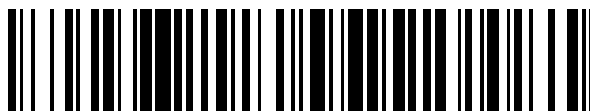


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 840**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007** **E 07809152 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2035560**

54 Título: **Delta-5 desaturasa y su uso para fabricar ácidos grasos poliinsaturados**

30 Prioridad:

17.05.2006 US 801172 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2014

73 Titular/es:

**E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US**

72 Inventor/es:

**DAMUDE, HOWARD G. y
ZHU, QUINN QUN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 474 840 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

Delta-5 desaturasa y su uso para fabricar ácidos grasos poliinsaturados

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la biotecnología. De modo más específico, esta invención se refiere a la identificación de fragmentos de ácidos nucleicos que codifican una enzima delta-5 ácido graso desaturasa y al uso de esta desaturasa para fabricar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA).

Antecedentes de la invención

10 La importancia de los PUFA es indiscutible. Por ejemplo, ciertos PUFA son importantes componentes biológicos de las células sanas y son reconocidos como ácidos grasos "esenciales" que no pueden ser sintetizados *de novo* en mamíferos, sino que deben obtenerse de la dieta o derivarse por la posterior desaturación y alargamiento del ácido linoleico (LA; 18:2 omega-6) o del ácido alfa-linolénico (ALA; 18:3 omega-3); son constituyentes de las membranas plasmáticas de las células, en las que pueden encontrarse en formas tales como fosfolípidos o triacilgliceroles; son necesarios para el desarrollo correcto (en particular, en el cerebro de los niños en desarrollo) y para la formación y reparación de los tejidos; y son precursores para varios eicosanoides biológicamente activos de importancia en mamíferos (por ejemplo, prostaciclina, eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas). Además, una alta ingesta de PUFA omega-3 de cadena larga produce efectos protectores cardiovasculares (Dyerberg, J. *et al.*, Amer. J. Chin. Nutr., 28:958-966 (1975); Dyerberg, J. *et al.*, Lancet, 2(8081):117-119 (15 de julio, 1978); Shimokawa, H., World Rev. Nutr. Diet, 88:100-108 (2001); von Schacky, C. y Dyerberg, J., World Rev. Nutr. Diet, 88:90-99 (2001)). Además, numerosos estudios diferentes documentan beneficios para la salud muy diversos conferidos por la administración de PUFA omega-3 y/u omega-6 contra una diversidad de síntomas y enfermedades (por ejemplo, asma, psoriasis, eccema, diabetes, cáncer).

25 Se están investigando una diversidad de diferentes hospedantes, que incluyen plantas, algas, hongos y levaduras, como medio para la producción comercial de PUFA. La ingeniería genética ha demostrado que las capacidades naturales de algunos hospedantes (incluso los que están limitados nativamente a la producción de ácidos grasos LA y ALA) pueden ser sustancialmente alteradas para conseguir una producción de alto nivel de diversos PUFA omega-3/omega-6 de cadena larga. Tanto si esto es el resultado de las capacidades naturales como de la tecnología recombinante, la producción de ácido araquidónico (ARA; 20:4 omega-6), ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 omega-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 omega-3) puede requerir la expresión de una delta-5 desaturasa.

30 La mayoría de las enzimas delta-5 desaturasa identificadas hasta la fecha tienen la capacidad principal de convertir el ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA; 20:3 omega-6) en ARA, con una actividad secundaria para convertir el ácido eicosatetraenoico (ETA; 20:4 omega-3) en EPA (siendo el DHA posteriormente sintetizado a partir de EPA después de una reacción con otra C20/22 elongasa y una delta-4 desaturasa). La delta-5 desaturasa desempeña un papel en la vía de la delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa (que se encuentra predominantemente en algas, musgos, hongos, nemátodos y seres humanos, y que se caracteriza por la producción de ácido gamma-linolénico (GLA; 18:3 omega-6) y/o ácido estearidónico (STA; 18:4 omega-3)) y la vía de delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa (que actúa en algunos organismos, tales como especies euglenoides, y que se caracteriza por la producción de ácido eicosadienoico (EDA; 20:2 omega-6) y/o ácido eicosatrienoico (ETra; 20:3 omega-3)) (figura 1).

35 Basándose en el papel que desempeñan las enzimas delta-5 desaturasas en la síntesis, por ejemplo, de ARA, EPA y DHA, se ha realizado un considerable esfuerzo para identificar y caracterizar estas enzimas a partir de diversas fuentes. Como tales, se han descrito numerosas delta-5 desaturasas en la bibliografía pública (por ejemplo, n.º de registro de GenBank AF199596, AF226273, AF320509, AB072976, AF489588, AJ510244, AF419297, AF07879, AF067654 y AB022097) y la bibliografía de patentes (por ejemplo, patentes de EEUU 5.972.664 y 6.075.183). Además, la solicitud provisional en tramitación junto con la presente de propiedad de los solicitantes n.º 60/801119 (presentada el 17 de mayo, 2006) describe secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para una enzima delta-5 desaturasa de *Peridium sp.* CCMP626, mientras que la solicitud provisional en tramitación junto con la presente de propiedad de los solicitantes n.º 60/915733 (BB1614) (presentada el 3 de mayo, 2007) describe secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para una enzima delta-5 desaturasa de *Euglena anabaena*.

Abbadi *et al.* (The Plant Cell, vol. 16, 2734-2748) describen la expresión en plantas transgénicas de Δ6 y Δ5 desaturasas y una Δ6 elongasa.

50 La presente invención se refiere a la identificación y el aislamiento de otros genes que codifican delta-5 desaturasas de *Euglena gracilis* que serían adecuados para la expresión heteróloga en una diversidad de organismos hospedantes para su uso en la producción de ácidos grasos omega-3/omega-6.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un polinucleótido aislado, que comprende:

55 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-5 desaturasa, en el que el

polipéptido tiene al menos 90%, 95% o 100% de identidad de aminoácidos, basada en el método de alineamiento Clustal W, cuando se compara con una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-5 desaturasa, en el que la secuencia de nucleótidos tiene al menos 90%, 95% o 100% de identidad de secuencia, basada en el método de alineamiento BLASTN, cuando se compara con una secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3;

(c) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a) o (b), en el que el complemento y la secuencia de nucleótidos están formados por el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

En una segunda realización, la invención se refiere a un gen quimérico que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención aislados unidos operablemente al menos a una secuencia reguladora.

En una tercera realización, la invención se refiere a una célula que comprende, en su genoma, el gen quimérico de la invención. Estas células pueden ser células vegetales o células de levadura.

En una cuarta realización, la invención se refiere a un método para transformar una célula, que comprende transformar una célula con un gen quimérico de la invención o un polinucleótido de la invención aislado, y seleccionar las células transformadas con el gen quimérico o el polinucleótido aislado.

En una quinta realización, la invención se refiere a una semilla transgénica que comprende, en su genoma, el gen quimérico de la invención o una semilla transgénica obtenida a partir de una planta fabricada mediante un método de la invención. En la presente se describen aceites o subproductos obtenidos a partir de dichas semillas transgénicas.

En una sexta realización, la invención se refiere a un método para fabricar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en una célula, que comprende:

(a) transformar una célula con el gen quimérico de la invención; y

(b) seleccionar las células transformadas que fabrican ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

En una séptima realización, la invención se refiere a un método para producir al menos un ácido graso poliinsaturado en una célula de una planta de semillas oleaginosas, que comprende:

(a) transformar una célula de una planta de semillas oleaginosas con un gen quimérico de la invención y al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una $C_{14/16}$ elongasa, una $C_{16/18}$ elongasa, una $C_{18/20}$ elongasa y una $C_{20/22}$ elongasa;

(b) regenerar una planta de semillas oleaginosas a partir de la célula transformada de la etapa (a); y

(c) seleccionar las semillas obtenidas a partir de las plantas de la etapa (b) que tienen un nivel alterado de ácidos grasos poliinsaturados, cuando se compara con el nivel en semillas obtenidas a partir de una planta de semillas oleaginosas no transformada.

También se describe un método para producir al menos un ácido graso poliinsaturado en una célula de una planta de semillas oleaginosas, que comprende:

(a) transformar una célula de una planta de semillas oleaginosas con una primera construcción de ADN recombinante que comprende un polinucleótido aislado que codifica al menos un polipéptido de delta-5 desaturasa, unido operablemente al menos a una secuencia reguladora y al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una $C_{14/16}$ elongasa, una $C_{16/18}$ elongasa, una $C_{18/20}$ elongasa y una $C_{20/22}$ elongasa;

(b) regenerar una planta de semillas oleaginosas a partir de la célula transformada de la etapa (a); y

(c) seleccionar las semillas obtenidas a partir de las plantas de la etapa (b) que tienen un nivel alterado de ácidos grasos poliinsaturados, cuando se compara con el nivel en semillas obtenidas a partir de una planta de semillas oleaginosas no transformada.

En una octava realización, la invención se refiere a una planta, preferiblemente una planta de semillas oleaginosas, que comprende la construcción recombinante de la invención. Las plantas de semillas oleaginosas adecuadas incluyen, pero no se limitan a soja, especies de *Brassica*, girasol, maíz, algodón, lino y cártamo.

En una novena realización, la invención se refiere a una planta de semillas oleaginosas que comprende el gen quimérico de la invención, y:

- 5 (b) al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa.

También se describe una planta de semillas oleaginosas, que comprende:

- 10 (a) una primera construcción de ADN recombinante que comprende un polinucleótido aislado que codifica al menos un polipéptido de delta-5 desaturasa, unido operablemente al menos a una secuencia reguladora; y

- 15 (b) al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa.

También son de interés las semillas transgénicas obtenidas a partir de dichas plantas de semillas oleaginosas. Se describe el aceite o los subproductos obtenidos a partir de estas semillas transgénicas, así como alimentos o piensos que incorporan dicho aceite. Un subproducto preferido es la lecitina.

- 20 En una décima realización, la invención se refiere a un alimento o un pienso que incorpora una semilla de la invención. También se describe un alimento o un pienso que comprende un ingrediente derivado del procesamiento de las semillas.

La invención se refiere también a un método para fabricar un alimento o un pienso para animales, que comprende: (a) procesar la semilla transgénica de la invención para obtener aceite, e incluir dicho aceite en dicho alimento o pienso; o (b) incluir la semilla transgénica de la invención en dicho alimento o pienso.

- 25 También se describen las plantas de la progenie obtenidas a partir de una planta fabricada mediante el método de la invención o una planta de semillas oleaginosas de la invención.

Breve descripción de los dibujos y las listas de secuencias

La figura 1 ilustra la vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6.

- 30 La figura 2 muestra un cromatograma del perfil de lípidos de un extracto de células de *Euglena gracilis* según se describe en el ejemplo 1.

La figura 3 muestra una porción de un alineamiento entre proteínas de delta-5 desaturasa y proteínas de delta-8 desaturasa utilizando un análisis Clustal W (programa MegAlign™ del software de DNASTAR).

La figura 4 representa gráficamente la relación entre SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 8 y 10, cada una de las cuales se relaciona con la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*.

- 35 La figura 5A ilustra la estrategia de clonación utilizada para la amplificación del gen de la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (EgD5). La figura 5B es un mapa del plásmido pZUF17, mientras que la figura 5C es un mapa del plásmido pDMW367. La figura 6 proporciona mapas de plásmidos para los siguientes: (A) pKUNF12T6E; (B) pEgD5S; y (C) pDMW369.

- 40 La figura 7 muestra una comparación de la secuencia de ADN del gen de la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (denominado "EgD5", SEQ ID NO:1) y el gen sintético (denominado "EgD5S", SEQ ID NO:3) con codones optimizados para la expresión en *Yarrowia lipolytica*.

- 45 La figura 8A y 8B muestra un alineamiento Clustal V (con parámetros por defecto) de una delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* (SEQ ID NO:18), una delta-8 desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:64), una delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis* (SEQ ID NO:16), y dos delta-6 ácido graso desaturasas diferentes de *Rhizopus stolonifer* (SEQ ID NO:51 y 63).

La figura 9 proporciona un mapa del plásmido pY98.

- 50 La figura 10A proporciona los perfiles de ácidos grasos para *Yarrowia lipolytica* que expresa pY98 (SEQ ID NO:76, que comprende un gen de delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* denominado "MaD5") o pDMW367 (SEQ ID NO:23, que comprende el gen de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* denominado "EgD5") y alimentada con diversos sustratos. La figura 10B proporciona una comparación de la especificidad de sustrato de omega-3 y omega-6 de MaD5 frente a EgD5.

La figura 11 proporciona mapas de los siguientes plásmidos: (A) pKR916; (B) pKR1037; y (C) pKR328.

La figura 12A proporciona la media de los perfiles de ácidos grasos para diez acontecimientos que tienen la mayor actividad delta-5 desaturasa cuando la enzima de *Mortierella alpina* (MaD5) se transforma en embriones de soja. La figura 12B proporciona la media de los perfiles de ácidos grasos para diez acontecimientos que tienen la mayor actividad delta-5 desaturasa cuando la enzima de *Euglena gracilis* (EgD5) se transforma en embriones de soja. Los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUP, ETA y EPA. Los ácidos grasos listados como "otros" incluyen: 18:2 (5,9), GLA, STA, 20:0, 20:1(11), 20:2 (7,11) o 20:2 (8,11) y DPA. Cada uno de estos "otros" ácidos grasos está presente con una abundancia relativa menor que 3,0% de los ácidos grasos totales. Las composiciones de ácidos grasos para un embrión individual se expresan como porcentaje en peso (% en p) de los ácidos grasos totales, y la media de la composición de ácidos grasos es la media de seis embriones individuales para cada acontecimiento. La figura 12B demuestra que la actividad de EgD5 en embriones de soja es muy alta, con una conversión media (Correcto % delta-5 desat.) del 77% al 99% en los diez acontecimientos de mayor puntuación.

La figura 13 proporciona la actividad de la delta-5 desaturasa para los sustratos "correctos" ("Correcto % delta-5 desat.") representada gráficamente en el eje de abscisas frente a la actividad de la delta-5 desaturasa para los sustratos "incorrectos" ("Incorrecto % delta-5 desat.") representada gráficamente en el eje de ordenadas para MaD5 (véase la figura 12A) y EgD5 (véase la figura 12B). La especificidad de sustrato de EgD5 presenta una preferencia por los sustratos "correctos" frente a los sustratos "incorrectos" cuando se compara con MaD5.

La invención puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción detallada y las descripciones de las secuencias adjuntas, que forman parte de esta solicitud.

Las siguientes secuencias cumplen con 37 C.F.R. §1.821-1.825 ("Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules") y son coherentes con the World Intellectual Property Organization (WIPO) Standard ST.25 (1998) y los requisitos de listado de secuencias de EPO y PCT (normas 5.2 y 49.5(a-bis), y sección 208 y anexo C de las instrucciones administrativas). Los símbolos y el formato utilizado para los datos de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se ajustan a las normas indicadas en 37 C.F.R. §1.822.

Las SEQ ID NO:1-26, 48, 49, 51-54, 61-64, 67-72 y 75-76 son ORF que codifican genes o proteínas (o porciones de estos), o plásmidos, según se identifica en la tabla 1.

Tabla 1

Resumen de los números de SEQ ID de ácidos nucleicos y proteínas		
Descripción y abreviatura	SEQ ID NO: de ácido nucleico	SEQ ID NO: de proteína
delta-5 desaturasa de <i>Euglena gracilis</i> ("EgD5")	1 (1350 pb)	2 (449 AA)
delta-5 desaturasa sintética, derivada de <i>Euglena gracilis</i> , con codones optimizados para la expresión en <i>Yarrowia lipolytica</i> ("EgD5S")	3 (1350 pb)	2 (449 AA)
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - fragmento de pT-F10-1	4 (590 pb)	5 (196 AA)
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - fragmento de pT-EgD5-5'Cs	6 (797 pb)	-
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - secuencia 5' con relación a SEQ ID NO:4	7 (559 pb)	-
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - fragmento de pT-EgD5-5'2 nd	8 (273 pb)	-
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - secuencia 5' con relación a SEQ ID NO:6	9 (20 pb)	-
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - fragmento de pT-EgD5-3'	10 (728 pb)	-
EgD5 de <i>Euglena gracilis</i> - secuencia 3' con relación a SEQ ID NO:4	11 (464 pb)	-
delta-5 desaturasa de <i>Pythium irregulare</i> (n.º de registro de GenBank AAL13311)	-	12 (456 AA)
delta-5 desaturasa de <i>Phytophthora megasperma</i> (n.º de registro de GenBank CAD53323)	-	13 (477 AA)
delta-5 desaturasa de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (n.º de registro de GenBank AAL92562)	-	14 (469 AA)
delta-5 desaturasa de <i>Dictyostelium discoideum</i> (n.º de registro de GenBank XP640331)	-	15 (467 AA)

Resumen de los números de SEQ ID de ácidos nucleicos y proteínas		
Descripción y abreviatura	SEQ ID NO: de ácido nucleico	SEQ ID NO: de proteína
delta-8 desaturasa de <i>Euglena gracilis</i> (publicaciones PCT n.º WO 2006/012325 y WO 2006/012326)	-	16 (421 AA)
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova lutheri</i> (CCMP459)	17 (1269 pb)	18 (423 AA)
región conservada 1	-	19 (7 AA)
región conservada 2	-	20 (7 AA)
delta-8 esfingolípido desaturasa de <i>Thalassiosira pseudonana</i> (n.º de registro de GenBank AAX14502)	-	21 (476 AA)
plásmido pZUF17	22 (8165 pb)	-
plásmido pDMV367	23 (8638 pb)	-
plásmido pKUNF12T6E	24 (12.649 pb)	-
gen de C _{18/20} elongasa sintético derivado de <i>Thraustochytrium aureum</i> (patente de EEUU 6.677.145), con codones optimizados para la expresión en <i>Yarrowia lipolytica</i> ("EL2S")	25 (819 pb)	26 (272 AA)
plásmido pEgD5S	48 (4070 pb)	-
plásmido pDMV369	49 (8438 pb)	-
delta-6 ácido graso desaturasa de <i>Rhizopus stolonifer</i> (n.º de registro de NCBI AAX22052)	-	51 (459 AA)
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova lutheri</i> - porción de inserción de ADNc del clon eps1c.pk002.f22 (extremo 5' de la inserción de ADNc)	52 (695 pb)	-
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova lutheri</i> - EST completamente secuenciado eps1c.pk002.f22:fis (secuencia completa de la inserción)	53 (1106 pb)	-
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova lutheri</i> - traducción de los nucleótidos 1-864 de EST totalmente secuenciado eps1c.pk002.f22:fis (secuencia completa de la inserción; SEQ ID NO:53)	-	54 (287 AA)
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova lutheri</i> - secuencia completa del extremo 5' de paseo genómico	61 (1294 pb)	-
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova lutheri</i> - secuencia ensamblada	62 (1927 pb)	-
delta-6 ácido graso desaturasa de <i>Rhizopus stolonifer</i> (n.º de registro de NCBI ABB96724)	-	63 (459 AA)
delta-8 desaturasa de <i>Pavlova salina</i>	-	64 (427 AA)
delta-5 desaturasa de <i>Mortierella alpina</i>	67 (1338 pb)	68 (446 AA)
plásmido pY5-22	69 (6473 pb)	-
plásmido pY5-22GPD	70 (6970 pb)	-
promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) de <i>Yarrowia lipolytica</i>	71 (968 pb)	-
plásmido pYZDE2-S	72 (8630 pb)	-
plásmido pKR136	75 (6339 pb)	-
plásmido pY98	76 (8319 pb)	-
delta-9 elongasa de <i>Euglena gracilis</i> ("EgD9e")	77 (774 pb)	-
delta-8 desaturasa de <i>Euglena gracilis</i> ("EgD8")	78 (1263 pb)	-
plásmido pKR906	81 (4311 pb)	-
plásmido pKR72	82 (7085 pb)	-

Resumen de los números de SEQ ID de ácidos nucleicos y proteínas		
Descripción y abreviatura	SEQ ID NO: de ácido nucleico	SEQ ID NO: de proteína
plásmido pKS102	83 (2540 pb)	-
plásmido pKR197	84 (4359 pb)	-
plásmido pKR911	85 (5147 pb)	-
plásmido pKR680	86 (6559 pb)	-
plásmido pKR913	87 (9014 pb)	-
plásmido pKR767	88 (5561 pb)	-
plásmido pKR916	89 (11.889 pb)	-
plásmido pKR974	90 (5661 pb)	-
plásmido pKR1032	91 (5578 pb)	-
plásmido pKR1037	92 (11.907 pb)	-
plásmido pKR328	93 (8671 pb)	-
delta-5 desaturasa de <i>Saprolegnia diclina</i> ("SdD5")	94 (1413 pb)	-

SEQ ID NO:27-30 se corresponden con los cebadores oligonucleotídicos degenerados 5-1A, 5-1B, 5-1C y 5-1D, respectivamente, que codifican la región conservada 1.

SEQ ID NO:31-34 se corresponden con los cebadores oligonucleotídicos degenerados 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR y 5-5DR, respectivamente, que codifican la región conservada 2.

- 5 SEQ ID NO:35-40 se corresponden con los cebadores ODMW480, cebador CDSIII 5', ODMW479, DNR CDS 5', YL791 y YL792, respectivamente, utilizados para 5' RACE.

SEQ ID NO:41-43 se corresponden con los cebadores ODMW469, AUAP y ODMW470, respectivamente, utilizados para 3' RACE.

- 10 SEQ ID NO:44-47 se corresponden con los cebadores YL794, YL797, YL796 e YL795, respectivamente, utilizados para la amplificación del ADNc de longitud completa de EgD5.

SEQ ID NO:50 se corresponde con el cebador T7, utilizado para secuenciar el banco de ADNc de *Pavlova lutheri* (CCMP459).

SEQ ID NO:55 y 56 se corresponden con los cebadores SeqE y SeqW, respectivamente, utilizados para la secuenciación de clones de *Pavlova lutheri* (CCMP459).

- 15 SEQ ID NO:57 y 58 se corresponden con el cebador universal AP1 y el cebador GSP PvDES, respectivamente, utilizados para la amplificación del ADN genómico de *Pavlova lutheri* (CCMP459).

SEQ ID NO:59 y 60 se corresponden con los cebadores M12-28Rev y PavDES seq, respectivamente, utilizados para la secuenciación de inserciones genómicas de *Pavlova lutheri* (CCMP459).

- 20 SEQ ID NO:65 y 66 se corresponden con el cebador AP y el cebador oligonucleotídico Smart IV, respectivamente, utilizados para la síntesis de ADNc de *Euglena gracilis*.

SEQ ID NO:73 y 74 son los cebadores GPDsense y GPDantisense, respectivamente, utilizados para amplificar el promotor de GPD.

SEQ ID NO:79 y 80 se corresponden con los cebadores oEugEL1-1 y oEugEL1-2, respectivamente, utilizados para amplificar una delta-9 elongasa de *Euglena gracilis* (EgD9e).

