semilla:
  - 30 (a) seleccionar una población de plantas para dicho rendimiento potenciado y dicho ADN recombinante, en la que plantas individuales en dicha población pueden presentar dicho rasgo a un nivel inferior a, esencialmente el mismo que, o superior al nivel al que, dicho rasgo se presenta en plantas de control que no expresan el ADN recombinante,
  - (b) seleccionar de dicha población una o más plantas que presentan el rasgo a un nivel superior al nivel al que dicho rasgo es presentado en plantas de control,
  - 35 (c) verificar que dicho ADN recombinante está integrado establemente en dichas plantas seleccionadas,
  - (d) analizar tejido de una planta seleccionada para determinar la producción de una proteína que tiene la función de una proteína codificada por nucleótidos en una secuencia de una de SEC ID N°: 1; y
  - (e) recoger semilla de una planta seleccionada.
12. Un procedimiento de la reivindicación 11, en el que
  - 40 (i) plantas en dicha población comprenden además ADN que expresa una proteína que proporciona tolerancia a la exposición a un herbicida aplicado a niveles que son letales para células de plantas naturales, y en el que dicha selección se efectúa tratando dicha población con dicho herbicida, preferentemente dicho herbicida comprende un compuesto de glifosato, dicamba o glufosinato; o
  - (ii) dicha selección se efectúa identificando plantas con dicho rasgo potenciado.
- 45 13. Una semilla de maíz híbrido que comprende una pluralidad de la célula vegetal de la reivindicación 1 ó 2, obtenible mediante un procedimiento que comprende:

- (a) adquirir semilla de maíz híbrido de una planta de maíz tolerante a herbicida de la reivindicación 6;
- 5 (b) producir plantas de maíz a partir de dicha semilla de maíz híbrido, en la que una fracción de las plantas producidas a partir de dicha semilla de maíz híbrido es homocigótica para dicho ADN recombinante, una fracción de las plantas producidas a partir de dicha semilla de maíz híbrido es hemicigótica para dicho ADN recombinante, y una fracción de las plantas producidas a partir de dicha semilla de maíz híbrido no tiene ninguno de dicho ADN recombinante;
- (c) seleccionar plantas de maíz que son homocigóticas y hemicigóticas para dicho ADN recombinante tratando con un herbicida;
- (d) recoger semilla de plantas de maíz supervivientes tratadas con herbicida y sembrar dicha semilla para producir adicionalmente plantas de progenie de maíz;
- 10 (e) repetir las etapas (c) y (d) al menos una vez para producir una línea endógama de maíz;
- (f) cruzar dicha línea endógama de maíz con una segunda línea de maíz para producir semilla híbrida.