- 25 **Descripción detallada de la invención**

En la presente se citan la patente de EEUU 7.125.672, patente de EEUU 7.189.559, patente de EEUU 7.192.762, patente de EEUU 7.198.937, patente de EEUU 7.202.356, solicitudes de patente de EEUU n.º 10/840579 y n.º 10/840325 (presentadas el 6 de mayo, 2004), solicitud de patente de EEUU n.º 10/869630 (presentada el 16 de junio, 2004), solicitud de patente de EEUU n.º 10/882760 (presentada el 1 de julio, 2004), solicitudes de patente de EEUU n.º 10/985254 y n.º 10/985691 (presentadas el 10 de noviembre, 2004), solicitud de patente de EEUU n.º 11/024544 (presentada el 29 de diciembre, 2004), solicitud de patente de EEUU n.º 11/166993 (presentada el 24 de

- 30

junio, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/183664 (presentada el 18 de julio, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/185301 (presentada el 20 de julio, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/190750 (presentada el 27 de julio, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/198975 (presentada el 8 de agosto, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/225354 (presentada el 13 de septiembre, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/253882 (presentada el 19 de octubre, 2005), solicitudes de patente de EEUU n.º 11/264784 y n.º 11/264737 (presentadas el 1 de noviembre, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/265761 (presentada el 2 de noviembre, 2005), solicitud de patente de EEUU n.º 11/737.772 (presentada el 20 de abril, 2007), solicitud de patente de EEUU n.º 11/787.772 (presentada el 17 de abril, 2007), solicitud de patente de EEUU n.º 11/740.298 (presentada el 26 de abril, 2007), solicitudes de patente de EEUU n.º 60/801172 y n.º 60/801119 (presentadas el 17 de mayo, 2006), solicitud de patente de EEUU n.º 60/853563 (presentada el 23 de octubre, 2006), solicitud de patente de EEUU n.º 60/855177 (presentada el 30 de octubre, 2006), solicitudes de patente de EEUU n.º 11/601563 y n.º 11/601564 (presentadas el 16 de noviembre, 2006), solicitud de patente de EEUU n.º 11/635258 (presentada el 7 de diciembre, 2006), solicitud de patente de EEUU n.º 11/613420 (presentada el 20 de diciembre, 2006), solicitud de patente de EEUU n.º 60/909790 (presentada el 3 de abril, 2007), solicitud de patente de EEUU n.º 60/911925 (presentada el 16 de abril, 2007), solicitud de patente de EEUU n.º 60/910831 (presentada el 10 de abril, 2007) y solicitud de patente de EEUU n.º 60/915733 (BB1614) (presentada el 3 de mayo, 2007). La patente de EEUU n.º de publicación 2005/0136519, que se refiere a la producción de PUFA en plantas, y la patente de EEUU n.º 7.129.089, que se refiere a promotores de anexina y su uso en la expresión de transgenes en plantas son solicitudes en tramitación junto con la presente.

20 Tal como se emplea en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un/una” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una planta” incluye una pluralidad de dichas plantas, la referencia a “una célula” incluye una o más células y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, etc.

25 Según la presente invención, los solicitantes han identificado una nueva enzima delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* y el gen que la codifica, que puede utilizarse para la manipulación de vías bioquímicas para la producción de PUFA saludables. Así, la presente invención tiene muchas aplicaciones.

30 Los PUFA, o sus derivados, preparados mediante la metodología descrita en la presente, pueden utilizarse como sustitutos dietéticos, o suplementos, en particular en leches maternizadas, para pacientes que están sometidos a una alimentación intravenosa o para prevenir o tratar la malnutrición. Como alternativa, los PUFA purificados (o sus derivados) pueden incorporarse en aceites para cocinar, grasas o margarinas formuladas para que, en el uso normal, el receptor reciba la cantidad deseada para la suplementación dietética. Los PUFA también pueden incorporarse en leches maternizadas, suplementos nutricionales u otros productos alimentarios, y puede ser útiles como antiinflamatorios o agentes para disminuir el colesterol. Opcionalmente, las composiciones pueden utilizarse para un uso farmacéutico (humano o veterinario).

35 La suplementación de seres humanos o animales con PUFA producidos por medios recombinantes puede dar como resultado unos mayores niveles de los PUFA añadidos, así como de su progenie metabólica. Por ejemplo, un tratamiento con EPA puede producir no solo unos mayores niveles de EPA, sino también de productos corriente abajo de EPA, tales como eicosanoides (es decir, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos). Los complejos mecanismos reguladores pueden hacer que resulte deseable combinar diversos PUFA, o añadir diferentes conjugados de PUFA, para prevenir, controlar o superar dichos mecanismos para lograr los niveles deseados de PUFA específicos en un individuo.

Definiciones

En esta descripción se emplea una serie de términos, expresiones y abreviaturas. Se proporcionan las siguientes definiciones.

45 Un “marco de lectura abierto” se abrevia como ORF.

La “reacción en cadena de polimerasa” se abrevia como PCR.

“American Type Culture Collection” se abrevia como ATCC.

Un “ácido o ácidos grasos poliinsaturados” se abrevia como PUFA.

Los “triacilglicerolos” se abrevian como TAG.

50 El término “invención” o la expresión “presente invención”, tal como se emplea en la presente, no pretende la limitación a cualquier realización específica de la invención, sino que se aplica en general a cualquiera y a todas las realizaciones de la invención, según se describe en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva.

La expresión “ácidos grasos” se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanóicos) de longitud de cadena variable, de aproximadamente C₁₂ a C₂₂ (aunque se conocen ácidos con una longitud de cadena mayor o menor).

55 Las longitudes de cadena predominantes están entre C₁₆ y C₂₂. La estructura de un ácido graso se representa

mediante un sistema de notación sencillo de "X:Y", en el que X es el número total de átomos de carbono (C) en el ácido graso concreto, e Y es el número de enlaces dobles. Otros detalles referidos a la diferenciación entre "ácidos grasos saturados" frente a "ácidos grasos insaturados", "ácidos grasos monoinsaturados" frente a "ácidos grasos poliinsaturados" (o "PUFA"), y "ácidos grasos omega-6" (omega-6 o n-6) frente a "ácidos grasos omega-3" (omega-3 o n-3) se proporcionan en la publicación de patente de EEUU n.º 2005/0136519.

En la presente, los ácidos grasos se describen mediante un sistema de notación sencillo de "X:Y", en el que X es el número total de átomos de carbono (C) en el ácido graso concreto, e Y es el número de enlaces dobles. El número que sigue a la denominación del ácido graso indica la posición del doble enlace desde el extremo carboxilo del ácido graso, indicando el afijo "c" la configuración *cis* del doble enlace (por ejemplo, ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1, 9c), ácido petroselinico (18:1, 6c), LA (18:2, 9c,12c), GLA (18:3, 6c,9c,12c) y ALA (18:3, 9c,12c,15c)). A menos que se indique lo contrario, 18:1, 18:2 y 18:3 se refieren a los ácidos grasos oleico, LA y ALA, respectivamente. Si no se indica específicamente lo contrario, se supone que los dobles enlaces están en la configuración *cis*. Por ejemplo, se supone que los dobles enlaces en 18:2 (9,12) están en la configuración *cis*.

La nomenclatura utilizada para describir los PUFA en la presente descripción se muestra a continuación en la tabla 2. En la columna titulada "Notación abreviada", se emplea el sistema de referencia con omega para indicar el número de carbonos, el número de dobles enlaces y la posición del doble enlace más cercano al carbono omega, contando desde el carbono omega (que se numera como 1 para este fin). El resto de la tabla resume los nombres comunes de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 y sus precursores, las abreviaturas que se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva y el nombre químico de cada compuesto.

Tabla 2

Nomenclatura de ácidos grasos poliinsaturados y sus precursores			
Nombre común	Abreviatura	Nombre químico	Notación abreviada
mirístico	-	tetradecanoico	14:0
palmítico	palmitato	hexadecanoico	16:0
palmitoleico	-	9-hexadecenoico	16:1
esteárico	-	octadecanoico	18:0
oleico	-	<i>cis</i> -9-octadecenoico	18:1
linoleico	LA	<i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	18:2 omega-6
γ -linoleico	GLA	<i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	18:3 omega-6
eicosadienoico	EDA	<i>cis</i> -11,14-eicosadienoico	20:2 omega-6
dihomo- γ -linoleico	DGLA	<i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienoico	20:3 omega-6
araquidónico	ARA	<i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 omega-6
α -linolénico	ALA	<i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3 omega-3
estearidónico	STA	<i>cis</i> -6,9,12,15-octadecatetraenoico	18:4 omega-3
eicosatrienoico	ETra o ERA	<i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico	20:3 omega-3
esciadónico	SCI	<i>cis</i> -5,11,14-eicosatrienoico	20:3b omega-6
juniperónico	JUP	<i>cis</i> -5,11,14,17-eicosatetraenoico	20:4b omega-3
eicosatetraenoico	ETA	<i>cis</i> -8,11,14,17-eicosatetraenoico	20:4 omega-3
eicosapentaenoico	EPA	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 omega-3
docosapentaenoico	DPA	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5 omega-3
docosahexaenoico	DHA	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6 omega-3

Los términos "triacylglicerol", "aceite" y "TAG" se refieren a lípidos neutros compuestos por tres restos acilo graso esterificados a una molécula de glicerol (y estos términos se emplean de modo intercambiable a lo largo de la presente memoria descriptiva). Estos aceites pueden contener PUFA de cadena larga, así como ácidos grasos saturados e insaturados más cortos y ácidos grasos saturados de cadena más larga. Así, la "biosíntesis de aceites" se refiere genéricamente a la síntesis de TAG en la célula.

El "porcentaje (%)" de PUFA en las fracciones de aceite y lípidos totales" se refiere al porcentaje de PUFA con

relación a los ácidos grasos totales en estas fracciones. Las expresiones “fracción de lípidos totales” o “fracción de lípidos” se refieren ambas a la suma de todos los lípidos (es decir, neutros y polares) dentro de un organismo oleaginoso, lo cual indica que estos lípidos están localizados en la fracción de fosfatidilcolina (PC), la fracción de fosfatidiletanolamina (PE) y la fracción de triacilglicerol (TAG o aceite). Sin embargo, los términos “lípidos” y “aceite” se emplearán de modo intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva.

Una vía metabólica, o una vía biosintética, en un sentido bioquímico, puede considerarse como una serie de reacciones químicas que se producen dentro de una célula, catalizadas por enzimas, para lograr la formación de un producto metabólico que va a ser utilizado o almacenado por la célula, o el inicio de otra vía metabólica (entonces se denomina una etapa generadora de flujo). Muchas de estas vías son complejas, e implica una modificación etapa a etapa de la sustancia inicial para generar un producto que tenga la estructura química exacta deseada.

La expresión “vía biosintética de PUFA” se refiere a un proceso metabólico que convierte el ácido oleico en LA, EDA, GLA, DGLA, ARA, ALA, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA. Este proceso está bien descrito en la bibliografía (por ejemplo, véase la publicación PCT n.º WO 2006/052870). Brevemente, este proceso implica el alargamiento de la cadena carbonada mediante la adición de átomos de carbono y la desaturación de la molécula mediante la adición de dobles enlaces, a través de una serie de enzimas de desaturación y alargamiento especiales (es decir, “enzimas de la vía biosintética de PUFA”) presentes en la membrana del retículo endoplásmico. De modo más específico, las “enzimas de la vía biosintética de PUFA” se refieren a cualquiera de la siguientes enzimas (y los genes que codifican dichas enzimas) asociadas con la biosíntesis de un PUFA, que incluyen: una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-9 elongasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y/o una C_{20/22} elongasa.

La expresión “vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6” se refiere a un conjunto de genes que, cuando se expresan bajo las condiciones apropiadas, codifican enzimas que catalizan la producción de ácidos grasos omega-3 u omega-6 o ambos. Generalmente, los genes implicados en la vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6 codifican enzimas de la vía biosintética de PUFA. Una vía representativa se ilustra en la figura 1, que proporciona la conversión del ácido mirístico a través de diversos intermedios en DHA, lo cual demuestra cómo pueden producirse ácidos grasos omega-3 y omega-6 a partir de una fuente común. La vía está dividida en la naturaleza en dos porciones, y una porción genera ácidos grasos omega-3 y la otra porción solo ácidos grasos omega-6. La porción que solo genera ácidos grasos omega-3 se denomina en la presente la vía biosintética de ácidos grasos omega-3, mientras que la porción que solo genera ácidos grasos omega-6 se denomina en la presente la vía biosintética de ácidos grasos omega-6.

El término “funcional”, tal como se emplea en la presente en el contexto de la vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6, significa que algunos (o todos) los genes en la vía expresan enzimas activas, dando como resultado la catálisis o la conversión del sustrato *in vivo*. Debe entenderse que la “vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6” o la “vía biosintética de ácidos grasos omega-3/omega-6 funcional” no implica que todos los genes listados en el anterior párrafo son necesarios, puesto que una serie de productos de ácidos grasos solo requieren la expresión de un subconjunto de los genes en esta vía.

La expresión “vía de la delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa” se refiere a una vía biosintética de PUFA que incluye mínimamente al menos una delta-6 desaturasa y al menos una C_{18/20} elongasa, permitiendo así la biosíntesis de DGLA y/o ETA a partir de LA y ALA, respectivamente, con GLA y/o STA como intermedios de ácidos grasos. Con la expresión de otras desaturasas y elongasas también pueden sintetizarse ARA, EPA, DPA y DHA.

La expresión “vía de la delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa” se refiere a una vía biosintética de PUFA que incluye mínimamente al menos una delta-9 elongasa y al menos una delta-8 desaturasa, permitiendo así la biosíntesis de DGLA y/o ETA a partir de LA y ALA, respectivamente, con EDA y/o ETrA como intermedios de ácidos grasos. Con la expresión de otras desaturasas y elongasas también pueden sintetizarse ARA, EPA, DPA y DHA.

La expresión “intermedio de ácido graso” se refiere a cualquier ácido graso producido en una vía metabólica de ácidos grasos que después puede convertirse en el producto de ácido graso previsto en esta vía mediante la acción de otras enzimas de la vía metabólica. Por ejemplo, cuando se produce EPA utilizando la vía de la delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa, pueden producirse EDA, ETrA, GDLA, ETA y ARA y se consideran “intermedios de ácidos grasos”, puesto que estos ácidos grasos pueden convertirse después en EPA a través de la acción de otras enzimas de la vía metabólica.

La expresión “subproducto de ácido graso” se refiere a cualquier ácido graso producido en una vía metabólica de ácidos grasos que no es el producto de ácido graso previsto ni un “intermedio de ácido graso” de la vía. Por ejemplo, cuando se produce EPA utilizando la vía de la delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa, también pueden producirse ácido esciadónico (SCI) y ácido juniperónico (JUP) mediante la acción de una delta-5 desaturasa sobre EDA o ETrA, respectivamente. Los primeros se consideran “subproductos de ácidos grasos”, puesto que ninguno de ellos puede convertirse después en EPA a través de la acción de otras enzimas de la vía metabólica.

El término “desaturasa” se refiere a un polipéptido que puede desaturar, es decir, introducir un doble enlace, en uno

o más ácidos grasos para producir un ácido graso o un precursor de interés. A pesar del uso del sistema de referencia con omega a lo largo de la memoria descriptiva para nombrar ácidos grasos específicos, es más conveniente indicar la actividad de una desaturasa contando desde el extremo carboxilo del sustrato utilizando el sistema delta. De particular interés en la presente son las delta-5 desaturasas que catalizan la conversión de DGLA a ARA y/o de ETA a EPA. Otras desaturasas incluyen: 1) delta-17 desaturasas que desaturan un ácido graso entre el 17° y el 18° átomo de carbono, numerados desde el extremo carboxilo-terminal de la molécula y que, por ejemplo, catalizan la conversión de ARA a EPA y/o DGLA a ETA; 2) delta-6 desaturasas que catalizan la conversión de LA a GLA y/o de ALA a STA; 3) delta-12 desaturasas que catalizan la conversión del ácido oleico a LA; 4) delta-15 desaturasas que catalizan la conversión de LA a ALA y/o de GLA a STA; 5) delta-4 desaturasas que catalizan la conversión de DPA a DHA; 6) delta-8 desaturasas que catalizan la conversión de EDA a DGLA y/o de ETrA a ETA; y 7) delta-9 desaturasas que catalizan la conversión de palmitato a ácido palmitoleico (16:1) y/o de estearato a ácido oleico. En la técnica, las delta-15 y delta-17 desaturasas también se denominan a veces “omega-3 desaturasas”, “w-3 desaturasas” y/o “omega-3 desaturasas”, basándose en su capacidad para convertir ácidos grasos omega-6 en sus homólogos de omega-3 (por ejemplo, la conversión de LA en ALA y de ARA en EPA, respectivamente). En algunas realizaciones, lo más deseable es determinar de forma empírica la especificidad de una ácido graso desaturasa concreta transformando un hospedante adecuado con el gen para la ácido graso desaturasa y determinando su efecto sobre el perfil de ácidos grasos del hospedante.

La expresión “delta-5 desaturasa” se refiere a una enzima que desatura un ácido graso entre el quinto y el sexto átomo de carbono numerados desde el extremo carboxilo-terminal de la molécula. Preferiblemente, una delta-5 desaturasa convierte el ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3, DGLA) en ácido araquidónico (20:4, ARA) o convierte el ácido eicosatetraenoico (20:4, ETA) en ácido eicosapentaenoico (20:5, EPA).

Para los objetivos de la presente, el término “EgD5” se refiere a una enzima delta-5 desaturasa (SEQ ID NO:2) aislada a partir de *Euglena gracilis*, codificada por SEQ ID NO:1 de la presente. De modo similar, el término “EgD5S” se refiere a una delta-5 desaturasa sintética derivada de *Euglena gracilis* que tiene codones optimizados para la expresión en *Yarrowia lipolytica* (es decir, SEQ ID NO:3 y 2).

Las expresiones “eficacia de conversión” y “porcentaje de conversión del sustrato” se refieren a la eficacia con la cual una enzima concreta (por ejemplo, una desaturasa) puede convertir el sustrato en producto. La eficacia de conversión se mide según la siguiente fórmula: $([\text{producto}]/[\text{sustrato} + \text{producto}]) \times 100$, en la que “producto” incluye el producto intermedio y todos los productos en la vía derivados de él.

El término “elongasa” se refiere a un polipéptido que puede alargar una cadena carbonada de un ácido graso para producir un ácido que es 2 carbonos más largo que el sustrato de ácido graso sobre el cual actúa la elongasa. Este proceso de alargamiento se produce a través de un mecanismo de múltiples etapas en asociación con la ácido graso sintasa, según se describe en la publicación de patente de EEUU n.º 2005/0132442. Los ejemplos de reacciones catalizadas por sistemas de elongasa son la conversión de GLA a DGLA, de STA a ETA y de ETA a DPA. En general, la selectividad de sustrato de las elongasas es bastante amplio, pero está segregado por la longitud de la cadena y el grado y tipo de insaturación. Por ejemplo, una C_{14/16} elongasa utilizará un sustrato C₁₄ (por ejemplo, ácido mirístico), un C_{16/18} elongasa utilizará un sustrato C₁₆ (por ejemplo, palmitato), una C_{18/20} elongasa (también conocida como delta-6 elongasa, puesto que las expresiones pueden utilizarse de modo intercambiable) utilizará un sustrato C₁₈ (por ejemplo, GLA, STA), y una C_{20/22} elongasa utilizará un sustrato C₂₀ (por ejemplo, EPA). De manera similar, una delta-9 elongasa es capaz de catalizar la conversión de LA y ALA a EDA y ETrA, respectivamente. Es importante advertir que algunas elongasas tienen una amplia especificidad y, así, una única enzima puede ser capaz de catalizar varias reacciones de elongasa (por ejemplo, actuando así como una C_{16/18} elongasa y una a C_{18/20} elongasa).

El término “oleaginoso” se refiere a los organismos que tienden a almacenar su fuente de energía en forma de lípidos (Weete, en: *Fungal Lipid Biochemistry*, 2ª ed., Plenum, 1980). La expresión “levadura oleaginoso” se refiere a los microorganismos clasificados como levaduras que pueden fabricar aceites. En general, el contenido en aceite celular o TAG de los microorganismos oleaginosos se ajusta a una curva sigmoidea, en la que la concentración de lípido aumenta hasta que alcanza un máximo en la fase logarítmica tardía o en la fase de crecimiento estacionario temprana, y después disminuye gradualmente durante las fases estacionaria tardía y de muerte (Yongmanitchai y Ward, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:419-425 (1991)). No es raro que los microorganismos oleaginosos acumulen un exceso de aproximadamente 25% de su peso seco celular en forma de aceite. Los ejemplos de levaduras oleaginosas incluyen, pero no se limitan a los siguientes géneros: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Lipomyces*.

El término “Euglenophyceae” se refiere a un grupo de flagelados fotosintéticos o incoloros unicelulares (“euglenoides”) que viven en entornos de agua dulce, marina, en el suelo y en entornos parasitarios. La clase se caracteriza por ser células individuales solitarias, siendo la mayoría natatorias libres, y tienen dos flagelos (uno de los cuales puede ser no emergente) que surgen de una invaginación anterior, conocida como reservorio. Los euglenoides fotosintéticos contienen de uno o muchos cloroplastos, que varían desde discos diminutos a placas expandidas o cintas. Los euglenoides incoloros depende de la osmotrofía o la fagotrofía para la asimilación de nutrientes. Se han descrito aproximadamente 1000 especies y se clasifican en aproximadamente 40 géneros y 6 órdenes. Los ejemplos de Euglenophyceae incluyen, pero no se limitan a los siguientes géneros: *Euglena*,

Eutreptiella y Tetrueptia.

La expresión "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de un resto aminoácido en una proteína concreta por otro aminoácido, sin alterar la naturaleza química o funcional de esa proteína. Por ejemplo, en la técnica se sabe que son habituales las alteraciones en un gen que dan como resultado la producción de un aminoácido equivalente desde el punto de vista químico en un sitio concreto (pero que no afecta a las propiedades estructurales y funcionales de la proteína codificada y plegada). Para los fines de la presente invención, las "sustituciones de aminoácidos conservativas" se definen como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

1. restos alifáticos pequeños, ligeramente polares o no polares: Ala [A], Ser [S], Thr [T] (Pro [P], Gly [G]);
2. restos polares con carga negativa y sus amidas: Asp [D], Asn [N], Glu [E], Gln [Q];
3. restos polares con carga positiva: His [H], Arg [R], Lys [K];
4. restos alifáticos grandes, no polares: Met [M], Leu [L], Ile [I], Val [V] (Cys [C]); y,
5. restos aromáticos grandes: Phe [F], Tyr [Y], Trp [W].

Las sustituciones de aminoácidos conservativas en general mantienen: 1) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución; 2) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o 3) la voluminosidad de la cadena lateral. Además, en muchos casos, tampoco se espera que alteraciones en las porciones N-terminal y C-terminal de la molécula de proteína alteren la actividad de la proteína.

Tal como se emplea en la presente, un "ácido nucleico" significa un polinucleótido e incluye un polímero mono- o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas. Los ácidos nucleicos también pueden incluir fragmentos y nucleótidos modificados. Así, el término "polinucleótido" y las expresiones "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" o "fragmento de ácido nucleico" se emplean de modo intercambiable y son un polímero de ARN o ADN que es mono- o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Los nucleótidos (que habitualmente se encuentran en su forma 5'-monofosfato) pueden indicarse mediante su denominación de una sola letra como sigue: "A" para adenilato o desoxiadenilato (para el ARN o el ADN, respectivamente), "C" para citidilato o desoxicitidilato, "G" para guanilato o desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A o G), "Y" para pirimidienos (C o T), "K" para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina, y "N" para cualquier nucleótido.

Las expresiones "subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "subfragmento funcionalmente equivalente" se emplean de modo intercambiable en la presente. Estas expresiones se refieren a una porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado en el que la capacidad para alterar la expresión de genes o de producir cierto fenotipo se mantiene, tanto como si el fragmento o subfragmento codifica una enzima activa como si no. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento puede utilizarse para diseñar genes quiméricos para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Pueden diseñarse genes quiméricos para su uso en la supresión mediante la unión de un fragmento de ácido nucleico o uno de sus subfragmentos, tanto como si codifica una enzima activa como si no, en la orientación sentido o antisentido con relación a una secuencia de promotor vegetal.

La expresión "dominio conservado" o el término "motivo" significa un conjunto de aminoácidos conservados en posiciones específicas a lo largo de una secuencia alineada de proteínas relacionadas desde el punto de vista evolutivo. Aunque los aminoácidos en otras posiciones pueden variar entre proteínas homólogas, los aminoácidos que están altamente conservados en posiciones específicas indican los aminoácidos que son fundamentales para la estructura, la estabilidad o la actividad de una proteína. Debido a que se identifican por su alto grado de conservación en las secuencias alineadas de una familia de homólogos de proteínas, pueden utilizarse como identificadores, o "firmas", para determinar si una proteína con una secuencia recién determinada pertenece a una familia de proteínas previamente identificada.

Los términos y las expresiones "homología", "homólogo", "sustancialmente similar" y "sustancialmente correspondiente" se emplean de modo intercambiable en la presente. Se refieren a fragmentos de ácidos nucleicos en los que los cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar en la expresión de genes o producir cierto fenotipo. Estos términos también se refieren a modificaciones de los fragmentos de ácidos nucleicos de la presente invención, tales como delecciones o inserciones de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con relación al fragmento inicial no modificado. Por tanto se entiende, tal como apreciarán los expertos en la técnica, que la invención incluye más de las secuencias específicas ejemplares.

Las secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente similares a las secuencias ejemplificadas en la presente pueden hibridarse (bajo condiciones moderadamente rigurosas, por ejemplo, 0,5x SSC, SDS al 0,1%, 60 °C) con las secuencias ejemplificadas en la presente, o con cualquier porción de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente, y pueden ser funcionalmente equivalentes a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente. Las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para seleccionar fragmentos moderadamente

similares, tales como secuencias homólogas de organismos con relación distante, hasta fragmentos muy similares, tales como genes que duplican enzimas funcionales de organismos muy relacionados. Los lavados después de la hibridación determinan las condiciones de rigurosidad.

La expresión “se hibrida selectivamente” incluye la referencia a la hibridación, bajo condiciones de hibridación rigurosas, de una secuencia de ácido nucleico con una secuencia diana de ácido nucleico especificada hasta un grado detectablemente mayor (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el fondo) que su hibridación con secuencias de ácidos nucleicos que no son la diana y con la sustancial exclusión de ácidos nucleicos que no son la diana. Las secuencias que se hibridan selectivamente en general presentan aproximadamente al menos 80% de identidad de secuencia, o 90% de identidad de secuencia, hasta e inclusive 100% de identidad de secuencia (es decir, totalmente complementarias) entre sí.

Las expresiones “condiciones rigurosas” o “condiciones de hibridación rigurosas” incluyen la referencia a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará selectivamente con su secuencia diana. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Mediante el control de la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado pueden identificarse secuencias diana que sean 100% complementarias con la sonda (sondado homólogo). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir un pequeño grado de desapareamiento en las secuencias, de modo que unos grados menores de similitud puedan detectarse (sondado heterólogo). En general, una sonda tiene una longitud menor que aproximadamente 1000 nucleótidos, opcionalmente tiene una longitud menor que 500 nucleótidos.

Generalmente, las condiciones rigurosas serán las condiciones en las que la concentración salina sea menor que aproximadamente 1,5 M de iones Na, generalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). Las condiciones de rigurosidad también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Un ejemplo de condiciones de baja rigurosidad incluye la hibridación con una disolución tampón de formamida del 30% al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% a 37 °C, y un lavado en 1x a 2x SSC (20x SSC = NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 0,3 M) de 50 a 55 °C. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad moderada incluye la hibridación en formamida del 40% al 45%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 °C, y un lavado en 0,5x a 1x SSC de 55 a 60 °C. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad alta incluye la hibridación en formamida del 50% al 45%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 °C, y un lavado en 0,1x SSC de 60 a 65 °C.

La especificidad generalmente está en función de los lavados después de la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse mediante la ecuación de Meinkoth *et al.*, Anal. Biochem., 138:267-284 (1984): $T_m = 81,5 ^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form.}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form. es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la cual 50% de la secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1% de desapareamiento; así, la T_m , las condiciones de hibridación y/o de lavado pueden ajustarse para la hibridación con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con $\geq 90\%$ de identidad, la T_m puede disminuirse 10 °C. En general, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C menor que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones muy rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4 °C menor que el punto de fusión térmico (T_m); unas condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10 °C menor que el punto de fusión térmico (T_m); unas condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20 °C menor que el punto de fusión térmico (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos en la técnica entenderán que se describen inherentemente variaciones en la rigurosidad de las disoluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de desapareamiento produce una T_m menor que 45 °C (disolución acuosa) o 32 °C (disolución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que pueda utilizarse una temperatura más alta. Una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, Nueva York (1993); y Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 2, Ausubel *et al.*, eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1995). Las condiciones de hibridación y/o lavado pueden aplicarse durante al menos 10, 30, 60, 90, 120, o 240 minutos. Los polinucleótidos de la invención aislados son como se definen en las reivindicaciones 1 y 2.

Una “porción sustancial” de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos es la porción que comprende el suficiente tramo de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o de la secuencia de nucleótidos de un gen como para identificar putativamente el polipéptido o el gen, mediante evaluación manual de la secuencia por un experto en la técnica, o mediante comparación de secuencias automática por ordenador e identificación utilizando algoritmos, tales como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1993)). En general, una secuencia de diez o más aminoácidos continuos o de treinta o más nucleótidos es necesaria para identificar putativamente una secuencia de un polipéptido o de un ácido nucleico como homóloga con una proteína o

gen conocido. Además, con respecto a las secuencias de nucleótidos, pueden utilizarse sondas oligonucleóticas específicas de gen que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos en métodos de identificación de genes dependientes de secuencia (por ejemplo, hibridación Southern) y aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófagos). Además, pueden utilizarse oligonucleóticos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en la PCR, para obtener un fragmento de ácido nucleico concreto que comprenda los cebadores. Por consiguiente, una "porción sustancial" de una secuencia de nucleótidos comprende el suficiente tramo de la secuencia para identificar específicamente y/o aislar un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia. La presente memoria descriptiva describe las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos completas que codifican proteínas euglenoides concretas. Los expertos en la técnica, utilizando las secuencias indicadas en la presente, ahora pueden utilizar una porción sustancial o completa de las secuencias descritas para los fines conocidos para los expertos en la técnica. Por consiguiente, la presente invención comprende las secuencias completas según se indica en la lista de secuencias adjunta. En la presente se describen porciones sustanciales de estas secuencias, según se definió anteriormente.

El término "complementario" se emplea para describir la relación entre las bases de nucleótidos que son capaces de hibridarse entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria con la timina, y la citosina es complementaria con la guanina. Por consiguiente, la presente invención también incluye fragmentos de ácidos nucleicos aislados que son complementarios con las secuencias completas según se indican en el listado de secuencias adjunto, así como las secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente similares.

Los términos "homología" y "homólogo" se emplean de modo intercambiable en la presente. Se refieren a fragmentos de ácidos nucleicos en los que cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar en la expresión del gen o producir un cierto fenotipo. Estos términos también se refieren a modificaciones de los fragmentos de ácidos nucleicos de la presente invención, tales como deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos, que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con relación al fragmento inicial no modificado. Por tanto, se entiende, según apreciarán los expertos en la técnica, que la invención incluye más de las secuencias ejemplares específicas.

Las secuencias de ácidos nucleicos que son homólogas con las secuencias ejemplificadas en la presente, o con cualquier porción de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente y que son funcionalmente equivalentes con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente, pueden hibridarse, bajo condiciones moderadamente rigurosas (por ejemplo, 0,5x SSC, SDS al 0,1%, 60 °C) con las secuencias ejemplificadas en la presente, o con cualquier porción de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente y que sean funcionalmente equivalentes a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente.

La "degeneración de codones" se refiere a la naturaleza del código genético, que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. Por consiguiente, la presente invención se refiere a cualquier fragmento de ácido nucleico que codifica toda la secuencia de aminoácidos que codifica el presente polipéptido euglenoide, según se indica en SEQ ID NO:2. Los expertos en la técnica conocen el "sesgo de codones" que muestra una célula hospedante específica en la utilización de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido concreto. Por tanto, cuando se sintetiza un gen para una mayor expresión en una célula hospedante, resulta deseable diseñar el gen de forma que su frecuencia de utilización de codones se aproxime a la frecuencia de la utilización de codones preferida de la célula hospedante.

"Sintetizado de modo químico", con relación a una secuencia de ADN, significa que los componentes nucleotídicos se ensamblaron *in vitro*. La síntesis química manual del ADN puede realizarse utilizando procedimientos bien establecidos, o la síntesis química automática puede realizarse utilizando una de una serie de máquinas disponibles en el mercado. Pueden sintetizarse "genes sintéticos" a partir de bloques básicos de oligonucleótidos que se sintetizan de modo químico utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos bloques básicos se acoplan y aparean para formar segmentos de genes que después se ensamblan enzimáticamente para construir el gen completo. Por consiguiente, los genes pueden adaptarse para una expresión óptima de los genes basándose en la optimización de secuencias de nucleótidos para reflejar el sesgo de codones de la célula hospedante. Los expertos en la técnica apreciarán la probabilidad de que se produzca con éxito la expresión del gen si la utilización de los codones está sesgada hacia los codones preferidos por el hospedante. La determinación de los codones preferidos puede basarse en una investigación de los genes derivados de la célula hospedante, cuando esté disponible la información de la secuencia.

Un "gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, y puede referirse a la región codificadora sola o puede incluir secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificadoras) y suceden (secuencias 3' no codificadoras) a la secuencia codificadora. Un "gen nativo" se refiere a un gen según se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. Un "gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la que se encuentra en la naturaleza. Un "gen endógeno" se refiere al gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen que es introducido en el organismo hospedante mediante transferencia de genes. Los genes

extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, genes nativos introducidos en una nueva localización dentro del hospedante nativo, o genes quiméricos. Un “transgén” es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. Un “gen con codones optimizados” es un gen cuya frecuencia de utilización de codones se ha diseñado para que imite la frecuencia de la utilización de codones preferida de la célula hospedante.

Una “secuencia codificadora” se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Las “secuencias reguladoras adecuadas” se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias 5' no codificadoras), dentro, o cadena abajo (secuencias 3' no codificadoras) de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias conductoras de la traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de la poliadenilación, sitios de procesamiento del ARN, sitios de unión a efectores y estructuras de tallo-bucle.

El término “alelo” se refiere a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus concreto sobre un cromosoma. Cuando todos los alelos presentes en un locus concreto sobre un cromosoma son iguales, entonces la planta es homocigótica en ese locus. Si los alelos presentes en un locus concreto sobre un cromosoma son diferentes, entonces esa planta es heterocigótica en ese locus.

Un “promotor” se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN funcional. En general, una secuencia codificadora se localiza 3' con respecto a una secuencia de promotor. Los promotores pueden proceder en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que provocan que un gen se exprese en la mayoría de los tipos celulares la mayoría de las veces se denominan habitualmente “promotores constitutivos”. También se reconoce que, puesto que en la mayoría de los casos, los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido por completo, fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener idéntica actividad promotora.

Una secuencia de promotor puede consistir en elementos proximales y elementos cadena arriba más distales, denominándose a menudo estos últimos potenciadores. Por consiguiente, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad de promotores, y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o la especificidad de tejido de un promotor. Constantemente se están descubriendo nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales, pudiéndose encontrar numerosos ejemplos en la compilación por Okamoto, J.K., y Goldberg, R.B., *Biochemistry of Plants*, 15:1-82 (1989).

Una “secuencia conductora de la traducción” se refiere a una secuencia polinucleotídica localizada entre la secuencia del promotor de un gen y la secuencia codificadora. La secuencia conductora de la traducción está presente en el ARNm totalmente procesado cadena arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia conductora de la traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario a ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficacia de la transcripción. Se han descrito ejemplos de secuencias conductoras de la traducción (Turner, R. y Foster, G.D., *Mol. Biotechnol.*, 3:225-236 (1995)).

Las expresiones “secuencias 3' no codificadoras” y “terminador de la transcripción” se refieren a secuencias de ADN localizadas cadena abajo de una secuencia codificadora. Estas incluyen secuencia de reconocimiento de la poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o la expresión de genes. La señal de poliadenilación habitualmente se caracteriza por afectar a la adición de tramos de poli(ácido adenílico) al extremo 3' del precursor de ARNm. La región 3' puede influir en la transcripción, el procesamiento del ARN o la estabilidad, o la traducción de la secuencia codificadora asociada.

Un “transcrito de ARN” se refiere al producto que resulta de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina el transcrito primario, o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcrito primario y se denomina ARN maduro. “ARN mensajero” o “ARNm” se refiere al ARN que no tiene intrones y que puede ser traducido a una proteína por la célula. “ADNc” se refiere a un ADN bicatenario que es complementario y se deriva de ARNm. Un ARN “sentido” se refiere a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y así también puede ser traducido a una proteína por la célula. “ARN antisentido” se refiere a un transcrito de ARN que es complementario con todo o una parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana (patente de EEUU 5.107.065; publicación PCT n.º WO 99/28508). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito del gen específico, es decir, en la secuencia 5' no codificadora, la secuencia 3' no codificadora, o la secuencia codificadora. “ARN funcional” se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozimas, u otro ARN que no sea traducido y siga teniendo un efecto sobre los procesos celulares.

La expresión “unido operablemente” se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos sobre un único fragmento de ácido nucleico de forma que la función de una es afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está

unido operablemente con una secuencia codificadora cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden estar unidas operablemente a secuencias reguladoras en la orientación sentido o antisentido.

- 5 El término "expresión", tal como se emplea en la presente, se refiere a la transcripción y la acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado de los fragmentos de ácidos nucleicos de la invención. La expresión también puede referirse a la traducción de ARNm en un polipéptido.

- 10 Una proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado de modo postraduccional, es decir, un polipéptido del que se ha retirado cualquier pre- o propéptido presente en el producto de la traducción primario. Una proteína "precursora" se refiere al producto primario de la traducción de ARNm, es decir, con los pre- y propéptidos aún presentes. Los pre- y propéptidos pueden ser señales de localización intracelular (pero no se limitan a estas).

- 15 Una "transformación" se refiere a la transferencia de una molécula de ácido nucleico hacia un organismo hospedante, que resulta en una herencia genéticamente estable. La molécula de ácido nucleico puede ser un plásmido que se replica de forma autónoma, por ejemplo, o puede integrarse en el genoma del organismo hospedante. Los organismos hospedantes que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformado se denominan organismos "transgénicos", "recombinantes" o "transformados".

- 20 Los términos "plásmido", "vector" y "módulo" se refieren a un elemento extracromosómico que a menudo porta genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente están en forma de fragmentos de ADN bicatenario circular. Estos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración en el genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivado de cualquier fuente, en las que una serie de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado para producir una construcción exclusiva que es capaz de introducir un fragmento de promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado, junto con la secuencia 3' no traducida apropiada, en una célula. Un "módulo de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que permiten una expresión potenciada de este gen en un hospedante extraño.

- 25 La expresión "porcentaje de identidad", tal como se conoce en el técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre las secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, según se determina mediante el apareamiento entre las hebras de dichas secuencias. La "identidad" y la "similitud" pueden ser calculadas con facilidad mediante métodos conocidos, que incluyen pero no se limitan a los descritos en: 1.) Computational Molecular Biology (Lesk, A.M., ed.), Oxford University, NY (1988); 2.) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D.W., ed.), Academic, NY (1993); 3.) Computer Analysis of Sequence Data, parte I (Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds.), Humana, NJ (1994); 4.) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.), Academic (1987); y, 5.) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), Stockton, NY (1991).

- 35 Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para producir el mejor apareamiento entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los alineamientos de secuencias y los cálculos del porcentaje de identidad pueden realizarse utilizando el programa MegAlign™ del paquete bioinformático de LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Se realizan múltiples alineamientos de las secuencias utilizando el "método de alineamiento Clustal", que incluye varias variedades del algoritmo, que incluyen el "método de alineamiento Clustal V", que se corresponde con el método de alineamiento denominado Clustal V (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. *et al.*, Comput. Appi. Biosci., 8:189-191 (1992)) y que se encuentra en el programa MegAlign™ del paquete bioinformático de LASERGENE (DNASTAR Inc.). Para múltiples alineamientos, los valores por defecto se corresponden con una PENALIZACIÓN DE HUECO = 10 y una PENALIZACIÓN DE LONGITUD DE HUECO = 10. Los parámetros por defecto para alineamientos apareados y el cálculo del porcentaje de identidad de secuencias de proteínas utilizando el método Clustal V son KTUPLE = 1, PENALIZACIÓN DE HUECO = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES GUARDADAS = 5. Para ácidos nucleicos, estos parámetros son KTUPLE = 2, PENALIZACIÓN DE HUECO = 5, VENTANA = 4 y DIAGONALES GUARDADAS = 4. Después del alineamiento de las secuencias utilizando el programa Clustal V, es posible obtener un "porcentaje de identidad" visualizando la tabla de "distancias de secuencias" en el mismo programa. Además, el "método de alineamiento Clustal W" está disponible y se corresponde con el método de alineamiento denominado Clustal W (descrito por Higgins y Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. *et al.*, Comput. Appi. Biosci., 8:189-191(1992)) y que se encuentra en el programa MegAlign™ v6.1 del paquete bioinformático de LASERGENE (DNASTAR Inc.). Los parámetros por defecto para múltiples alineamientos se corresponden con una PENALIZACIÓN DE HUECO = 10, PENALIZACIÓN DE LONGITUD DE HUECO = 0,2, retraso de secs. divergentes (%) = 30, peso de transición de ADN = 0,5, matriz de peso de proteínas = serie Gonnet, matriz de peso del ADN = IUB. Después del alineamiento de las secuencias utilizando el programa Clustal W, es posible obtener un "porcentaje de identidad" visualizando la tabla de "distancias de secuencias" en el mismo programa.

- 60 El "método de alineamiento BLASTN" es un algoritmo proporcionado por the National Center for Biotechnology Information (NCBI) para comparar secuencias de nucleótidos utilizando parámetros por defecto.

Los expertos en la técnica entienden bien que muchos niveles de identidad de secuencia son útiles para identificar polipéptidos de otras especies, en los que dichos polipéptidos tienen una función o actividad idéntica o similar. Fragmentos de ácidos nucleicos adecuados codifican polipéptidos que son al menos aproximadamente 70% idénticos, preferiblemente al menos aproximadamente 75% idénticos, y más preferiblemente al menos aproximadamente 80% idénticos a las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente. Los fragmentos de ácidos nucleicos preferidos codifican secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 85% idénticos a las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente. Los fragmentos de ácidos nucleicos más preferidos codifican secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 90% idénticas a las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente. Los fragmentos de ácidos nucleicos aún más preferidos codifican secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 95% idénticas a las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente. Aunque los intervalos preferidos se han descrito anteriormente, cualquier número entero que represente la identidad de aminoácidos desde 39% al 100% puede ser útil en la descripción de la invención, tal como 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Los fragmentos de ácidos nucleicos adecuados no solo tienen las anteriores homologías sino que generalmente codifican un polipéptido que tiene al menos 50 aminoácidos, preferiblemente al menos 100 aminoácidos, más preferiblemente al menos 150 aminoácidos, aún más preferiblemente al menos 200 aminoácidos, y lo más preferiblemente al menos 250 aminoácidos. Los polinucleótidos de la invención son como se define en las reivindicaciones 1 y 2.

La expresión “dominio conservado” o el término “motivo” significa un conjunto de aminoácidos conservados en posiciones específicas a lo largo de una secuencia alineada de proteínas relacionadas desde el punto de vista evolutivo. Aunque los aminoácidos en otras posiciones pueden variar entre proteínas homólogas, los aminoácidos que están muy conservados en posiciones específicas indican aminoácidos que son fundamentales para la estructura, la estabilidad o la actividad de una proteína. Debido a que se identifican por su alto grado de conservación en las secuencias alineadas de una familia de homólogos de proteínas, pueden utilizarse como identificadores, o “firmas”, para determinar si una proteína con una secuencia recién determinada pertenece a una familia de proteínas previamente identificada.

La expresión “software de análisis de secuencia” se refiere a cualquier algoritmo o programa de software informático que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. El “software de análisis de secuencia” puede estar disponible en el mercado o desarrollarse de modo independiente. El software de análisis de secuencia típico incluirá, aunque no se limita a: 1.) el paquete de programas GCG (Wisconsin Package versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2.) BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4.) Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); y; 5.) el programa FASTA que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (W.R. Pearson, Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.] (1994), fecha de la convocatoria 1992, 111-120, editor(es): Suhai, Sandor, Plenum, Nueva York, NY). Dentro del contexto de esta solicitud, se entenderá que cuando se emplea un software de análisis de secuencias para un análisis, los resultados del análisis se basarán en los “valores por defecto” del programa indicado, a menos que se indique lo contrario. Tal como se emplean en la presente, los “valores por defecto” significan cualquier conjunto de valores de parámetros que se cargan originariamente con el software cuando se inicia por primera vez. Con respecto al algoritmo BLASTP utilizado en la presente, los parámetros por defecto incluirán las frecuencias de aminoácidos de Robinson y Robinson (Robinson A.B., Robinson L.R., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 88:8880-8884 (1991)), la matriz de puntuación BLOSUM62 y el coste de hueco $\Delta(g) = 11 + g$.

La expresión “partes de plantas” incluye tejidos diferenciados y no diferenciados que incluyen, pero no se limitan a los siguientes: raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivos (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones y tejido de callo). El tejido vegetal puede estar en la planta o en un cultivo de órganos, tejidos o células vegetales.

La expresión “órgano de la planta” se refiere a un tejido o grupo de tejidos vegetales que constituyen una parte morfológica y funcionalmente diferenciada de una planta.

El término “genoma” se refiere a lo siguiente: (1) el complemento completo de material genético (genes y secuencias no codificadoras) presente en cada célula de un organismo, o virus u orgánulo; (2) un conjunto completo de cromosomas heredado como una unidad (haploide) de un progenitor.

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales utilizadas en la presente son muy conocidas en la técnica y se describen en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) (en lo sucesivo “Maniatis”); en Silhavy, T.J., Bannan, M.L. y Enquist, L.W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984); y en Ausubel, F.M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987).

Las expresiones “construcción recombinante”, “construcción de expresión”, “construcción quimérica”, “construcción”

y “construcción de ADN recombinante” se emplean de modo intercambiable en la presente. Una construcción recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que se derivan de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Esta construcción puede utilizarse por sí misma o puede utilizarse junto con un vector. Si se emplea un vector, entonces la elección del vector depende del procedimiento que se va a utilizar para transformar células hospedantes, tal como saben los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un vector plasmídico. Los expertos en la técnica son conscientes de los elementos genéticos que deben estar presentes sobre el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito células hospedantes que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácidos nucleicos aislados de la invención. Los expertos en la técnica también reconocerán que diferentes acontecimientos de transformación independientes producirán diferentes niveles y patrones de expresión (Jones *et al.*, EMBO J., 4:2411-2418 (1985); De Almeida *et al.*, Mol. Gen. Genetics, 218:78-86 (1989)), y así deben seleccionarse múltiples acontecimientos para obtener líneas que muestren el nivel de expresión y el patrón deseados. Esta selección puede realizarse mediante un análisis Southern del ADN, un análisis Northern de la expresión de ARNm, un análisis de inmunotransferencia de la expresión de proteínas, o un análisis fenotípico, entre otros.

El término “expresión”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la producción de un producto final funcional (por ejemplo, un ARNm o una proteína (precursora o madura)).

El término “introducido” significa proporcionar un ácido nucleico (por ejemplo, una construcción de expresión) o una proteína a una célula. Introducido incluye la referencia a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota, en el que el ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula, e incluye la referencia al suministro transitorio de un ácido nucleico o una proteína a la célula. Introducido incluye la referencia a métodos de transformación estable o transitoria, así como a la reproducción sexual. Así, “introducido”, en el contexto de insertar un fragmento de ácido nucleico (por ejemplo, una construcción de ADN recombinante/construcción de expresión) en una célula significa la “transfección” o “transformación” o “transducción”, e incluye la referencia a la incorporación de un fragmento de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota, en la que el fragmento de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo, o expresarse de modo transitorio (por ejemplo, ARNm transfectado).

Una proteína “madura” se refiere a un polipéptido procesado de modo postraducciona (es decir, un polipéptido en el que se ha retirado cualquier pre- o propéptido presente en el producto de la traducción primaria). Una proteína “precursora” se refiere al producto primario de la traducción a ARNm (es decir, con los pre- y propéptidos aún presentes). Los pre- y propéptidos pueden ser, aunque no se limitan a señales de localización intracelulares.

La “transformación estable” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un genoma de un organismo hospedante, que incluyen los genomas nuclear y organular, que da como resultado una herencia genéticamente estable. Por contraste, una “transformación transitoria” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al núcleo o a un orgánulo que contienen ADN de un organismo hospedante, dando como resultado la expresión génica sin integración ni herencia estable. Los organismos hospedantes que contienen los fragmentos de ácidos nucleicos transformados se denominan organismos “transgénicos”.

Tal como se emplea en la presente, “transgénico” se refiere a una planta o una célula que comprende, en su genoma, un polinucleótido heterólogo. Preferiblemente, el polinucleótido heterólogo está integrado de modo estable en el genoma, de modo que el polinucleótido se transmite a las generaciones sucesivas. El polinucleótido heterólogo puede estar integrado en el genoma por sí solo o como parte de una construcción de expresión. Transgénico, tal como se emplea en la presente, incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de una planta, o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de un ácido nucleico heterólogo que incluye estos transgénicos inicialmente alterados de este modo, así como los creados mediante cruzamientos sexuales o propagación asexual a partir del transgénico inicial. El término “transgénico”, tal como se emplea en la presente, no incluye la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) mediante métodos de cruzamiento de plantas convencionales o mediante acontecimientos naturales, tales como fertilización cruzada aleatoria, infección vírica no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante, o mutación espontánea.

La “inhibición antisentido” se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. La “cosupresión” se refiere a la producción de transcritos de ARN sentido capaces de suprimir la expresión de genes endógenos o extraños sustancialmente similares o idénticos (patente de EEUU n.º 5.231.020). Las construcciones de cosupresión en plantas han sido previamente diseñadas enfocándose en la sobreexpresión de una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con un ARNm endógeno, en la orientación sentido, que da como resultado la reducción de todo el ARN que presenta homología con la secuencia sobreexpresada (Vaucheret *et al.*, Plant J., 16:651-659 (1998); Gura, Nature, 404:804-808 (2000)). La eficacia global de este fenómeno es baja, y el grado de reducción del ARN varía mucho. Un trabajo más reciente ha descrito el uso de estructuras de “horquilla” que incorporan todo o parte de una secuencia codificadora de ARNm en una orientación complementaria que produce una estructura de “tallo-bucle” potencial para el ARN expresado (publicación PCT n.º

WO 99/53050, publicada el 21 de octubre, 1999; publicación PCT n.º WO 02/00904, publicada el 3 de enero, 2002). Esto aumenta la frecuencia de la cosupresión en las plantas transgénicas recuperadas. Otra variación describe el uso de secuencias víricas vegetales para dirigir la supresión, o "silenciamiento", de secuencias que codifican ARNm proximales (publicación PCT n.º WO 98/36083, publicada el 20 de agosto, 1998). Aún no se ha aclarado el mecanismo de estos dos fenómenos de cosupresión, aunque algunas pruebas genéticas han empezado a desentrañar esta compleja situación (Elmayan *et al.*, Plant Cell, 10:1747-1757 (1998)).

Biosíntesis microbiana de ácidos grasos y triacilglicéridos: una vision general

En general, la acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos se activa en respuesta a la proporción global de carbono a nitrógeno en el medio de crecimiento. Este proceso, que conduce a la síntesis *de novo* de palmitato libre (16:0) en microorganismos oleaginosos, se describe en detalle en la publicación PCT n.º WO 2004/101757. El palmitato es el precursor de derivados de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena más larga, que se forman a través de la acción de elongasas y desaturasas (figura 1).

Los TAG (la principal unidad de almacenamiento de ácidos grasos) se forman mediante una serie de reacciones que implican: 1.) la esterificación de una molécula de acil-CoA a glicerol-3-fosfato a través de una aciltransferasa para producir ácido lisofosfatídico; 2.) la esterificación de una segunda molécula de acil-CoA a través de una aciltransferasa para producir 1,2-diacilglicerol fosfato (denominado habitualmente ácido fosfatídico); 3.) la eliminación de un fosfato mediante la acción de un ácido fosfatídico fosfatasa para producir 1,2-diacilglicerol (DAG); y 4.) la adición de un tercer ácido graso mediante la acción de una aciltransferasa para formar TAG. Puede incorporarse un amplio espectro de ácidos grasos a los TAG, que incluyen ácidos grasos saturados e insaturados y ácidos grasos de cadena corta y de cadena larga.

Biosíntesis de ácidos grasos omega

El proceso metabólico en el que ácido oleico se convierte en ácidos grasos omega-3/omega-6 implica el alargamiento de la cadena carbonada mediante la adición de átomos de carbono y la desaturación de la molécula a través de la adición de dobles enlaces. Esto requiere una serie de enzimas de desaturación y alargamiento especiales presentes en la membrana del retículo endoplásmico. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 1 y se describe a continuación, a menudo existen múltiples vías alternativas para la producción de un ácido graso omega-3/omega-6 específico.

De modo específico, todas las vías requieren la conversión inicial del ácido oleico en LA, el primero de los ácidos grasos omega-6, por medio de una delta-12 desaturasa. Después, utilizando la vía de "delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa", los ácidos grasos omega-6 se forman como sigue: (1) el LA se convierte en GLA por medio de una delta-6 desaturasa; (2) el GLA se convierte en DGLA por medio de una C_{18/20} elongasa; y (3) el DGLA se convierte en ARA por medio de una delta-6 desaturasa. Como alternativa, la "vía de delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa" puede utilizarse para la formación de ácidos grasos omega-3 como sigue: (1) el LA se convierte en ALA, el primero de los ácidos grasos omega-3, por medio de una delta-15 desaturasa; (2) el ALA se convierte en STA por medio de una delta-6 desaturasa; (3) el STA se convierte en ETA por medio de una C_{18/20} elongasa; (4) el ETA se convierte en EPA por medio de una delta-5 desaturasa; (5) el EPA se convierte en DPA por medio de una C_{20/22} elongasa; y (6) el DPA se convierte en DHA por medio de una delta-4 desaturasa. Opcionalmente, los ácidos grasos omega-6 pueden convertirse en ácidos grasos omega-3; por ejemplo, se producen ETA y EPA a partir de DGLA y ARA, respectivamente, por medio de la actividad delta-17 desaturasa.

Otras vías para la biosíntesis de ácidos grasos omega-3/omega-6 utilizan una delta-9 elongasa y una delta-8 desaturasa. De modo más específico, LA y ALA pueden convertirse en EDA y ETrA, respectivamente, por medio de una delta-9 elongasa; después, una delta-8 desaturasa convierte EDA a DGLA y/o ETrA a ETA.

Se contempla que las funcionalidades concretas requeridas para ser expresadas en un organismo hospedante específico para la producción de ácidos grasos omega-3/omega-6 dependerán de la célula hospedante (y su perfil de PUFA nativo y/o perfil de desaturasa/elongasa), la disponibilidad del sustrato, y el producto o productos finales deseados. Los expertos en la técnica serán capaces de identificar diversos genes candidatos que codifican cada una de las enzimas deseadas para la biosíntesis de ácidos grasos omega-3/omega-6. Las secuencias de desaturasas y elongasas útiles pueden obtenerse de cualquier fuente, por ejemplo, pueden aislarse a partir de una fuente natural (de bacterias, algas, hongos, plantas, animales, etc.), pueden producirse a través de una vía semisintética, o pueden sintetizarse *de novo*. Aunque la fuente concreta de los genes de desaturasa y elongasa introducidos en el hospedante no es crítica, las consideraciones para elegir un polipéptido específico que tenga actividad desaturasa o elongasa incluyen: 1.) la especificidad de sustrato del polipéptido; 2.) si el polipéptido, o uno de sus componentes, es una enzima limitante de la velocidad; 3.) si la desaturasa o elongasa es fundamental para la síntesis de un PUFA deseado; y/o 4.) los cofactores requeridos por el polipéptido. El polipéptido expresado preferiblemente tiene unos parámetros compatibles con el entorno bioquímico de su localización en la célula hospedante (véase la publicación PCT n.º WO 2004/101757 para más detalles).

En otras realizaciones, también será útil considerar la eficacia de conversión de cada desaturasa y/o elongasa concreta. De modo más específico, puesto que cada enzima raramente actúa con 100% de eficacia para convertir el

sustrato en producto, el perfil final de lípidos de los aceites no purificados producidos en una célula hospedante generalmente será una mezcla de diversos PUFA, formada por el ácido graso omega-3/omega-6 deseado, así como diversos PUFA intermedios corriente arriba. Así, la eficacia de conversión de cada enzima también es una variable a considerar cuando se optimiza la biosíntesis de un ácido graso deseado.

5 Teniendo en mente cada una de las anteriores consideraciones, pueden identificarse los genes candidatos con las actividades desaturasa y elongasa apropiadas (por ejemplo, delta-6 desaturasas, C_{18/20} elongasas, delta-5 desaturasas, delta-17 desaturasas, delta-15 desaturasas, delta-9 desaturasas, delta-12 desaturasas, C_{14/16} elongasas, C_{16/18} elongasas, delta-9 elongasas, delta-8 desaturasas, delta-4 desaturasas y C_{20/22} elongasas) según la bibliografía pública (por ejemplo, GenBank), la bibliografía de patentes, y el análisis experimental de organismos
10 que tienen la capacidad de producir PUFA. Estos genes serán adecuados para su introducción en un organismo hospedante específico, para permitir o potenciar la síntesis de PUFA por el organismo.

Identificación de la secuencia de una nueva delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*

En la presente invención, se ha aislado una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) de *Euglena gracilis* que codifica una delta-5 desaturasa (SEQ ID NO:2), denominada en la presente "EgD5".

15 La comparación de las secuencias de aminoácidos deducida y de bases nucleotídicas de EgD5 con bases de datos públicas revela que las secuencias conocidas más similares son aproximadamente 39% idénticas a la secuencia de aminoácidos de EgD5 indicada en la presente a lo largo de una longitud de 449 aminoácidos utilizando un método de alineamiento ClustalW. Los fragmentos de aminoácidos de la invención son al menos aproximadamente 90% idénticos a las secuencias de la presente, y las secuencias que son al menos aproximadamente 90%-95% idénticas
20 son las más preferidas. De forma similar, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican EgD5 preferidas que se corresponden con el presente ORF son las que codifican proteínas activas y son al menos aproximadamente 90% idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos de EgD5 indicadas en la presente, y las secuencias que son al menos aproximadamente 90%-95% idénticas son las más preferidas.

En otras realizaciones, la presente secuencia de desaturasa EgD5 puede someterse a una optimización de codones para la expresión en un organismo hospedante concreto. Tal como se conoce en la técnica, esto puede ser un
25 medio útil para optimizar aún más la expresión de la enzima en un hospedante alternativo, puesto que el uso de codones preferidos por el hospedante puede potenciar sustancialmente la expresión del gen extraño que codifica el polipéptido. En general, los codones preferidos por el hospedante pueden ser determinados dentro de una especie hospedante concreta estudiando la utilización de codones en proteínas (preferiblemente las que se expresan en mayor cantidad) y determinando qué codones se utilizan con mayor frecuencia. Después, la secuencia codificadora
30 para un polipéptido de interés que tiene, por ejemplo, actividad desaturasa, puede sintetizarse en su totalidad o en parte utilizando los codones preferidos en la especie hospedante.

En una realización preferida de la presente invención, EgD5 fue sometida a una optimización de codones para la expresión en *Yarrowia lipolytica*. Esto fue posible determinando, en primer lugar, el perfil de utilización de codones de *Yarrowia lipolytica* (véase la publicación PCT n.º WO 04/101757 y la patente de EEUU 7.125.672) e identificando
35 los codones preferidos. Después, para una mayor optimización de la expresión de genes en *Y. lipolytica*, se determinó la secuencia consenso alrededor del codón de inicio "ATG". Esta optimización produjo una modificación de 196 pb de la región codificadora de 1350 pb (14,5%) y una optimización de 189 codones del total de 449 codones (42%). Ninguna de las modificaciones en el gen con codones optimizados ("EgD5S", SEQ ID NO:3) cambió la
40 secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (SEQ ID NO:2). Tal como se describe en el ejemplo 11, el gen con codones optimizados era 36% más eficaz para desaturar DGLA a ARA que el gen de tipo salvaje, cuando se expresa en *Y. lipolytica*.

Los expertos en la técnica serán capaces de utilizar las indicaciones de la presente para crear diversas otras proteínas de delta-5 desaturasa con codones optimizados adecuadas para la expresión óptima en otros
45 hospedantes (es decir, distintos de *Y. lipolytica*), basándose en la secuencia de EgD5 de tipo salvaje. Por consiguiente, la presente invención se refiere a cualquier proteína de delta-5 desaturasa con codones optimizados que se deriva de EgD5 de tipo salvaje (es decir, codificada por SEQ ID NO:2). Esto incluye, pero no se limita a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:3, que codifica una proteína de delta-5 desaturasa sintética (es decir, EgD5S) que se sometió a una optimización de codones para su expresión en *Yarrowia lipolytica*.

Identificación y aislamiento de homólogos

Cualquiera de las presentes secuencias de desaturasas (es decir, EgD5, EgD5S), o sus porciones, puede utilizarse para seleccionar homólogos de delta-5 desaturasa en la misma especie bacteriana, algal, fúngica, euglenoide o vegetal o en otra distinta, utilizando un software de análisis de secuencia. En general, estos softwares informáticos
50 aparean secuencias similares asignando un grado de homología a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones.

Como alternativa, cualquiera de las presentes secuencias de desaturasas, o sus porciones, también pueden emplearse como reactivos de hibridación para la identificación de homólogos de delta-5. Los componentes básicos de un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos incluyen una sonda, una muestra sospechosa de contener el gen o

el fragmento del gen de interés, y un método de hibridación específica. Las sondas de la presente invención generalmente son secuencias de ácidos nucleicos monocatenarios que son complementarios con las secuencias de ácidos nucleicos que se van a detectar. Las sondas son "hibridables" con la secuencia de ácido nucleico que se va a detectar. Aunque la longitud de la sonda puede variar de 5 bases a decenas de miles de bases, generalmente será adecuada una longitud de la sonda de aproximadamente 15 bases a aproximadamente 30 bases. Solo parte de la molécula de la sonda debe ser complementaria con la secuencia de ácido nucleico que se va a detectar. Además, no es necesario que la complementariedad entre la sonda y la secuencia diana sea perfecta. La hibridación se produce entre moléculas imperfectamente complementarias, con el resultado de que cierta fracción de las bases en la región hibridada no están apareadas con la base complementaria apropiada.

Los métodos de hibridación están bien definidos. Generalmente, la sonda y la muestra deben mezclarse bajo condiciones que permiten la hibridación del ácido nucleico. Esto implica poner en contacto la sonda y la muestra en presencia de una sal inorgánica u orgánica con la concentración y las condiciones de temperaturas apropiadas. La sonda y la muestra de los ácidos nucleicos deben ponerse en contacto durante un tiempo lo suficientemente largo como para que se produzca cualquier posible hibridación entre la sonda y la muestra de ácidos nucleicos. La concentración de la sonda o la diana en la mezcla determinará el tiempo necesario para que se produzca la hibridación. Cuanto mayor sea la concentración de sonda o diana, más corto será el tiempo de incubación necesario. Opcionalmente, puede añadirse un agente caotrópico (por ejemplo, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, tetracloroacetato de litio, perclorato de sodio, tetracloroacetato de rubidio, yoduro de potasio, trifluoroacetato de cesio). Si se desea, puede añadirse formamida a la mezcla de hibridación, generalmente al 30-50% (en v/v).

Pueden emplearse diversas disoluciones de hibridación. Generalmente, estas comprenden de aproximadamente 20% al 60% en volumen, preferiblemente 30%, de un disolvente orgánico polar. Una disolución de hibridación habitual emplea aproximadamente 30-50% en v/v de formamida, cloruro de sodio aproximadamente 0,15 a 1 M, tampones aproximadamente 0,05 a 0,1 M (por ejemplo, citrato de sodio, Tris-HCl, PIPES o HEPES (intervalo de pH de aproximadamente 6-9)), detergente de aproximadamente 0,05% al 0,2% (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio), o EDTA entre 0,5-20 mM, FICOLL (Pharmacia Inc.) (aproximadamente 300-500 kdal), polivinilpirrolidona (aproximadamente 250-500 kdal), y albúmina de suero. En una disolución de hibridación típica también se incluyen ácidos nucleicos vehículo no marcados de aproximadamente 0,1 a 5 mg/ml, ADN nucleico fragmentado (por ejemplo, ADN de timo de ternera o de esperma de salmón, o ARN de levadura), y opcionalmente glicina de aproximadamente 0,5% al 2% en p/v. También pueden incluirse otros aditivos, tales como agentes de exclusión de volumen que incluyen una diversidad de agentes hidrosolubles o hinchables en agua polares (por ejemplo, polietilenglicol), polímeros aniónicos (por ejemplo, poliacrilato o polimetilacrilato) y polímeros sacarídicos aniónicos (por ejemplo, sulfato de dextrano).

La hibridación de ácidos nucleicos puede adaptarse a una diversidad de formatos de ensayo. Uno de los más adecuados es el formato de ensayo de "sandwich". El ensayo de sandwich es particularmente adaptable a la hibridación bajo condiciones no desnaturalizantes. Un componente principal de un ensayo de tipo sandwich es un soporte sólido. El soporte sólido lleva adsorbido sobre él o unido covalentemente a él una sonda de ácido nucleico inmovilizada que no está marcada y que es complementaria con una porción de la secuencia.

En otras realizaciones, cualquiera de los fragmentos de ácidos nucleicos de delta-5 desaturasa descritos en la presente (o cualquiera de sus homólogos identificados) puede utilizarse para aislar genes que codifican proteínas homólogas de la misma especie bacteriana, algal, fúngica, euglenoide o vegetal o de otra distinta. El aislamiento de genes homólogos empleando protocolos dependientes de secuencia es muy conocida en la técnica. Los ejemplos de protocolos dependientes de secuencia incluyen, pero no se limitan a: 1.) métodos de hibridación de ácidos nucleicos; 2.) métodos de amplificación de ADN y ARN, según se ejemplifica por los diversos usos de las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Mullis *et al.*, patente de EEUU 4.683.202; reacción en cadena de la ligasa (LCR), Tabor, S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:1074 (1985); o amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), Walker, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992)); y 3.) métodos de construcción y selección de bancos mediante complementación.

Por ejemplo, los genes que codifican proteínas o polipéptidos similares a las delta-5 desaturasa descritas en la presente pueden aislarse directamente utilizando la totalidad o una porción de los presentes fragmentos de ácidos nucleicos como sondas de hibridación de ADN para seleccionar banco procedentes, por ejemplo, de cualquier levadura u hongo deseado, utilizando una metodología muy conocida por los expertos en la técnica (en la que se prefieren los organismos que producen ARA (o sus derivados)). Las sondas oligonucleotídicas específicas basadas en las presentes secuencias de ácidos nucleicos pueden diseñarse y sintetizarse mediante métodos conocidos en la técnica (Maniatis, *supra*). Además, las secuencias completas pueden utilizarse directamente para sintetizar sondas de ADN mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, marcaje de ADN con sondas aleatorias, traducción de mella o técnicas de marcaje terminal), o sondas de ARN utilizando sistemas de transcripción *in vitro* disponibles. Además, pueden diseñarse cebadores específicos y utilizarse para amplificar una parte (o la longitud completa) de las presentes secuencias. Los productos de la amplificación resultantes pueden marcarse directamente durante las reacciones de amplificación, o marcarse después de las reacciones de amplificación, y emplearse como sondas para aislar fragmentos de ADN de longitud completa bajo condiciones de rigurosidad apropiadas.

Generalmente, en las técnicas de amplificación de tipo PCR, los cebadores tienen secuencias diferentes y no son complementarios entre sí. Dependiendo de las condiciones de ensayo deseadas, las secuencias de los cebadores deben diseñarse para proporcionar una replicación eficaz y fiel del ácido nucleico diana. Los métodos para el diseño de cebadores de PCR son habituales y muy conocidos en la técnica (Thein y Wallace, "The use of oligonucleotides as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders", en *Human Genetic Diseases: A Practical Approach*, K.E. Davis ed. (1986), pp. 33-50, IRL, Herndon, VA; y Rychlik, W., en *Methods in Molecular Biology*, White, B.A. ed. (1993), vol. 15, pp. 31-39, PCR Protocols: Current Methods and Applications, Humana, Totowa, NJ).

En general, pueden utilizarse dos segmentos cortos de las presentes secuencias en los protocolos de la PCR para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos más largos que codifican genes homólogos a partir de ADN o ARN. También se puede realizar una PCR sobre un banco de fragmentos de ácidos nucleicos clonados, en la que la secuencia de un cebador se deriva de los presentes fragmentos de ácidos nucleicos, y la secuencia del otro cebador aprovecha la presencia de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' de los genes eucariotas que codifican ARNm precursor.

Como alternativa, la segunda secuencia de cebador puede basarse en secuencias derivadas del vector de clonación. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden seguir el protocolo RACE (Frohman *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 85:8998(1988)) para generar ADNc utilizando una PCR para amplificar copias de la región entre un único punto en el transcrito y el extremo 3' o 5'. Pueden diseñarse cebadores orientados en la dirección 3' y 5' a partir de las presentes secuencias. Utilizando sistemas 3' RACE o 5' RACE disponibles en el mercado (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), pueden aislarse fragmentos de ADNc 3' o 5' específicos (Ohara *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 86:5673 (1989); Loh *et al.*, *Science*, 243:217 (1989)).

En otras realizaciones, cualquiera de los fragmentos de ácidos nucleicos de delta-5 desaturasa descritos en la presente (o cualquiera de sus homólogos identificados) puede utilizarse para la creación de nuevas ácido graso desaturasas mejoradas. Tal como se conoce en la técnica, puede emplearse la mutagénesis y selección *in vitro*, la mutagénesis química, los métodos de "barajado de genes" u otros medios para obtener mutaciones de genes de desaturasas naturales. Como alternativa, pueden sintetizarse ácidos grasos mejorados mediante intercambio de dominios, en el que un dominio funcional de cualquiera de los fragmentos de ácidos nucleicos de delta-5 desaturasa descritos en la presente se intercambia por un dominio funcional en un gen de desaturasa alternativo para producir con ello una nueva proteína.

Métodos para la producción de diversos ácidos grasos omega-3 y/u omega-6

Se espera que la introducción de genes quiméricos que codifican las delta-5 desaturasas descritas en la presente (es decir, EgD5, EgD5S u otras enzimas mutantes, enzimas con codones optimizados o sus homólogos) bajo el control de los promotores apropiados, dará como resultado una mayor producción de ARA y/o EPA en el organismo hospedante transformado, respectivamente. Así, la presente invención incluye un método para la producción directa de PUFA que comprende exponer un sustrato de ácido graso (es decir, DGLA o ETA) a las enzimas desaturasas descritas en la presente (por ejemplo, EgD5, EgD5S), de modo que el sustrato se convierte en el producto de ácido graso deseado (es decir, ARA o EPA1, respectivamente).

En la presente se describe un método para la producción de ARA en una célula hospedante (por ejemplo, levadura oleaginosa, soja), en el que la célula hospedante comprende:

(i) una molécula de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido de delta-5 desaturasa que tiene al menos 39% de identidad cuando se compara con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:2, basándose en algoritmos BLASTP o métodos de alineamiento Clustal W; y

(ii) una fuente de un ácido dihomo- γ -linoleico;

en el que la célula hospedante se cultiva bajo condiciones tales que la delta-5 desaturasa se expresa y el DGLA se convierte en ARA, y en el que ARA se recupera opcionalmente.

Los expertos en la técnica reconocerán que la amplia gama de sustratos de la delta-5 desaturasa puede permitir además el uso de la enzima para la conversión de ETA a EPA. Por consiguiente, también se describe un método para la producción de EPA, en el que la célula hospedante comprende:

(i) una molécula de nucleótidos aislada que codifica un polipéptido de delta-5 desaturasa que tiene al menos 39% de identidad cuando se compara con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:2, basándose en algoritmos BLASTP o métodos de alineamiento Clustal W; y

(ii) una fuente de ácido eicosatetraenoico;

en el que la célula hospedante se cultiva bajo condiciones tales que la delta-5 desaturasa se expresa y el ETA se convierte en EPA, y en el que ETA se recupera opcionalmente. La invención proporciona métodos en los que se emplea el polinucleótido de la invención.

Cada gen de delta-5 desaturasa y su correspondiente producto de enzima descrito en la presente puede utilizarse de modo indirecto para la producción de ácidos grasos omega-3 (véase la publicación de patente de EEUU n.º 2005/0136519). La producción indirecta de PUFA omega-3/omega-6 se produce cuando el sustrato de ácido graso se convierte indirectamente en el producto de ácido graso deseado, a través de una etapa o etapas intermedias o una vía o vías intermedias. Así, se contempla que las delta-5 desaturasas descritas en la presente (por ejemplo, EgD5, EgD5S u otras enzimas mutantes, enzimas con codones optimizados o sus homólogos) pueden expresarse junto con otros genes que codifican enzimas de la vía biosintética de PUFA (por ejemplo, delta-6 desaturasas, C_{18/20} elongasas, delta-17 desaturasas, delta-15 desaturasas, delta-9 desaturasas, delta-12 desaturasas, C_{14/16} elongasas, C_{16/18} elongasas, delta-9 elongasas, delta-8 desaturasas, delta-4 desaturasas, C_{20/22} elongasas) para producir mayores niveles de producción de ácidos grasos omega-3 de cadena más larga (por ejemplo, EPA, DPA y DHA). Los genes concretos incluidos dentro de un módulo de expresión concreto dependerán de la célula hospedante (y su perfil de PUFA y/o perfil de desaturasa/elongasa), la disponibilidad de sustrato y el producto o productos finales deseados.

También puede ser útil alterar la delta-5 desaturasa nativa del organismo hospedante, basándose en las secuencias completas descritas en la presente, el complemento de estas secuencias completas, porciones sustanciales de estas secuencias, desaturasas con codones optimizados derivadas de estas y las secuencias sustancialmente homólogas con estas.

Vectores, módulos y sistemas de expresión vegetales, y transformación

En una realización, esta invención se refiere a un gen quimérico que comprende cualquiera de los polinucleótidos de delta-5 desaturasa de la invención unido operablemente al menos a una secuencia reguladora adecuada para la expresión en una planta. Un promotor es un secuencia de ADN que dirige la maquinaria celular de una planta para que produzca ARN a partir de la secuencia codificadora contigua cadena abajo (3') del promotor. La región del promotor influye en la velocidad, la etapa del desarrollo y el tipo de célula en la cual se fabrica el transcrito de ARN del gen. El transcrito de ARN se procesa para producir ARNm que actúa como molde para la traducción de la secuencia de ARN en la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. La secuencia conductora 5' no traducida es una región del ARNm cadena arriba de la región codificadora de la proteína que puede desempeñar un papel en el inicio y la traducción del ARNm. La señal de poliadenilación/fin de la transcripción 3' es una región no traducida cadena abajo de la región codificadora de la proteína que actúa en la célula vegetal para provocar la terminación del transcrito de ARN y la adición de nucleótidos poliadenilados al extremo 3' del ARN.

El origen del promotor elegido para dirigir la expresión de la secuencia codificadora de delta-5 desaturasa no es importante, con la condición de que tenga la suficiente actividad transcripcional para llevar a cabo la invención mediante la expresión de ARNm traducible para los fragmentos de ácidos nucleicos deseados en el tejido del hospedante deseado en el momento adecuado. Pueden utilizarse promotores heterólogos o no heterólogos (es decir, endógenos) para practicar la invención. Por ejemplo, los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a la subunidad alfa prima del promotor de beta-conglicina, el promotor 3 del inhibidor de la tripsina de Kunitz, el promotor de anexina, el promotor de glicinina Gy1, la subunidad beta del promotor de beta-conglicina, el promotor de P34/Gly Bd m 30K, el promotor de albúmina, el promotor de Leg A1 y el promotor de Leg A2.

El promotor de anexina, o P34, se describe en la publicación PCT n.º WO 2004/071178 (publicada el 26 de agosto, 2004). El nivel de actividad del promotor de anexina es comparable al de muchos promotores fuertes conocidos, tales como: (1) el promotor de CaMV 35S (Atanassova *et al.*, Plant Mol. Biol., 37:275-285 (1998); Battraw y Hall, Plant Mol. Biol., 15:527-538 (1990); Holtorf *et al.*, Plant Mol. Biol., 29:637-646 (1995); Jefferson *et al.*, EMBO J., 6:3901-3907 (1987); Wilmink *et al.*, Plant Mol. Biol., 28:949-955 (1995)); (2) los promotores de oleosina de *Arabidopsis* (Plant *et al.*, Plant Mol. Biol., 25:193-205 (1994); Li, Texas A&M University Ph.D. tesis, pp. 107-128 (1997)); (3) los promotores de la proteína de extensión de la ubiquitina de *Arabidopsis* (Callis *et al.*, J Biol. Chem., 265(21):12486-12493 (1990)); (4) un promotor del gen de ubiquitina del tomate (Rollfinke *et al.*, Gene, 211(2):267-276 (1998)); (5) un promotor de la proteína del choque térmico de soja (Schoffl *et al.*, Mol Gen Genet., 217(2-3):246-253 (1989)); y (6) un promotor del gen de la histona H3 del maíz (Atanassova *et al.*, Plant Mol Biol., 37(2):275-285 (1989)).

Otra característica útil del promotor de anexina es su perfil de expresión en semillas en desarrollo. El promotor de anexina es más activo en semillas en desarrollo en etapas tempranas (antes de 10 días después de la polinización) y es muy quiescente en etapas posteriores. El perfil de expresión del promotor de anexina es diferente al de muchos promotores específicos de semilla, por ejemplo, promotores de proteínas de almacenamiento de semillas, que a menudo proporcionan una actividad mayor en etapas posteriores del desarrollo (Chen *et al.*, Dev. Genet., 10:112-122 (1989); Ellerstrom *et al.*, Plant Mol. Biol., 32:1019-1027 (1996); Keddle *et al.*, Plant Mol. Biol., 24:327-340 (1994); Plant *et al.* (*supra*); Li (*supra*)). El promotor de anexina tiene un perfil de expresión más convencional pero sigue siendo diferente de otros promotores específicos de semilla conocidos. Así, el promotor de anexina será un candidato muy atractivo cuando se desee la sobreexpresión, o la supresión, de un gen en embriones en una etapa temprana del desarrollo. Por ejemplo, puede resultar deseable sobreexpresar un gen que regula el desarrollo temprano del embrión o un gen implicado en el metabolismo antes de la maduración de la semilla.

Después de la identificación de un promotor apropiado adecuado para la expresión de una secuencia codificadora

de delta-5 desaturasa específica, el promotor después se une operablemente en una orientación sentido utilizando medios convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas en la presente son muy conocidas en la técnica, y se describen más a fondo en Sambrook, J. *et al.*, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 (en lo sucesivo "Sambrook *et al.*, 1989"); o Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K., eds., en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1990 (en lo sucesivo "Ausubel *et al.*, 1990").

Cuando se ha fabricado la construcción recombinante, después puede introducirse en la célula vegetal elegida mediante métodos muy conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, transfección, transformación y electroporación). Las células de plantas de semillas oleaginosas son las células vegetales preferidas. Las células vegetales transformadas después se cultivan y se regeneran bajo condiciones adecuadas que permiten la expresión del PUFA de cadena larga, que después opcionalmente se recupera y se purifica.

Las construcciones recombinantes de la invención pueden introducirse en una célula vegetal o, como alternativa, cada construcción puede introducirse en células vegetales distintas.

La expresión en una célula vegetal puede realizarse de una manera transitoria o estable, según se describió anteriormente.

Los PUFA de cadena larga deseados pueden expresarse en la semilla. Dentro del alcance de la invención también se encuentran las semillas o partes de la planta obtenidas a partir de dichas plantas transformadas.

Las partes de la planta incluyen tejidos diferenciados y no diferenciados que incluyen, pero no se limitan a los siguientes: raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivos (por ejemplo, células individuales, protoplastos, embriones y tejido de callo). El tejido de la planta puede estar en una planta o en cultivo de órganos, tejidos o células vegetales.

La expresión "órgano de la planta" se refiere a un tejido o grupo de tejidos vegetales que constituyen una parte morfológica y funcionalmente diferenciada de una planta. El término "genoma" se refiere a lo siguiente: (1) el complemento completo de material genético (genes y secuencias no codificadoras) presente en cada célula de un organismo, o virus u orgánulo; y/o (2) un conjunto completo de cromosomas heredado como una unidad (haploide) de un progenitor.

Así, esta invención también se refiere a un método para transformar una célula, que comprende transformar una célula con el gen quimérico de la invención, y seleccionar las células transformadas con el gen quimérico de la invención.

También de interés es un método para producir una planta transformada que comprende transformar una célula vegetal con los polinucleótidos de delta-5 desaturasa de la presente invención, y regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada.

Los métodos para transformar dicotiledóneas (principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*) y obtener plantas transgénicas se han publicado, entre otros, para el algodón (patente de EEUU n.º 5.004.863; patente de EEUU n.º 5.159.135); soja (patente de EEUU n.º 5.569.834; patente de EEUU n.º 5.416.011); *Brassica* (patente de EEUU n.º 5.463.174); cacahuete (Cheng *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 15:653-657 (1996); McKentley *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 14:699-703 (1995)); papaya (Ling, K. *et al.*, *Bio/technology*, 9:752-758 (1991)); y guisante (Grant *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 15:254-258 (1995)). Para un análisis de otros métodos empleados habitualmente para la transformación de plantas, véase Newell, C.A. (*Mol. Biotechnol.*, 16:53-65 (2000)). Uno de estos métodos de transformación emplea *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfler, M. y Casse-Delbart, F., *Microbiol. Sci.*, 4:24-28 (1987)). La transformación de soja utilizando el transporte directo de ADN ha sido publicada utilizando la fusión de PEG (publicación PCT n.º WO 92/17598), electroporación (Chowrira, G.M. *et al.*, *Mol. Biotechnol.*, 3:17-23 (1995); Christou, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:3962-3966 (1987)), microinyección y bombardeo de partículas (McCabe, D.E. *et al.*, *Bio/Technology*, 6:923 (1988); Christou *et al.*, *Plant Physiol.*, 87:671-674 (1988)).

Existen una diversidad de métodos para la regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. El método concreto de regeneración dependerá del tejido vegetal de partida y de la especie vegetal concreta que se va a regenerar. La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos vegetales individuales o a partir de diversos explantes transformados es muy conocido en la técnica (Weissbach y Weissbach, en: *Methods for Plant Molecular Biology* (eds.), Academic, San Diego, CA (1988)). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye generalmente las etapas de la selección de las células transformadas y el cultivo de las células individualizadas a través de las etapas habituales del desarrollo embrionario hasta la etapa de plántula enraizada. Las semillas y los embriones transgénicos son regenerados de modo similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes después se plantan en un medio de crecimiento de plantas apropiado, tal como tierra. Preferiblemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. De otra forma, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas desarrolladas a partir de semillas de líneas importantes desde el punto de vista agronómico. A la inversa, el polen de plantas de estas líneas importantes se

emplea para polinizar las plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva utilizando métodos muy conocidos por los expertos en la técnica.

Además de los procedimientos analizados anteriormente, los expertos en la técnica están familiarizados con los materiales didácticos convencionales que describen las condiciones y los procedimientos específicos para la construcción, la manipulación y el aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.); la generación de fragmentos de ADN recombinante y construcciones de expresión recombinantes; y la selección y el aislamiento de clones. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Maliga *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor, NY (1995); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Detecting Genes*, vol.1, Cold Spring Harbor, NY (1998); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Analyzing DNA*, vol.2, Cold Spring Harbor, NY (1998); *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, eds. Clark, Springer, NY (1997).

Los ejemplos de plantas de semillas oleaginosas incluyen, pero no se limitan a soja, especies de *Brassica*, girasol, maíz, algodón, lino y cártamo.

Los ejemplos de PUFA que tienen al menos veinte átomos de carbono y cuatro o más dobles enlaces carbono-carbono incluyen, pero no se limitan a ácidos grasos omega-3, tales como EPA, DPA y DHA, y el ácido graso omega-6 ARA. Las semillas obtenidas de estas plantas también están dentro del alcance de esta invención, así como el aceite obtenido de dichas semillas.

Así, en la presente se describe una planta de semillas oleaginosas que comprende:

(a) una primera construcción de ADN recombinante que comprende un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de delta-5 desaturasa, unido operablemente al menos a una secuencia reguladora; y

(b) al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa. Estos métodos forman parte de la invención si se emplea la construcción de ADN recombinante de la invención.

Se analizan otras desaturasas, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.^{os} 6.075.183, 5.968.809, 6.136.574, 5.972.664, 6.051.754, 6.410.288, y las publicaciones PCT n.^{os} WO 98/46763, WO 98/46764, WO 00/12720 y WO 00/40705.

La elección de la combinación de módulos utilizada depende, en parte, del perfil de PUFA y/o del perfil de desaturasa/elongasa de las células de la planta de semillas oleaginosas que se van a transformar, y del PUFA de cadena larga que se va a expresar.

En otro aspecto, esta invención se refiere a un método para fabricar PUFA de cadena larga en una célula vegetal, que comprende:

(a) transformar una célula con el gen quimérico de la invención; y

(b) seleccionar las células transformadas que fabrican PUFA de cadena larga.

También se describe un método para producir al menos un PUFA en una célula de soja, que comprende:

(a) transformar una célula de soja con una primera construcción de ADN recombinante, que comprende:

(i) un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de delta-5 desaturasa unido operablemente al menos a una secuencia reguladora; y

(ii) al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa;

(b) regenerar una planta de soja a partir de la célula transformada de la etapa (a); y

(c) seleccionar las semillas obtenidas a partir de las plantas de la etapa (b) que tienen un nivel alterado de PUFA, cuando se compara con el nivel en semillas obtenidas a partir de una planta de soja no transformada.

Estos métodos forman parte de la invención si se emplea la construcción de ADN recombinante de la invención.

En otras realizaciones preferidas, dicha al menos una construcción de ADN recombinante adicional codifica un

polipéptido que tiene actividad delta-9 elongasa, por ejemplo, la delta-9 elongasa aislada o derivada de *Isochrysis galbana* (n.º de registro de GenBank AF390174; IgD9e) o la delta-9 elongasa aislada o derivada de *Euglena gracilis*.

En otras realizaciones preferidas, dicha al menos una construcción de ADN recombinante adicional codifica un polipéptido que tiene actividad delta-8 desaturasa. Por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2005/103253 (publicada el 22 de abril, 2005) describe las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de una enzima delta-8 desaturasa de *Pavlova salina* (véase también la publicación de EEUU n.º 2005/0273885). Sayanova *et al.* (FEBS Lett., 580:1946-1952 (2006)) describen el aislamiento y la caracterización de un ADNc a partir de la ameba del suelo de vida libre *Acanthamoeba castellanii*, que, cuando se expresa en *Arabidopsis*, codifica una C₂₀ delta-8 desaturasa. Además, la solicitud en tramitación con la presente del cesionario de los solicitantes que tiene el n.º de solicitud provisional 60/795.810, presentada el 28 de abril, 2006 (n.º de expediente del abogado BB-1566) describe las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de una enzima delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* (CCMP459). La solicitud provisional de EEUU n.º 60/853.563 (presentada el 23 de octubre, 2006; n.º de expediente del abogado BB-1574) describe las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de una enzima delta-8 desaturasa de *Tetruptreptia pomquetensis* CCMP1491, *Eutreptiella sp.* CCMP389 y *Eutreptiella cf. gymnastica* CCMP 1594.

Sistemas de expresión microbianos. Módulos y vectores, y transformación

Los genes de delta-5 desaturasa y los productos génicos descritos en la presente (es decir, EgD5, u otras enzimas mutantes, enzimas con codones optimizados o sus homólogos) también pueden producirse en células hospedantes microbianas heterólogas, en particular en las células de levaduras oleaginosas (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*).

Los sistemas de expresión microbianos y los vectores de expresión que contienen secuencias reguladoras que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas extrañas son muy conocidos por los expertos en la técnica. Cualquiera de estos puede utilizarse para construir genes quiméricos para la producción de cualquiera de los productos génicos de las presentes secuencias. Estos genes quiméricos después pueden introducirse en microorganismos apropiados a través de una transformación para proporcionar una expresión de alto nivel de las enzimas codificadas.

Los vectores o módulos de ADN útiles para la transformación de células hospedantes microbianas adecuadas son muy conocidos en la técnica. La elección específica de las secuencias presentes en la construcción depende de los productos de la expresión deseados (*supra*), la naturaleza de la célula hospedante y el medio propuesto para separar las células transformadas de las células no transformadas. Sin embargo, generalmente el vector o el módulo contiene secuencias que dirigen la transcripción y la traducción del gen o genes pertinentes, un marcador seleccionable y secuencias que permiten la replicación autónoma o la integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que controla el inicio de la transcripción (por ejemplo, un promotor) y una región 3' del fragmento de ADN que controla el fin de la transcripción (es decir, un terminador). Lo más preferido es que ambas regiones de control se deriven de genes procedentes de la célula hospedante microbiana transformada, aunque debe entenderse que no es necesario que estas regiones de control se deriven de los genes nativos a la especie específica elegida como hospedante de producción.

Las regiones de control del inicio o los promotores que son útiles para dirigir la expresión de los presentes ORF de delta-5 desaturasa en la célula hospedante microbiana deseada son numerosas y familiares para los expertos en la técnica. Casi cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de estos genes en la célula hospedante seleccionada es adecuado para la presente invención. La expresión en una célula hospedante microbiana puede lograrse de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria puede realizarse induciendo la actividad de un promotor regulable unido operablemente al gen de interés. La expresión estable puede lograrse mediante el uso de un promotor constitutivo unido operablemente al gen de interés. Como ejemplo, cuando la célula hospedante es una levadura, se proporcionan regiones transcripcionales y traduccionales funcionales en células de levadura, en particular de la especie hospedante (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.ºs WO 2004/101757 y WO 2006/052870 para las regiones reguladoras del inicio de la transcripción preferidas para su uso en *Yarrowia lipolytica*). Puede utilizarse cualquiera de una serie de secuencias reguladoras, dependiendo de si se desea una transcripción constitutiva o inducida, de la eficacia del promotor para expresar el ORF del interés, de la facilidad de la construcción y similares.

Se ha descubierto que las secuencias de nucleótidos que rodean al codón de inicio de la traducción "ATG" afectan a la expresión en células de levadura. Si el polipéptido deseado se expresa mal en levaduras, las secuencias de nucleótidos de los genes exógenos pueden modificarse para que incluyan una secuencia de inicio de la traducción eficaz en levaduras para obtener una expresión óptima del gen. Para la expresión en levaduras, esto puede realizarse mediante mutagénesis específica dirigida a sitio de un gen expresado de modo ineficaz condensándolo dentro de marco con un gen de levadura endógeno, preferiblemente un gen altamente expresado. Como alternativa, se puede determinar la secuencia de inicio de la traducción consenso en el hospedante e introducir esta secuencia en genes heterólogos para su expresión óptima en el hospedante de interés.

La región de terminación puede derivarse de la región 3' del gen a partir del cual se obtuvo la región de inicio o a partir de un gen diferente. Se conoce un gran número de regiones de terminación que actúan de modo satisfactorio en una diversidad de hospedantes (cuando se utilizan en los mismos géneros y especies de los cuales se derivan o en otros diferentes). La región de terminación habitualmente se selecciona más por conveniencia que por cualquier

propiedad concreta. Preferiblemente, cuando el hospedante microbiano es una célula de levadura, la región de terminación se deriva de un gen de levadura (en particular, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia* o *Kluyveromyces*). También se sabe que las regiones 3' de genes de mamífero que codifican el γ -interferón y el α -2 interferón actúan en levaduras. Las regiones de control de la terminación también pueden derivarse de diversos genes nativos a los hospedantes preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario, pero lo más preferido es que se incluya. Aunque no se pretende limitación alguna, las regiones de terminación útiles en la presente descripción incluyen: aproximadamente 100 pb de la región 3' de la proteasa extracelular de *Yarrowia lipolytica* (XPR; n.º de registro de GenBank M17741); los terminadores de acil-coA oxidasa (Aco3: n.º de registro de GenBank AJ001301 y n.º CAA04661; Pox3: n.º de registro de GenBank XP_503244); el terminador de Pex20 (n.º de registro de GenBank AF054613); el terminador de Pex16 (n.º de registro de GenBank U75433); el terminador de *Lip1* (n.º de registro de GenBank Z50020); el terminador de *Lip2* (n.º de registro de GenBank AJ012632); y el terminador de 3-oxoacil-coA tiolasa (OCT; n.º de registro de GenBank X69988).

Tal como saben los expertos en la técnica, simplemente insertar un gen en un vector de clonación no asegura que será expresado con éxito al nivel necesario. En respuesta a la necesidad de una alta tasa de expresión se han creado muchos vectores de expresión especializados manipulando una serie de elementos genéticos diferentes que controlan aspectos de la transcripción, la traducción, la estabilidad de las proteínas, la limitación de oxígeno y la secreción de la célula hospedante microbiana. De modo más específico, algunas de las características moleculares que se han manipulado para el control de la expresión génica incluyen: (1) la naturaleza del promotor transcripcional y las secuencias del terminador pertinentes; (2) el número de copias del gen clonado y si el gen está portado por un plásmido o está integrado en el genoma de la célula hospedante; (3) la localización celular final de la proteína extraña sintetizada; (4) la eficacia de la traducción y el plegamiento correcto de la proteína en el organismo hospedante; (5) la estabilidad intrínseca del ARNm y la proteína del gen clonado dentro de la célula hospedante; y (6) la utilización de codones dentro del gen clonado, de modo que su frecuencia se aproxime a la frecuencia de utilización de codones preferida de la célula hospedante. Cada uno de estos tipos de modificaciones está incluido en la presente invención, como un medio para optimizar aún más la expresión de la delta-5 desaturasa descrita en la presente.

Cuando se ha obtenido el ADN que codifica un polipéptido adecuado para la expresión en una célula hospedante microbiana apropiada (por ejemplo, levadura oleaginosas) (por ejemplo, un gen quimérico que comprende un promotor, un ORF y un terminador), se coloca en un vector plasmídico capaz de tener replicación autónoma en una célula hospedante, o se integra directamente en el genoma de la célula hospedante. La integración de los módulos de expresión puede producirse de modo aleatorio dentro del genoma del hospedante o puede dirigirse a través del uso de construcciones que contienen suficientes regiones de homología con el genoma del hospedante como para dirigir la recombinación dentro del locus del hospedante. Cuando las construcciones se dirigen a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y la traducción pueden ser proporcionadas por el locus endógeno.

En la presente invención, el método de expresar genes preferido en *Yarrowia lipolytica* es mediante la integración de ADN lineal en el genoma del hospedante; y la integración en múltiples localizaciones dentro del genoma puede ser particularmente útil cuando se desee un alto nivel de expresión de los genes (por ejemplo, en el locus *Ura3* (n.º de registro de GenBank AJ306421), el locus del gen *Leu2* (n.º de registro de GenBank AF260230), el gen *Lys5* (n.º de registro de GenBank M34929), el locus del gen *Aco2* (n.º de registro de GenBank AJ001300), el locus del gen *Pox3* (Pox3: n.º de registro de GenBank XP_503244; o Aco3: n.º de registro de GenBank AJ001301), el locus del gen de delta-12 desaturasa (publicación PCT n.º WO2004/104167), el locus del gen *Lip1* (n.º de registro de GenBank Z50020) y/o el locus del gen *Lip2* (n.º de registro de GenBank AJ012632)).

De forma ventajosa, el gen *Ura3* puede utilizarse repetidamente en combinación con la selección con ácido 5-fluoroorótico (ácido 5-fluorouracil-6-carboxílico monohidrato; "5-FOA") (ver a continuación) para ayudar a que las modificaciones genéticas se integren en el genoma de *Yarrowia* de una manera fácil.

Cuando dos o más genes se expresan a partir de vectores de replicación distintos, resulta deseable que cada vector tenga un medio diferente de selección y carezca de homología con la otra construcción o construcciones para mantener una expresión estable y evitar la redistribución de elementos entre construcciones. La elección juiciosa de las regiones reguladoras, la selección de medios y el método de propagación de la construcción o construcciones introducidas pueden determinarse de modo experimental de modo que todos los genes introducidos se expresen a los niveles necesarios para proporcionar la síntesis de los productos deseados.

Las construcciones que comprenden el gen de interés pueden introducirse en una célula hospedante microbiana mediante cualquier técnica convencional. Estas técnicas incluyen la transformación (por ejemplo, transformación con acetato de litio (Methods in Enzymology, 194:186-187 (1991)), fusión de protoplastos, impacto bolístico, electroporación, microinyección o cualquier otro método que introduzca el gen de interés en la célula hospedante. Unas indicaciones más específicas aplicables a levaduras oleaginosas (concretamente, *Yarrowia lipolytica*) incluyen los documentos U.S. 4.880.741 y U.S. 5.071.764, y Chen, D.C. *et al.* (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2):232-235 (1997)).

Por conveniencia, una célula hospedante que ha sido manipulada mediante cualquier método para captar una

secuencia de ADN (por ejemplo, un módulo de expresión) se denominará en la presente “transformada” o “recombinante”. Así, los términos “transformada” y “recombinante” se emplean de modo intercambiable en la presente. El hospedante transformado tendrá al menos una copia de la construcción de expresión y puede tener dos o más, dependiendo si el gen se integra en el genoma, se amplifica, o está presente en un elemento extracromosómico que tiene un número múltiple de copias.

La célula hospedante transformada puede identificarse mediante diversas técnicas de selección, según se describe en las publicaciones PCT n.ºs WO 2004/101757 y WO 2006/052870. Los métodos de selección preferidos para su uso en la presente son la resistencia a kanamicina, higromicina y el aminoglicósido G418, así como la capacidad para crecer sobre medios que carecen de uracilo, leucina, lisina, triptófano o histidina. En realizaciones alternativas, se emplea 5-FOA para la selección de mutantes Ura⁻ de levaduras. El compuesto es tóxico para las células de levadura que poseen un gen URA3 activo que codifica la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa); así, basándose en esta toxicidad, el 5-FOA es especialmente útil para la selección y la identificación de cepas de levaduras mutantes Ura⁻ (Bartel, P.L. y Fields, S., Yeast 2-Hybrid System, Oxford University, Nueva York, v. 7, pp. 109-147, 1997). De modo más específico, primero se puede inactivar el gen Ura3 nativo para producir una cepa que tenga fenotipo Ura⁻, realizándose la selección basándose en la resistencia a 5-FOA. Después, una agrupación de múltiples genes quiméricos y un nuevo gen Ura3 pueden integrarse en un locus diferentes del genoma de *Yarrowia* para producir, con ello, una nueva cepa que tiene un fenotipo Ura⁺. La posterior integración produce una nueva cepa Ura3⁻ (de nuevo identificada utilizando la selección con 5-FOA), cuando el gen Ura3 introducido se desactiva. Así, el gen Ura3 (en combinación con la selección con 5-FOA) puede utilizarse como marcador de selección en múltiples rondas de transformación.

Después de la transformación, los sustratos adecuados para la presente delta-5 desaturasa (y opcionalmente, otras enzimas PUFA que se coexpresan dentro de la célula hospedante) pueden ser producidos por el hospedante de forma natural o transgénica, o pueden proporcionarse de modo exógeno.

Las células hospedantes microbianas para la expresión de los presentes genes y fragmentos de ácidos nucleicos pueden incluir hospedantes que crecen sobre una diversidad de materias primas, que incluyen carbohidratos simples o complejos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, aceites y alcoholes y/o hidrocarburos a través de un amplio intervalo de valores de temperatura y pH. Basándose en las necesidades del cesionario de los solicitantes, los genes descritos en la presente invención se expresarán en una levadura oleaginosas (y en particular *Yarrowia lipolytica*); sin embargo, se contempla que, debido a que la transcripción, la traducción y el aparato biosintético de proteínas están muy conservados, cualquier bacteria, levadura, alga y/u hongo será un hospedante microbiano adecuado para la expresión de los presentes fragmentos de ácidos nucleicos.

Sin embargo, los hospedantes microbianos preferidos son las levaduras oleaginosas. Estos organismos son capaces, de modo natural, de sintetizar y acumular aceites, pudiendo dicho aceite comprender más de aproximadamente 25% del peso seco celular, más preferiblemente más de aproximadamente 30% del peso seco celular, y lo más preferiblemente más de aproximadamente 40% del peso seco celular. Los géneros que generalmente se identifican como levaduras oleaginosas incluyen, pero no se limitan a *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Lipomyces*. De modo más específico, los ejemplos de levaduras que sintetizan aceites incluyen *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyii*, *L. lipoferus*, *Candida revkaufi*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *Trichosporon pullans*, *T. cutaneum*, *Rhodotorula glutinus*, *R. graminis*, y *Yarrowia lipolytica* (antes clasificada como *Candida lipolytica*).

La más preferida es la levadura oleaginoasa *Yarrowia lipolytica*; y, en otra realización, las más preferidas son las cepas de *Y. lipolytica* denominadas ATCC n.º 20362, ATCC n.º 8862, ATCC n.º 18944, ATCC n.º 76982 y/o LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., y Aggelis G., Bioresour. Technol., 82(1):43-49 (2002)).

Históricamente, se han utilizado diversas cepas de *Y. lipolytica* para la fabricación y la producción de isocitrato liasa; lipasas; polihidroxialcanoatos; ácido cítrico; eritritol; ácido 2-oxoglutarico; γ -decalactona; γ -dodecalatona; y ácido pirúvico. Las indicaciones específicas aplicadas para modificar la producción de ARA, EPA y DHA en *Y. lipolytica* se proporcionan en la solicitud de patente de EEUU n.º 11/264784 (WO 2006/055322), la solicitud de patente de EEUU n.º 11/265761 (WO 2006/052870) y la solicitud de patente de EEUU n.º 11/264737 (WO 2006/052871), respectivamente.

Otros hospedantes microbianos preferidos incluyen bacterias oleaginosas, algas y otros hongos; y, dentro de este amplio grupo de hospedantes microbianos, de particular interés son los microorganismos que sintetizan ácidos grasos omega-3/omega-6 (o aquellos que pueden ser genéticamente modificados para este fin (por ejemplo, otras levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*)). Así, por ejemplo, la transformación de *Mortierella alpina* (que se emplea en el mercado para la producción de ARA) con cualquiera de los presentes genes de delta-5 desaturasa bajo el control de promotores inducibles o regulables puede producir un organismo transformante capaz de sintetizar mayores cantidades de DGLA. El método de transformación de *M. alpina* se describe en Mackenzie *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 66:4655 (2000)). De forma similar, los métodos para la transformación de microorganismos thraustochytriales se describen en el documento U.S. 7.001.772.

También se describe un método para producir ARA o EPA, respectivamente, que comprende:

(a) proporcionar una levadura oleaginosas que comprende:

(i) una primera construcción de ADN recombinante que comprende un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de delta-5 desaturasa unido operablemente al menos a una secuencia reguladora; y,

(ii) una fuente de un sustrato de desaturasa que consiste en DGLA o ETA, respectivamente; y,

5 (b) cultivar la levadura de la etapa (a) en presencia de una fuente de carbono fermentable adecuada, en el que el gen que codifica el polipéptido de delta-5 desaturasa se expresa y el DGLA se convierte en ARA, o el ETA se convierte en EPA, respectivamente; y,

(c) opcionalmente recuperar el ARA o EPA, respectivamente, de la etapa (b). Puede ser necesario introducir más sustrato.

10 Por supuesto, puesto que los PUFA producidos de modo natural en levaduras oleaginosas se limitan a ácidos grasos 18:2 (es decir, LA), y de modo menos habitual, ácidos grasos 18:3 (es decir, ALA), en realizaciones más preferidas de la presente invención, la levadura oleaginosas estará genéticamente modificada para que exprese múltiples enzimas necesarias para la biosíntesis de PUFA de cadena larga (permitiendo con ello la producción, por ejemplo, de ARA, EPA, DPA y DHA), además de las delta-5 desaturasas descritas en la presente.

15 De modo específico, se describe una levadura oleaginosas que comprende:

(a) una primera construcción de ADN recombinante que comprende un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de delta-5 desaturasa unido operablemente al menos a una secuencia reguladora; y,

20 (b) al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 elongasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa.

25 En realizaciones particularmente preferidas de la levadura, dicha al menos una construcción de ADN recombinante adicional codifica un polipéptido que tiene actividad delta-9 elongasa, por ejemplo, la delta-9 elongasa aislada o derivada de *Isochrysis galbana* (n.º de registro de GenBank AF390174; IgD9e o IgD9eS) o la delta-9 elongasa aislada o derivada de *Euglena gracilis*. Cualquier célula que comprende en su genoma el gen quimérico de la invención forma parte de la invención.

Modificación metabólica de la biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 en microbios

30 Los métodos para manipular vías bioquímicas son muy conocidos por los expertos en la técnica, y se espera que serán posibles numerosas manipulaciones para maximizar la biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 en levaduras oleaginosas y, en particular, en *Yarrowia lipolytica*. Esta manipulación puede requerir una modificación metabólica directamente dentro de la vía biosintética de PUFA u otra manipulación coordinada de diversas otras vías metabólicas.

35 En el caso de las manipulaciones dentro de la vía biosintética de PUFA, puede resultar deseable aumentar la producción de LA para permitir una mayor producción de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6. La introducción y/o la amplificación de genes que codifican delta-9 y/o delta-12 desaturasas puede lograr esto. Para maximizar la producción de ácidos grasos insaturados omega-6, los expertos en la técnica saben que la producción se ve favorecida en un microorganismo hospedante que esté sustancialmente exento de ALA; así, preferiblemente, el hospedante se selecciona o se obtiene eliminando o inhibiendo la actividad desaturasa de tipo delta-15 u omega-3
40 que permite la conversión de LA en ALA. Como alternativa, puede resultar deseable maximizar la producción de ácidos grasos omega-3 (y minimizar la síntesis de ácidos grasos omega-6). En este ejemplo, se puede utilizar un microorganismo hospedante en el que la actividad delta-12 desaturasa que permite la conversión del ácido oleico en LA se elimina o se inhibe; después, se introducirían módulos de expresión apropiados en el hospedante, junto con los sustratos apropiados (por ejemplo, ALA) para la conversión en derivados de ácidos grasos omega-3 de ALA (por
45 ejemplo, STA, ETrA, ETA, EPA, DPA, DHA).

En realizaciones alternativa, las vías bioquímicas que compiten con las vías biosintéticas de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 por la energía o el carbono, o las enzimas de la vía biosintética de PUFA nativos que interfieren con la producción de un producto final de PUFA concreto, pueden eliminarse mediante alteración de genes o infrarregulación mediante otros medios (por ejemplo, ARNm antisentido).

50 Un análisis detallado de las manipulaciones dentro de la vía biosintética de PUFA como un medio para aumentar ARA, EPA o DHA (y sus técnicas asociadas) se presenta en las publicaciones PCT n.ºs WO 2006/055322, WO 2006/052870 y WO 2006/052871, respectivamente, así como las manipulaciones deseables en la vía biosintética de TAG y la vía de degradación de TAG (y sus técnicas asociadas).

Dentro del contexto de la presente invención, puede ser útil modular la expresión de la vía biosintética de ácidos

grasos mediante una cualquiera de las estrategias descritas anteriormente. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos mediante los cuales genes que codifican enzimas clave en la vía biosintética de la delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa se introducen en levaduras oleaginosas para la producción de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6. Resultará particularmente útil expresar los presentes genes de delta-5 desaturasa en levaduras oleaginosas que no poseen, de modo natural, las vías biosintéticas de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6, y coordinar la expresión de estos genes para maximizar la producción de productos de PUFA preferidos utilizando diversos medios para la modificación metabólica del organismo hospedante.

Procesos de fermentación microbiana para la producción de PUFA

La célula hospedante transformada se cultiva bajo condiciones que optimizan la expresión de genes de desaturasa quiméricos y para que produzca el rendimiento mayor y más económico de los PUFA deseados. En general, las condiciones del medio que pueden optimizarse incluyen el tipo y la cantidad de la fuente de carbono, el tipo y la cantidad de la fuente de nitrógeno, la proporción de carbono a nitrógeno, la cantidad de diferentes iones minerales, el nivel de oxígeno, la temperatura de crecimiento, el pH, la longitud de la fase de producción de biomasa, la longitud de la fase de acumulación de aceite, y el momento y el método de recolección de las células. *Yarrowia lipolytica* generalmente se cultiva en un medio complejo (por ejemplo, caldo de cultivo de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD)) o un medio mínimo definido que carece de un componente necesario para el crecimiento y así obliga a la selección de los módulos de expresión deseados (por ejemplo, base de nitrógeno de levaduras (DIFCO Laboratories, Detroit, MI)).

Los medios de fermentación en la presente invención deben contener una fuente de carbono adecuada. Las fuentes de carbono adecuadas se indican en la publicación PCT n.º WO 2004/101757. Aunque se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención pueda incluir una amplia diversidad de fuentes que contienen carbono, las fuentes de carbono preferidas son los azúcares, el glicerol y/o los ácidos grasos. Las más preferidas son la glucosa y/o los ácidos grasos que contienen entre 10-22 carbonos.

El nitrógeno puede suministrarse a partir de una fuente inorgánica (por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) u orgánica (por ejemplo, urea o glutamato). Además de las fuentes de carbono y nitrógeno apropiadas, el medio de fermentación también debe contener minerales, sales, cofactores, tampones, vitaminas y otros componentes adecuados conocidos por los expertos en la técnica por ser útiles para el crecimiento del hospedante oleaginoso y la estimulación de las vías enzimáticas necesarias para la producción de PUFA. Se presta una atención concreta a varios iones metálicos (por ejemplo, Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}) que estimulan la síntesis de lípidos y PUFA (Nakahara, T. *et al.*, Ind. Appl. Single Cell Oils, D.J. Kyle y R. Colin, eds., pp. 61-97 (1992)).

Los medios de crecimiento preferidos en la presente invención son los medios preparados del mercado habituales, tales como la base de nitrógeno de levaduras (DIFCO Laboratories, Detroit, MI). También pueden utilizarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos, y el medio apropiado para el crecimiento de las células hospedantes transformantes será conocido por los expertos en la técnica de la microbiología o la ciencia de la fermentación. Un intervalo de pH adecuado para la fermentación estará generalmente entre aproximadamente pH 4,0 a pH 8,0, siendo preferido un pH 5,5 a pH 7,5, puesto que es el intervalo para las condiciones de crecimiento inicial. La fermentación puede realizarse bajo condiciones aerobias o anaerobias, siendo preferidas las condiciones microaerobias.

Generalmente, la acumulación de altos niveles de PUFA en las células de levaduras oleaginosas requerirá un proceso en dos etapas, puesto que el estado metabólico debe estar "equilibrado" entre el crecimiento y la síntesis/almacenamiento de las grasas. Así, lo más preferiblemente, es necesario un proceso de fermentación de dos etapas para la producción de PUFA en levaduras oleaginosas (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*). Esta estrategia se describe en la publicación PCT n.º WO 2004/101757, así como diversos diseños de procesos de fermentación adecuados (es decir, discontinuo, discontinuo alimentado y continuo) y las consideraciones durante el crecimiento.

Purificación y procesamiento de aceites de PUFA

Los PUFA pueden encontrarse en las plantas y los microorganismos hospedantes como ácidos grasos libres o en formas esterificadas, tales como acilglicerol, fosfolípidos, sulfolípidos o glicolípidos, y pueden extraerse de las células hospedantes a través de una diversidad de medios conocidos en la técnica. Un resumen de las técnicas de extracción, los análisis de calidad y los estándares de aceptabilidad para lípidos de levaduras se encuentra en Z. Jacobs (Critical Reviews in Biotechnology, 12(5/6):463-491 (1992)). También está disponible un breve resumen del procesamiento corriente abajo en A. Singh y O. Ward (Adv. Appl. Microbiol., 45:271-312 (1997)).

En general, los medios para la purificación de PUFA pueden incluir una extracción con disolventes orgánicos, una sonicación, una extracción con fluidos supercríticos (por ejemplo, utilizando dióxido de carbono), una saponificación y medios físicos, tales como prensas, o sus combinaciones. Se hace referencia a las indicaciones de la publicación PCT n.º WO 2004/101757 para más detalles. Los métodos para aislar aceites de semillas son muy conocidos en la técnica (Young *et al.*, Processing of Fats and Oils, en The Lipid Handbook, Gunstone *et al.*, eds., capítulo 5, pp. 253-257, Chapman & Hall, Londres (1994)). Por ejemplo, el aceite de soja se produce utilizando una serie de etapas que implican la extracción y la purificación de un producto de aceite comestible a partir de la semilla que porta el aceite. Los aceites de soja y los subproductos de soja se producen utilizando las etapas generalizadas mostradas en la

tabla 3.

Tabla 3

Etapas generalizadas para la producción de aceite de soja y subproductos de soja		
Etapas del proceso	Proceso	Impurezas retiradas y/o subproductos obtenidos
n.º 1	semilla de soja	
n.º 2	extracción del aceite	harina
n.º 3	desgomado	lecitina
n.º 4	refinamiento con álcali o físico	gomas, ácidos grasos libres, pigmentos
n.º 5	lavado con agua	jabón
n.º 6	decoloración	color, jabón, metales
n.º 7	(hidrogenación)	
n.º 8	(winterización)	estearina
n.º 9	desodoración	ácidos grasos libres, tocoferoles, esteroides, volátiles
n.º 10	productos de aceites	

De modo más específico, las semillas de soja se limpian, se templan, se descascarillan y se transforman en copos, aumentando con ello la eficacia de la extracción del aceite. La extracción del aceite normalmente se logra con una extracción con un disolvente (por ejemplo, hexano), pero también puede lograrse con una combinación de presión física y/o extracción con disolventes. El aceite resultante se denomina aceite bruto. El aceite bruto puede desgomarse con fosfolípidos hidratantes y otros complejos de lípidos polares y neutros que facilitan su separación de la fracción de triglicéridos no hidratantes (aceite de soja). Las gomitas de lecitina resultantes después pueden procesarse para fabricar productos de lecitina importantes desde el punto de vista comercial utilizados en una diversidad de productos alimentarios e industriales como agentes de emulsión y liberación (es decir, antipegado). El aceite desgomado después puede refinarse para la eliminación de las impurezas (principalmente ácidos grasos libres, pigmentos y gomitas residuales). El refinamiento se realiza mediante la adición de un agente cáustico que reacciona con los ácidos grasos libres para formar jabón y fosfatidas hidratadas y proteínas en el aceite bruto. Se emplea agua para lavar las trazas de jabón formado durante el refinamiento. Los subproductos de material jabonoso pueden utilizarse directamente en piensos animales o acidularse para recuperar los ácidos grasos libres. El color se elimina mediante una adsorción con una tierra decolorante que elimina la mayoría de la clorofila y los compuestos carotenoides. El aceite refinado puede hidrogenarse, produciendo con ello grasas con diversas texturas y propiedades de fusión. La winterización (fraccionamiento) puede utilizarse para eliminar la estearina del aceite hidrogenado a través de una cristalización bajo condiciones de enfriamiento cuidadosamente controladas. Una desodoración (principalmente mediante una destilación de vapor al vacío) es la última etapa y está diseñada para eliminar los compuestos que imparte olor o sabor al aceite. Otros subproductos valiosos, tales como tocóferoles y esteroides, pueden ser retirados durante el proceso de desodoración. El destilado desodorizado que contiene estos subproductos puede comercializarse para la producción de vitamina E natural y otros productos farmacéuticos de alto valor. Los aceites y grasas refinados, decolorados (hidrogenados, fraccionados) y desodorizados pueden envasarse y comercializarse directamente o procesarse aún más para producir productos más especializados. Una referencia más detallada al procesamiento de las semillas de soja, la producción de aceite de soja y la utilización de los subproductos puede encontrarse en Erickson, Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, The American Oil Chemists' Society and United Soybean Board (1995). El aceite de soja es líquido a temperatura ambiente porque tiene un contenido relativamente bajo en ácidos grasos insaturados, cuando se compara con otros aceites, tales como aceite de coco, palma, nuez de palma y manteca de cacao.

Los aceites vegetales y microbianos que contienen PUFA que se han refinado y/o purificado pueden hidrogenarse para producir con ello grasas con diversas texturas y propiedades de fusión. Muchas grasas procesadas (que incluyen productos para untar, grasas para bollería, mantequillas duras, margarinas, mantecas panaderas, etc.) requieren diversos grados de solidez a temperatura ambiente y solo pueden producirse mediante la alteración de las propiedades físicas del aceite de origen. Esto se logra de manera más habitual mediante una hidrogenación catalítica.

La hidrogenación es una reacción química en la que se añade hidrógeno a los dobles enlaces del ácido graso insaturado con la ayuda de un catalizador, tal como níquel. Por ejemplo, el aceite de soja con alto contenido en ácido oleico contiene ácidos grasos linolénicos, LA y oleicos insaturados, y cada uno de estos puede hidrogenarse. La hidrogenación tiene dos efectos principales. En primer lugar, la estabilidad oxidativa del aceite aumenta como resultado de la reducción del contenido en ácidos grasos insaturados. En segundo lugar, las propiedades físicas del aceite cambian debido a que las modificaciones en los ácidos grasos aumentan el punto de fusión, dando como

resultado una grasa semilíquida o sólida a temperatura ambiente.

Existen muchas variables que afectan a la reacción de hidrogenación que, a su vez, alteran la composición del producto final. Las condiciones de funcionamiento, que incluyen la presión, la temperatura, el tipo y la concentración de catalizador, la agitación y el diseño del reactor, están entre los parámetros más importantes que pueden controlarse. Pueden utilizarse condiciones de hidrogenación selectivas para hidrogenar los ácidos grasos más insaturados preferentemente con respecto a los menos insaturados. A menudo se emplea una hidrogenación muy ligera o de cepillado para aumentar la estabilidad de los aceites líquidos. Una hidrogenación posterior convierte un aceite líquido en una grasa físicamente sólida. El grado de hidrogenación depende de la actuación deseada y las características de fusión diseñadas para el producto final concreto. Las mantecas líquidas (utilizadas para la fabricación de productos horneados, grasas sólidas y mantecas utilizadas para operaciones de fritura y asado comerciales) y materiales de base para la fabricación de margarinas están entre la miríada de posibles productos de aceite y grasas que pueden obtenerse mediante la hidrogenación. Una descripción más detallada de la hidrogenación y de los productos de la hidrogenación puede encontrarse en Patterson, H.B.W., *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*, The American Oil Chemists' Society (1994).

Se ha creado bastante polémica con los aceites hidrogenados debido a la presencia de isómeros de ácidos grasos *trans* que surgen del proceso de hidrogenación. Se ha relacionado la ingesta de grandes cantidades de isómeros *trans* con unos efectos perjudiciales para la salud, que incluyen una mayor proporción de lipoproteínas de baja densidad a alta densidad en el plasma sanguíneo y un mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

Aceites que contienen PUFA para su uso en productos alimentarios

En la actualidad, el mercado ofrece una gran variedad de productos alimentarios y piensos que incorporan ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 (en particular ARA, EPA y DHA). Se contempla que los aceites vegetales/de semillas, y los aceites de semillas alteradas y microbianos descritos en la presente que comprenden PUFA actuarán en los productos alimentarios y piensos para impartir beneficios para la salud en las actuales formulaciones. Comparados con otros aceites vegetales, se cree que estos aceites actúan de forma similar a otros aceites en aplicaciones alimentarias desde un punto de vista físico (por ejemplo, los aceites parcialmente hidrogenados, tales como el aceite de soja, se emplean ampliamente como ingredientes para productos para untar blandos, margarina y manteca para hornear y freír).

Los aceites vegetales/de semillas, y los aceites de semillas alteradas y microbianos que contienen ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 según se describen en la presente serán adecuados para su uso en una diversidad de productos alimentarios y piensos que incluyen, pero no se limitan a análogos de alimentos, productos cárnicos, productos de cereales, alimentos cocinados, aperitivos y productos lácteos. Además, los presentes aceites vegetales/de semillas, y los aceites de semillas alteradas y microbianos pueden utilizarse en formulaciones para impartir un beneficio para la salud en alimentos medicinales, que incluyen nutricionales médicos, suplementos dietéticos, leche maternizada, así como productos farmacéuticos. Los expertos en la técnica del procesamiento de alimentos y la formulación de alimentos comprenderán la manera en que la cantidad y la composición de aceites vegetales y microbianos pueden añadirse al producto alimentario o pienso. Esta cantidad se denomina en la presente una cantidad "eficaz", y dependerá del producto alimentario o pienso, de la dieta a la que pretende suplementar el producto o del trastorno médico que el alimento médico o el nutricional médico pretende corregir o tratar.

Pueden fabricarse análogos de alimentos utilizando procesos muy conocidos por los expertos en la técnica. Pueden mencionarse análogos de la carne, análogos del queso, análogos de la leche y similares. Los análogos de la carne fabricados a partir de soja contienen proteína de soja o tofu y otros ingredientes mezclados entre sí para simular diversos tipos de carnes. Estas alternativas a la carne se comercializan como alimentos congelados, enlatados o secados. Normalmente pueden utilizarse de la misma manera que los alimentos a los que sustituyen. Las alternativas a la carne fabricadas a partir de soja son excelentes fuentes de proteínas, hierro y vitamina B. Los ejemplos de análogos de la carne incluyen, pero no se limitan a análogos del jamón, análogos de salchichas, análogos de beicon y similares.

Los análogos de alimentos pueden clasificarse como imitaciones o sustitutos dependiendo de sus características funcionales y de composición. Por ejemplo, un queso de imitación solo es necesario que se parezca al queso que se desea sustituir. Sin embargo, un producto puede denominarse generalmente un sustituto del queso solo si es nutricionalmente equivalente al queso que sustituye y si cumple los requisitos mínimos de composición de ese queso. Así, los sustitutos del queso a menudo tendrán un mayor nivel de proteínas que los quesos de imitación y estarán reforzados con vitaminas y minerales.

Los análogos de la leche o productos alimentarios no lácteos incluyen, pero no se limitan a leches de imitación y postres helados no lácteos (por ejemplo, los fabricados a partir de soja y/o productos de proteínas de soja).

Los productos cárnicos incluyen una amplia variedad de productos. En EEUU, "carne" incluye "carnes rojas" producidas a partir de ganado vacuno, cerdos y ovejas. Además de las carnes rojas también se incluyen piezas de aves de corral, que incluyen pollos, pavos, ocas, gallinas de Guinea, patos, y el pescado y el marisco. Existe un

amplio surtido de productos cárnicos sazonados y procesados: frescos, curados y fritos, y curados y cocinados. Las salchichas y los perritos calientes son ejemplos de productos cárnicos procesados. Así, la expresión “productos cárnicos”, tal como se emplea en la presente, incluye, pero no se limita a productos cárnicos procesados.

5 Un producto alimentario de cereales es un producto alimentario derivado del procesamiento de granos de cereal. Los granos de cereal incluyen cualquier planta de la familia de las gramíneas que produzca un grano comestible (semilla). Los granos más populares son cebada, maíz, mijo, avena, quinoa, arroz, centeno, sorgo, triticale, trigo y arroz salvaje. Los ejemplos de productos alimentarios de cereales incluyen, pero no se limitan a grano integral, grano triturado, sémola, harina, salvado, germen, cereales para el desayuno, alimentos extrusionados, pastas y similares.

10 Un producto de bienes horneados comprende cualquiera de los productos alimentarios de cereales mencionados anteriormente que ha sido horneado o procesado de una manera comparable al horneado (es decir, secar o endurecer mediante calor). Los ejemplos de un producto de bienes horneados incluyen, pero no se limitan a pan, tartas, rosquillas, barras, pastas, migados de pan, aperitivos horneados, minigalletas, minigalletas saladas, minigalletitas, y minibizcochos secos. Tal como se mencionó anteriormente, los aceites descritos en la presente pueden utilizarse como ingrediente.

Un producto alimentario de aperitivo comprende cualquiera de los productos alimentarios descritos anteriormente o a continuación.

Un producto alimentario frito comprende cualquiera de los productos alimentarios descritos anteriormente o a continuación que se ha frito.

20 Un producto alimentario saludable es cualquier producto alimentario que imparte un beneficio para la salud. Muchos productos alimentarios derivados de semillas oleaginosas pueden considerarse alimentos saludables.

Una bebida puede estar en forma líquida o en forma de un polvo seco.

25 Por ejemplo, pueden mencionarse las bebidas no carbonatadas, tales como zumos de fruta, frescos, congelados, enlatados o concentrados; bebidas de leche sola o con aromas, etc. Las leches maternizadas nutricionales para adultos y bebés son muy conocidas en la técnica y están disponible en el mercado (por ejemplo, Similac®, Ensure®, Jevity®, y Alimentum® de Ross Products Division, Abbott Laboratories).

30 Las leches maternizadas son líquidos o polvos reconstituidos con los que se alimenta a bebés y niños pequeños. Una “leche maternizada” se define en la presente como un producto nutricional entérico que puede sustituir a la leche materna humana para la alimentación de bebés y generalmente está compuesto de un porcentaje deseado de grasa mezclada con porcentajes deseados de carbohidratos y proteínas en una disolución acuosa (por ejemplo, véase la patente de EEUU n.º 4.670.285). Basándose en estudios de composición a escala global, así como en los niveles especificados por grupos de expertos, la leche materna humana promedio generalmente contiene de aproximadamente 0,20% al 0,40% de ácidos grasos totales (suponiendo aproximadamente 50% de calorías de las grasas); y, en general, la proporción de DHA a ARA varía de aproximadamente 1:1 a 1:2 (véase, por ejemplo, las formulaciones de Enfamil LIPIL™ (Mead Johnson & Company) y Similac Advance™ (Ross Products Division, Abbott Laboratories)). Las leches maternizadas desempeñan un papel especial en las dietas de bebés porque a menudo son la única fuente de nutrientes para los bebés; y aunque dar el pecho sigue siendo el mejor alimento para los bebés, las leches maternizadas son un apoyo lo bastante parecido como para que los bebés no solo sobrevivan sino que también crezcan.

40 Un producto lácteo es un producto derivado de la leche. Un análogo de la leche o producto no lácteo se deriva de una fuente distinta de la leche, por ejemplo, la leche de soja analizada anteriormente. Estos productos incluyen, pero no se limitan a leche entera, leche desnatada, leche fermentada, productos tales como yogur o leche agria, nata, mantequilla, leche condensada, leche deshidratada, leche en polvo para café, crema para café, helados, queso, etc.

45 Otros productos alimentarios en los que pueden incluirse aceites que contienen PUFA son, por ejemplo, gomas de mascar, pasteles y escarchados, gelatinas y flanes, caramelos duros y blandos, mermeladas y jaleas, azúcar blanco granulado, sustitutos del azúcar, salsas dulces, coberturas y jarabes, y mezclas de polvos combinados en seco.

Aceites que contienen PUFA para su uso en productos alimentarios saludables y productos farmacéuticos

50 Un producto alimentario saludable es cualquier producto alimentario que imparte un beneficio para la salud e incluye alimentos funcionales, alimentos médicos, nutricionales médicos y suplementes dietéticos. Además, los aceites vegetales/de semillas descritos en la presente, las semillas alteradas de la invención y los aceites microbianos descritos en la presente pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas convencionales (por ejemplo, los aceites que contienen PUFA de cadena larga pueden incorporarse con facilidad en cualquiera de los productos alimentarios mencionados anteriormente para producir con ello un alimento funcional o médico). Las formulaciones más concentradas que comprenden PUFA incluyen cápsulas, polvos, comprimidos, geles blandos, cápsulas de gel, 55 concentrados líquidos y emulsiones que pueden utilizarse como suplemento dietético en seres humanos o animales distintos de los seres humanos.

Aceites que contienen PUFA para su uso en piensos para animales

Los piensos para animales se definen de modo genérico en la presente como productos previstos para su uso como pienso o para mezclar en piensos para animales distintos de los seres humanos. Los aceites vegetales/de semillas descritos en la presente, las semillas alteradas de la invención y los aceites microbianos descritos en la presente pueden utilizarse como ingrediente en diversos piensos para animales.

De modo más específico, aunque no limitado, se espera que los aceites descritos en la presente puedan utilizarse en productos alimentarios para mascotas, productos alimentarios para rumiantes y aves de corral, y productos alimentarios de acuicultura. Los productos alimentarios para mascotas son aquellos productos previstos para alimentar a una mascota (por ejemplo, perro, gato, ave, reptil, roedor). Estos productos pueden incluir los anteriores productos alimentarios de cereales y saludables, así como carne y subproductos de la carne, productos de proteínas de soja, productos de hierba y paja (por ejemplo, alfalfa, fleo, avena o bromo, verduras). Los productos alimentarios para rumiantes y aves de corral son aquellos en los que el producto está previsto para alimentar a un animal (por ejemplo, pavos, pollos, ganado bovino, cerdos). Al igual que los anteriores alimentos para mascotas, estos productos pueden incluir productos alimentarios de cereales y saludables, productos de proteínas de soja, carne y subproductos de la carne, y productos de hierba y paja, según se listó anteriormente. Los productos alimentarios de acuicultura (o "acuapiensos") son aquellos productos previstos para su uso en la acuicultura, es decir, lo concerniente a la propagación, el cultivo o la cría de organismos acuáticos y/o animales en agua dulce o salada.

Ejemplos

La presente invención se define más a fondo en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, solo se ofrecen como ilustración.

Métodos generales

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales utilizadas en los ejemplos son muy conocidas en la técnica y son descritas por: 1.) Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) (Maniatis); 2.) T.J. Silhavy, M.L. Bannan, y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984); y 3.) Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987).

Los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y el crecimiento de cultivos microbianos son muy conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para su uso en los siguientes ejemplos pueden encontrarse tal como se exponen en *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994); o en Thomas D. Brock, en *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2ª ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1989). Todos los reactivos, las enzimas de restricción y los materiales utilizados para el crecimiento y el mantenimiento de las células microbianas se obtuvieron en Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), DIFCO Laboratories (Detroit, MI), GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD), o Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), a menos que se indique lo contrario. Las células de *E. coli* (XL1-Blue) competentes se obtuvieron en Stratagene Company (San Diego, CA). Las cepas de *E. coli* generalmente se cultivaron a 37 °C en placas Luria Bertani (LB).

La clonación molecular general se realizó según métodos convencionales (Sambrook *et al.*, *supra*). La secuencia de ADN se generó en un secuenciador automático ABI utilizando la tecnología de tinte de terminador (patente de EEUU 5.366.860; documento EP 272.007) utilizando una combinación de vector y cebadores específicos de inserción. La edición de la secuencia se realizó en un Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Todas las secuencias representan una cobertura de al menos dos veces en ambas direcciones. Las comparaciones de las secuencias genéticas se realizaron utilizando un software DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI).

El significado de las abreviaturas es el siguiente: "seg" significa segundo o segundos, "min" significa minuto o minutos, "h" significa hora u horas, "d" significa día o días, "μl" significa microlitro o microlitros, "ml" significa mililitro mililitros, "l" significa litro o litros, "μM" significa micromolar, "mM" significa milimolar, "M" significa molar, "mmol" significa milimol o milimoles, "μmole" significa micromol o micromoles, "g" significa gramo o gramos, "μg" significa microgramo o microgramos, "ng" significa nanogramo o nanogramos, "U" significa unidad o unidades, "pb" significa par o pares de bases, y "kB" significa kilobase o kilobases.

Transformación y cultivo de *Yarrowia lipolytica*

La cepa ATCC n.º 20362 de *Yarrowia lipolytica* se obtuvo en American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las cepas de *Y. lipolytica* generalmente se cultivaron a 28 °C sobre agar YPD (extracto de levadura al 1%, bactopectona al 2%, glucosa al 2%, agar al 2%).

La transformación de *Y. lipolytica* se realizó según el método de Chen, D.C. *et al.* (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2):232-235 (1997)), a menos que se indique lo contrario. Brevemente, *Yarrowia* se cultivó en estrías sobre una

placa de YPD y se cultivó a 30 °C durante aproximadamente 18 hr. Se rasparon, con un asa de siembra, varias cantidades considerables de células de la placa y se resuspendieron en 1 ml de tampón de transformación que contenía 2,25 ml de PEG al 50%, PM medio 3350; 0,125 ml de acetato de Li 2 M, pH 6,0; 0,125 ml de DTT 2 M; y 50 mg de ADN de esperma de salmón cizallado. Después aproximadamente 500 ng de ADN plasmídico linealizado se incubó en 100 µl de las células resuspendidas, y se mantuvo a 39 °C durante 1 hr con mezclado en vórtice a intervalos de 15 min. Las células se cultivaron en placas con medio de selección y se mantuvieron a 30 °C durante 2 a 3 días.

Para la selección de los transformantes en general se empleó medio mínimo ("MM"); la composición de MM es como sigue: base de nitrógeno de levadura al 0,17% (DIFCO Laboratories, Detroit, MI) sin sulfato de amonio ni aminoácidos, glucosa al 2%, prolina al 0,1%, pH 6,1). Se añadieron suplementos de uracilo según fuera apropiado hasta una concentración final del 0,01% (produciendo con ello el medio de selección "MMU", preparado con agar 20 g/l).

Como alternativa, los transformantes se seleccionaron en un medio de selección de ácido 5-fluoroorótico ("FOA"; también ácido 5-fluorouracil-6-carboxílico monohidrato), que comprende: base de nitrógeno de levadura al 0,17% (DIFCO Laboratories) sin sulfato de amonio ni aminoácidos, glucosa al 2%, prolina al 0,1%, uracilo 75 mg/l, uridina 75 mg/l, FOA 900 mg/l (Zymo Research Corp., Orange, CA) y agar 20 g/l.

Análisis de ácidos grasos de *Yarrowia lipolytica*

Para el análisis de ácidos grasos, las células se recogieron mediante centrifugación, y los lípidos se extrajeron como se describe en Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-917 (1959)). Se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante transesterificación del extracto lipídico con metóxido de sodio (Roughan, G., y Nishida I., Arch Biochem Biophys., 276(1):38-46 (1990)) y después se analizaron con un Hewlett-Packard 6890 GC equipado con una columna de 30 -m x 0,25 mm (d.i.) HP-INNOWAX (Hewlett-Packard). La temperatura de la estufa fue de 170 °C (25 min de mantenimiento) hasta 185 °C a 3,5 °C/min.

Para la transesterificación de bases directa, el cultivo de *Yarrowia* (3 ml) se recolectó, se lavó una vez con agua destilada y se secó al vacío en un Speed-Vac durante 5-10 min. Se añadió metóxido de sodio (100 µl al 1%) a la muestra, y después la muestra se agitó en vórtice y se balanceó durante 20 min. Después de añadir 3 gotas de NaCl 1 M y 400 µl de hexano, la muestra se agitó en vórtice y se centrifugó. La capa superior se retiró y se analizó mediante GC según se describió anteriormente.

Ejemplo 1: Condiciones de crecimiento de *Euglena gracilis*, perfil de lípidos y aislamiento de ARNm

Euglena gracilis se obtuvo del laboratorio del doctor Richard Triemer en the Michigan State University (East Lansing, MI). A partir de 10 ml del cultivo en crecimiento activo se trasladó una parte alícuota de 1 ml a 250 ml de medio de *Euglena gracilis* (Eg) en una botella de vidrio de 500 ml. El medio Eg se preparó combinando 1 g de acetato de sodio, 1 g de extracto de carne de vaca (n.º de catálogo U126-01, Difco Laboratories, Detroit, MI), 2 g de Bacto® triptona (n.º de catálogo 0123-17-3, Difco Laboratories) y 2 g de Bacto® extracto de levadura (n.º de catálogo 0127-17-9, Difco Laboratories) en 970 ml de agua. Después de esterilizar con filtro se añadieron de modo aséptico 30 ml de sobrenadante de tierra-agua (n.º de catálogo 15-3790, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC) para producir el medio Eg final. Los cultivos de *Euglena gracilis* se hicieron crecer a 23 °C con un ciclo de 16 h de luz, 8 h de oscuridad durante 2 semanas sin agitación.

Después de 2 semanas, se retiraron 10 ml del cultivo para el análisis de lípidos y se centrifugaron a 1.800 x g durante 5 min. El sedimento se lavó una vez con agua y se volvió a centrifugar. El sedimento resultante se secó durante 5 min al vacío, se resuspendió en 100 µl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min con agitación. Después de esto se añadieron 0,5 ml de hexano y los viales se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µl inyectados de la capa de hexano) se separaron y se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (n.º de catálogo 24152, Supelco Inc., Bellefonte, PA). La temperatura de la estufa se programó para que se mantuviese a 220 °C durante 2,7 min, aumentase hasta 240 °C a 20 °C/min y después se mantuviese durante 2,3 min más. El gas vehículo fue suministrado por un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de patrones disponibles en el mercado (n.º de catálogo U-99-A, Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN), y el cromatograma resultante se muestra en la figura 2.

El resto del cultivo de dos semanas (240 ml) se sedimentó mediante centrifugación a 1.800 x g durante 10 min, se lavó una vez con agua y se volvió a centrifugar. El ARN total se extrajo del sedimento resultante utilizando el reactivo RNA STAT-60™ (TEL-TEST, Inc. Friendswood, TX) y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (uso de 5 ml de reactivo, ARN disuelto en 0,5 ml de agua). De esta manera, se obtuvo 1 mg de ARN total (2 mg/ml) del sedimento. El ARNm se aisló del 1 mg de ARN total utilizando un kit de purificación de ARNm (Amersham Biosciencias, Piscataway, NJ) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. De esta forma se obtuvieron 85 µg de ARNm.

Ejemplo 2: Síntesis de ADNc de *Euglena gracilis*

El ADNc se sintetizó directamente del ARNm de *Euglena gracilis* como sigue. De modo específico, el ARNm se cebó con un cebador adaptador AP (SEQ ID NO:65) del kit 3'-RACE de Invitrogen (Carlsbad, CA), en presencia del oligonucleótido Smart IV (SEQ ID NO:66) del kit de banco de ADNc BD-Clontech Creator™ Smart™ (Mississauga, ON, Canada). La transcripción inversa se realizó con la transcriptasa inversa Superscript II del kit the 3'-RACE según el protocolo del kit de banco de ADNc Creator™ Smart™.

La mezcla de síntesis de la 1ª hebra de ADNc se empleó como molde para la amplificación con PCR, utilizando AP como cebador 3', y el cebador CDSIII 5' (SEQ ID NO:36) como cebador 5' (suministrado con el kit de banco de ADNc BD-Clontech Creator™ Smart™). La amplificación se realizó con una mezcla de ADNc polimerasa de Clontech Advantage a 94 °C durante 30 seg, seguido de 20 ciclos de 94 °C durante 10 seg y 68 °C durante 6 min. Se realizó una extensión final a 68 °C durante 7 min.

Ejemplo 3: Aislamiento de una porción de la región codificadora del gen de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*

El presente ejemplo describe la identificación de una porción del gen de *Euglena gracilis* que codifica la delta-5 desaturasa (denominado en la presente "EgD5" (SEQ ID NO:1 y 2)) mediante el uso de cebadores derivados de regiones conservadas de otras secuencias de delta-5 y delta-8 desaturasas conocidas.

Se emplearon diversas consideraciones cuando se evaluaron cuáles eran las desaturasas que podrían permitir el diseño de cebadores degenerados adecuados para aislar la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*. De modo específico, los solicitantes sabían que solo las secuencias de delta-5, delta-6 y delta-8 desaturasa comprenden un motivo "HPGG" conservado en su N-terminal (siendo dicho dominio "HPGG" parte del dominio del citocromo B5 muy conocido); por contraste, las delta-9 desaturasas poseen un motivo "HPGG" del dominio del citocromo B5 en su extremo C-terminal, mientras que las delta-17 y delta-12 desaturasas carecen del dominio del citocromo B5. Se supuso que una vía de delta-9 elongasa/delta-8 desaturasa actúa en *Euglena gracilis*; así, entre las desaturasas que comparten el motivo "HPGG" conservado N-terminal, solo se espera que aparezcan dentro del organismo las delta-5 y delta-8 desaturasas. Por último, aunque solo se conocen una pocas secuencias de delta-8 desaturasas, numerosas delta-5 desaturasas son públicas. Los solicitantes han seleccionado las secuencias de delta-5 desaturasa que poseen una menor homología con los genes de delta-5 desaturasa "tradicionales" y que también comparten homología entre sí.

Basándose en lo anterior, las cuatro delta-5 desaturasas y dos delta-8 desaturasas mostradas a continuación en la tabla 3 se alinearon, utilizando el método de Clustal W (lento, preciso, opción Gonnet; Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res., 22:4673-4680 (1994)) del programa MegAlign™ del software DNASTAR.

Tabla 3

Delta-5 y delta-8 desaturasas alineadas para identificar regiones de aminoácidos conservados			
Desaturasa	Organismo	Referencia	SEQ ID NO:
delta-5	<i>Pythium irregulare</i>	n.º de registro de GenBank AAL13311	12
delta-5	<i>Phytophthora megasperma</i>	n.º de registro de GenBank CAD53323	13
delta-5	<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	n.º de registro de GenBank AAL92562	14
delta-5	<i>Dictyostelium discoideum</i>	n.º de registro de GenBank XP_640331	15
delta-8	<i>Euglena gracilis</i>	publicaciones PCT n.º. WO 2006/012325 y n.º WO 2006/012326	16
delta-8	<i>Pavlova lutheri</i>	Ejemplo 12 (a continuación)	18

La figura 3 muestra una porción del alineamiento resultante, que contiene varios tramos de secuencia de aminoácidos conservados entre los 6 organismos diferentes. Basándose en este alineamiento, se diseñaron dos conjuntos de oligonucleótidos degenerados para amplificar una porción de la región codificadora del gen de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*, que se corresponde con las regiones de la figura 3 que están indicadas como "Región conservada 1" y "Región conservada 2". De modo específico, se diseñó la secuencia de aminoácidos conservados GHH(I/V)YTN (SEQ ID NO:19) para que se correspondiese con la región conservada 1, mientras que se diseñó la secuencia de aminoácidos conservados N(Y/F)Q(V/I)EHH (SEQ ID NO:20) para que se correspondiese con la región conservada. Para reducir la degeneración de los oligonucleótidos, se diseñaron 4 conjuntos de oligonucleótidos (concretamente, 5-1A, 5-1B, 5-1C y 5-1D) que codifican la región conservada 1; y se diseñaron 4 conjuntos de oligonucleótidos (concretamente, 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR y 5-5DR) que codifican la hebra antisentido de la región conservada 2.

Tabla 4

Oligonucleótidos degenerados utilizados para amplificar el gen de delta-5 desaturasa de <i>Euglena gracilis</i>		
Nombre del oligonucleótido	Secuencia	SEQ ID NO:
5-1A	GGHCAYCAYRTBTAYACAAA	SEQ ID NO:27
5-1B	GGHCAYCAYRTBTAYACCAA	SEQ ID NO:28
5-1C	GGHCAYCAYRTBTAYACGAA	SEQ ID NO:29
5-1D	GGHCAYCAYRTBTAYACTAA	SEQ ID NO:30
5-5AR	TGRTGVACAAYTGRWARTT	SEQ ID NO:31
5-5BR	TGRTGVACTAYTGRWARTT	SEQ ID NO:32
5-5CR	TGRTGVACCAYTGRWARTT	SEQ ID NO:33
5-5DR	TGRTGVACGAYTGRWARTT	SEQ ID NO:34
(Nota: el código de degeneración de ácidos nucleicos utilizado para SEQ ID NO:27 a 34 fue el siguiente: R = A/G; Y = C/T; W = A/T; B = G/T/C; V = G/A/C; y H = A/C/T)		

Basándose en las secuencias de longitud completa de las secuencias delta-5 de la tabla 3, se estableció la hipótesis de que el fragmento del gen delta-5 de *Euglena gracilis* amplificado como se describió anteriormente tendría una longitud de aproximadamente 600 pb (carece de aproximadamente 210 aminoácidos en su N-terminal y 70 aminoácidos en su C-terminal).

Se realizó un total de dieciséis amplificaciones de PCR diferentes, puesto que se ensayaron todas las combinaciones posibles de cebadores (es decir, el cebador 5-1A se empleó con cada uno de 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR y 5-5DR de modo individual; de manera similar, el cebador 5-1B se empleó con cada uno de 5-5AR, 5-5BR, 5-5CR y 5-5DR, etc.). las amplificaciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µl que comprende: tampón de PCR (que contiene KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,75), MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%), BSA 100 µg/ml (concentración final), cada desoxirribonucleótido trifosfato 200 µM, 10 pmol de cada cebador, 10 ng de ADNc de *E. gracilis* y 1 µl de ADN polimerasa Taq (Epicentre Technologies, Madison, WI). Las condiciones de termociclación se ajustaron para 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 30 seg y 72 °C durante 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los productos de la PCR se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR de Qiagen (Valencia, CA). Un fragmento del tamaño esperado aproximado después se purificó tras una electroforesis en gel en agarosa al 1% (en p/v) y después se clonó en el vector pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI). El ADN acoplado se empleó para transformar células de *E. coli* DH10B y se seleccionaron los transformantes en agar de LB (bactotriptona al 1%, bacto-extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 1%) que contenía ampicilina (100 µg/ml). El análisis del ADN plasmídico de un grupo de 12 transformantes confirmó la presencia de la inserción con el tamaño esperado (los plásmidos se denominaron "pT-F10-1", "pT-F10-2", "pT-F10-3", etc. hasta "pT-F10-12").

El análisis de la secuencia muestra que pT-F10-1 contiene un fragmento de 590 pb (SEQ ID NO:4) que codifica 196 aminoácidos (SEQ ID NO:5) (que incluyen los aminoácidos que se corresponden con la región conservada 1 y 2). La identidad de la secuencia de *Euglena* se determinó realizando búsquedas BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool", herramienta de búsqueda de alineamientos locales básica; Altschul, S.F., *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1993)) para encontrar similitudes con las secuencias contenidas en la base de datos "nr" de BLAST (que comprende todas las traducciones de CDS de GenBank no redundantes, las secuencias derivadas de la estructura tridimensional del banco de datos de proteínas Brookhaven, la base de datos de secuencias de proteínas SWISS-PROT, las bases de datos EMBL y DDBJ). La secuencia se analizó para la similitud con todas las secuencias de ADN públicas contenidas en la base de datos "nr" utilizando el algoritmo BLASTN proporcionado por the National Center for Biotechnology Information (NCBI). La SEQ ID NO:4 se comparó para la similitud con todas las secuencias de proteínas públicas contenidas en la base de datos "nr", utilizando el algoritmo BLASTX (Gish, W. y States, D.J., Nature Genetics, 3:266-272 (1993)) proporcionado por NCBI.

Se indican los resultados de la comparación con BLASTX que resumen la secuencia con la cual SEQ ID NO:4 presenta la mayor similitud, según el porcentaje de identidad, el porcentaje de similitud y el valor de la esperanza. El "porcentaje de identidad" se define como el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las dos proteínas. El "porcentaje de similitud" se define como el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o están conservados entre las dos proteínas. El "valor de la esperanza" calcula la significancia estadística del apareamiento, especificando el número de apareamientos, con una puntuación concreta, que se esperan en una búsqueda de una base de datos de este tamaño absolutamente por azar. Así, la secuencias de aminoácidos traducida de SEQ ID NO: 4 (es decir, SEQ ID NO:5) tiene 38% de identidad y 53% de similitud con la secuencia de aminoácidos de la delta-8-esfingolípido desaturasa de *Thalassiosira pseudonana* (n.º de registro de GenBank AAX14502; SEQ ID NO:21), con un valor de la

esperanza de 5E-28; además, el fragmento parcial de SEQ ID NO:4 tiene 37% de identidad y 52% de similitud con la delta-5 ácido graso desaturasa de *Phaeodactylum tricomutum* (n.º de registro de GenBank AAL92562; SEQ ID NO:14), con un valor de la esperanza de 7E-28.

Ejemplo 4: Aislamiento de la región codificadora 5' del gen de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*

- 5 Para aislar la porción N-terminal de la delta-5 desaturasa putativa identificada en el ejemplo 3, se utilizó una técnica 5' RACE basada en los protocolos RACE de dos empresas diferentes (concretamente, Invitrogen y BD-Clontech).

Brevemente, el ADNc bicatenario de *Euglena gracilis* (ejemplo 2) se empleó como molde en un experimento de 5' RACE, que comprende dos rondas separadas de amplificación con PCR. En la primera ronda de amplificación con PCR, los cebadores oligonucleotídicos consisten en un oligonucleótido específico de gen (concretamente, ODMW480; SEQ ID NO:35) y el oligonucleótido genérico cebador CDSIII 5' (SEQ ID NO:36) del kit de banco de ADNc BD-Clontech Creator™ Smart™. Las amplificaciones con PCR se realizaron en un volumen total de 50 µl que comprende: 25 µl de premezcla LA Taq™ mix (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, 520-2193, Japón), 10 pmol de cada cebador, y 1 µl de ADN polimerasa Taq (Epicentre Technologies, Madison, WI). Las condiciones de termociclado se ajustaron para 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 30 seg y 72 °C durante 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La segunda ronda de amplificación con PCR emplea 1 µl del producto de la primera ronda de la reacción de PCR como molde. Los cebados consistieron en un oligonucleótido específico de gen (concretamente, ODMW479; SEQ ID NO:37) y el oligonucleótido genérico DNR CDS 5' (SEQ ID NO:38), suministrado con el kit de banco de ADNc BD-Clontech's Creator™ Smart™. La amplificación se realizó como se describió anteriormente.

- 20 Los productos de la segunda ronda de la reacción de PCR se sometieron a una electroforesis en agarosa al 1% (en p/v). Los productos entre 400 pb y 800 pb después se purificaron del gel y se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI). El ADN acoplado se empleó para transformar *E. coli* DH10B, y los transformantes se seleccionaron en agar LB agar que contenía ampicilina (100 µg/ml).

El análisis del ADN plasmídico de un transformante que comprende la región 5' del gen de delta-5 desaturasa putativo confirmó la presencia del plásmido esperado, denominado pT-EgD5-5'C2. El análisis de la secuencia demostró que pTEgD5-5'C2 contenía un fragmento de 797 pb (SEQ ID NO:6), que se solapa con 238 pb del extremo 5' del fragmento de 590 pb de pT-F10-1 (ejemplo 3, SEQ ID NO:4) y que proporciona además 559 pb de la secuencia 5' cadena arriba (SEQ ID NO:7) (figura 4). La secuencia de pT-EgD5-5'C2 también corrige la secuencia que se corresponde con la región conservada 1, resultante del uso de un oligonucleótido degenerado para la amplificación con PCR inicial del fragmento de 590 pb en pT-F10-1 (ejemplo 3). Sin embargo, no aparece ningún codón de inicio de la traducción en el fragmento de 797 pb extendido de SEQ ID NO:6.

Se realizó una segunda ronda del 5' RACE modificado como se describió anteriormente, excepto que se emplearon los oligonucleótidos YL791 (SEQ ID NO:39) e YL792 (SEQ ID NO:40) como cebadores específicos de genes. Los productos entre 200 pb y 400 pb después se purificaron a partir de un gel y se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI). El ADN acoplado se transformó en *E. coli* DH10B, y los transformantes se seleccionaron en agar LB que contenía ampicilina (100 µg/ml).

El análisis del ADN plasmídico de un transformante que comprende la región 5' del gen de delta-5 desaturasa putativo confirmó la presencia del plásmido esperado, denominado pT-EgD5-5'2nd. El análisis de la secuencia demostró que pTEgD5-5'2nd contenía un fragmento de 273 pb (SEQ ID NO:8), que se solapa con 253 pb del extremo 5' del fragmento de ADN en pT-EgD5-5'C2 descrito anteriormente, y además proporciona 20 pb de la secuencia 5' cadena arriba (SEQ ID NO:9). Diecisiete (17) pb de los 20 pb codifican la porción N-terminal del gen delta-5 desaturasa putativo, que incluyen el codón de inicio de la traducción, proporcionando así la secuencia 5' completa del gen.

Ejemplo 5: Aislamiento de la región codificadora 3' del gen de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis*

- 45 Para aislar la región C-terminal de la delta-5 desaturasa putativa identificada en el ejemplo 3, se empleó una técnica 3' RACE. La metodología se describió anteriormente en el ejemplo 4; sin embargo, los cebadores utilizados en la primera y la segunda ronda de la amplificación de PCR son los que aparecen en la siguiente tabla 5.

Tabla 5

Cebadores oligonucleotídicos empleados para 3' RACE		
Amplificación con PCR	Oligonucleótido específico de gen	Oligonucleótido genérico
1ª ronda	ODMW469 (SEQ ID NO:41)	AUAP (SEQ ID NO:42)
2ª ronda	YL470 (SEQ ID NO:43)	AUAP (SEQ ID NO:42)
* El cebador AUAP es suministrado en el kit de 3'-RACE de Invitrogen (Carlsbad, CA).		

Después del aislamiento y la purificación de los productos (es decir, 400-800 pb), los fragmentos se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega) y se transformaron en *E. coli* DH10B, como en el ejemplo 4.

El análisis del ADN plasmídico de un transformante que comprende la región 3' del gen de delta-5 desaturasa confirma la presencia del plásmido esperado, denominado pT-EgD5-3'. El análisis de la secuencia demuestra que pT-EgD5-3' contiene un fragmento de 728 pb (SEQ ID NO:10), que se solapa con 264 pb del extremo 3' del fragmento de 590 pb de pT-F10-1 (ejemplo 3, SEQ ID NO:4) y proporciona 464 pb de secuencia 3' cadena abajo adicional (SEQ ID NO:11). Las primeras 184 pb del fragmento de 464 pb incluidas dentro de pT-EgD5-3' codifican la región codificadora C-terminal (que incluye el codón de fin de la traducción) del gen de delta-5 desaturasa putativo. La secuencia de pT-EgD5-3' también corrige la secuencia que se corresponde con la región conservada 2, resultante del uso de un oligonucleótido degenerado para la amplificación con PCR inicial del fragmento de 590 pb en pT-F10-1 (ejemplo 3).

Después de dos rondas de 5' RACE y una ronda de 3' RACE, se determinó la secuencia de ADN de la región codificadora de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (EgD5) putativa completa. Tal como se muestra en la figura 4, la CDS de EgD5 tenía una longitud de 1350 pb (SEQ ID NO:1) y codifica un polipéptido con 449 aminoácidos (SEQ ID NO:2), basándose en el alineamiento de SEQ ID NO:4, 6, 8 y 10. Los resultados de las búsquedas con BLASTP utilizando el gen de EgD5 de longitud completa como secuencia de búsqueda demostraron que comparte 30% de identidad y 56% de similitud con la delta-5 ácido graso desaturasa de *Phaeodactylum tricornutum* (n.º de registro de GenBank AAL92562; SEQ ID NO:14), con un valor de la esperanza 1E-80. Además, el gen de EgD5 de longitud completa comparte 37% de identidad y 55% de similitud con la delta-8-esfingolípido desaturasa de *Thalassiosira pseudonana* (n.º de registro de GenBank AAX14502; SEQ ID NO:21), con un valor de la esperanza de 3E-75.

Ejemplo 6: Generación de la construcción pDMW367, que comprende EgD5

El presente ejemplo describe la generación de pDMW367, que comprende un gen quimérico FBAIN::EgD5::Pex20-3' gene (figura 5C). Este se diseñó para integrar el gen quimérico en el genoma de *Yarrowia lipolytica* y después estudiar la función de la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* en *Yarrowia lipolytica*.

Basándose en el ADNc de longitud completa de EgD5 (SEQ ID NO:1), se emplaron los oligonucleótidos YL794 y YL797 (SEQ ID NO:44 y 45, respectivamente) como cebadores para amplificar la primera porción de EgD5 (figura 5A). El cebador YL794 contiene un sitio *Nco*I, y el cebador YL797 contiene un sitio *Hind*III. Después se emplearon los cebadores YL796 y YL795 (SEQ ID NO:46 y 47, respectivamente) como cebadores para amplificar la segunda porción de EgD5. El cebador YL796 contiene un sitio *Hind*III, mientras que el cebador YL797 contiene un sitio *Not*I. Las reacciones de PCR, utilizando las parejas de cebadores YL794/YL797 o YL796/YL795, con el ADNc de *Euglena gracilis* (ejemplo 2) como molde, se realizaron individualmente en un volumen total de 50 µl que comprende: tampón de PCR (que contiene KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,75), MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%), BSA 100 µg/ml (concentración final), 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 10 pmol de cada cebador, y 1 µl de ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene, San Diego, CA). Las condiciones de termociclación se ajustaron para 35 ciclos a 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 30 seg y 72 °C durante 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los productos de la PCR individuales se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR de Qiagen. Los productos de la PCR de la reacción amplificada con los cebadores YL794/YL797 se digirieron con *Nco*I y *Hind*III, mientras que los productos de la PCR de la reacción amplificada con los cebadores YL796/YL795 se digirieron con *Hind*III y *Not*I. Los fragmentos de ADN digeridos con *Nco*I/*Hind*III y *Hind*III/*Not*I se purificaron tras una electroforesis en gel en agarosa al 1% (en p/v) y después se acoplaron direccionalmente con pZUF17 digerido con *Nco*I/*Not*I (figura 5B; SEQ ID NO:22; comprende un gen de delta-17 desaturasa sintético ("D17st") derivado de *Saprolegnia diclina* (publicación de patente de EEUU n.º 2003/0196217 A1), con codones optimizados para la expresión en *Yarrowia lipolytica* (publicación PCT n.º WO 2004/101757)). El producto de este acoplamiento fue pDMW367 (figura 5C; SEQ ID NO:23), que así contenía los siguientes componentes:

Tabla 6

Componentes del plásmido pDMW367 (SEQ ID NO:23)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de SEQ ID NO:23	Descripción del fragmento y los componentes del gen quimérico
<i>Eco</i> R I/BsW I (7416-1671)	FBAIN::EgD5::Pex20, que comprende: - FBAIN: promotor FBAIN de <i>Yarrowia lipolytica</i> (publicación PCT n.º WO 2005/049805; patente de EEUU 7.202.356) - EgD5: delta-5 desaturasa de <i>Euglena gracilis</i> (SEQ ID NO:1 descrita en la presente; indicado como "Euglena D5DS" en la figura) - Pex20: secuencia del terminador Pex20 del gen Pex20 de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AF054613)

Componentes del plásmido pDMW367 (SEQ ID NO:23)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de SEQ ID NO:23	Descripción del fragmento y los componentes del gen quimérico
2707-1827	origen de la replicación del plásmido ColE1
3637-2777	gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) para la selección en <i>E. coli</i>
4536-5840	secuencia de replicación autónoma de <i>Yarrowia</i> (ARS18; n.º de registro de GenBank A17608)
7373-5886	gen <i>Ura 3</i> de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AJ306421)

La expresión “promotor FBAIN” o “región del promotor FBAIN” se refiere a la región no traducida 5' cadena arriba delante del codón de inicio de la traducción “ATG” de la enzima fructosa-bisfosfato aldolasa de *Yarrowia lipolytica* (E.C.4.1.2.13) codificada por el gen *fba1* y que es necesaria para la expresión, más una porción de la región codificadora 5' que tiene un intrón del gen *fba1*.

- 5 Ejemplo 7: Generación de la cepa M4 de *Yarrowia lipolytica* para producir aproximadamente 8% de DGLA de los lípidos totales

10 El presente ejemplo describe la construcción de la cepa M4, derivada de *Yarrowia lipolytica* ATCC n.º 20362, capaz de producir 8% de DGLA con relación a los lípidos totales. Esta cepa se modificó para que expresase la vía de delta-6 desaturasa/delta-6 elongasa, mediante la introducción de la construcción pKUNF12T6E (figura 6A; SEQ ID NO:24). Esta construcción se generó para integrar cuatro genes quiméricos (que comprenden una delta-12 desaturasa, una delta-6 desaturasa y dos *C_{18/20}* elongasas) en los loci *Ura3* de la cepa de *Yarrowia* de tipo salvaje ATCC n.º 20362, para permitir con ello la producción de DGLA. Así, pKUNF12T6E contiene los siguientes componentes:

Tabla 7

Componentes del plásmido pKUNF12T6E (SEQ ID NO:24)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de SEQ ID NO:24	Descripción del fragmento y los componentes del gen quimérico
<i>AscI/BsWI</i> (9420-8629)	784 pb de la porción 5' del gen <i>Ura3</i> de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AJ306421)
<i>SphI/PacI</i> (12128-1)	516 pb de la porción 3' del gen <i>Ura3</i> de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AJ306421)
<i>SwaI/BsWI</i> (6380-8629)	FBAIN::EL1S::Pex20, que comprende: - FBAIN: promotor FBAIN de <i>Yarrowia lipolytica</i> (publicación PCT n.º WO 2005/049805; patente de EEUU 7.202.356; indicado como “Fab1+intrón” en la figura) - EL1S: gen de elongasa 1 con codones optimizados (publicación PCT n.º WO 2004/101753), derivado de <i>Mortierella alpina</i> (n.º de registro de GenBank AX464731) - Pex20: secuencia del terminador Pex20 del gen Pex20 de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AF054613)
<i>BglII/SwaI</i> (4221-6380)	TEF::delta-6S::Lip1, que comprende: - TEF: promotor TEF* de <i>Yarrowia lipolytica</i> *TEF promoter (n.º de registro de GenBank AF054508) - delta-6S: gen de delta-6 desaturasa con codones optimizados (publicación PCT n.º WO 2004/101753), derivado de <i>Mortierella alpina</i> (n.º de registro de GenBank AF465281) - Lip1: secuencia del terminador Lip1 del gen Lip1 de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank Z50020)

Componentes del plásmido pKUNF12T6E (SEQ ID NO:24)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de SEQ ID NO:24	Descripción del fragmento y los componentes del gen quimérico
<i>PmeI/ClaI</i> (4207-1459)	FBA::F.delta-12::Lip2, que comprende: - FBA: promotor FBA de <i>Yarrowia lipolytica</i> (publicación PCT n.º WO 2005/049805; patente de EEUU 7.202.356; indicado como "FBA1" en la figura) - F.delta-12: gen de delta-12 desaturasa de <i>Fusarium moniliforme</i> (publicación PCT n.º WO 2005/047485) - Lip2: secuencia del terminador Lip2 del gen Lip2 de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AJ012632)
<i>ClaI/PacI</i> (1459-1)	TEF::EL2Syn::XPR2, que comprende: - TEF: promotor TEF de <i>Yarrowia lipolytica</i> (n.º de registro de GenBank AF054508) - EL2Syn: gen de elongasa con codones optimizados (SEQ ID NO:25), derivado de <i>Thraustochytrium aureum</i> (patente de EEUU 6.677.145) - XPR2: aproximadamente 100 pb de la región 3' del gen Xpr de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank M17741)

El plásmido pKUNF12T6E se digirió con *AsclI/SphI*, y después se utilizó para la transformación de *Y. lipolytica* de tipo salvaje ATCC n.º 20362 según los métodos generales. Las células transformantes se cultivaron en placas con medio de selección de FOA y se mantuvieron a 30 °C durante 2 a 3 días. Las colonias resistentes a FOA se recogieron y se cultivaron en estrías en placas de selección de MM y MMU. Las colonias que podían crecer en las placas de MMU pero no en las placas de MM se seleccionaron como cepas *Ura*-. Después, colonias individuales de las cepas *Ura*- se inocularon en MMU líquido a 30 °C y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron mediante centrifugación, los lípidos se extrajeron y se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante transesterificación, y después se analizaron con un Hewlett-Packard 6890 GC.

Los análisis de GC mostraron la presencia de DGLA en los transformantes que contienen los 4 genes quiméricos de pKUNF12T6E, pero no en la cepa control de *Yarrowia* de tipo salvaje. La mayoría de las 32 cepas *Ura*-seleccionadas produjeron aproximadamente 6% de DGLA de los lípidos totales. Hubo 2 cepas (concretamente, las cepas M4 y 13-8) que produjeron aproximadamente 8% de DGLA de los lípidos totales.

Ejemplo 8: Análisis funcional del gen EgD5 en la cepa M4 de *Yarrowia lipolytica*

El plásmido pDMW367 (ejemplo 6) que comprende un gen quimérico FBAIN::EgD5::Pex20 se transformó en la cepa M4 (ejemplo 7), según se describe en los métodos generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM. Después de 2 días de cultivo a 30 °C, los transformantes cultivados en las placas de MM se seleccionaron y se volvieron a cultivar en estrías en placas de MM fresco. Tras haber sido cultivadas, estas cepas se inocularon de forma individual en 3 ml de MM líquido a 30 °C y se agitaron a 250 rpm/min durante 2 días. Las células se recogieron mediante centrifugación, los lípidos se extrajeron y se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante transesterificación, y después se analizaron con un Hewlett-Packard 6890 GC.

Los análisis de GC mostraron que había aproximadamente 5,6% de DGLA y 2,8% de ARA de los lípidos totales producidos en los tres transformantes, mientras que se determinó que la eficacia de la conversión de DGLA a ARA en estas tres cepas era de aproximadamente 33% (media). La eficacia de la conversión se midió según la siguiente fórmula: $[(\text{producto})/(\text{sustrato}+\text{producto})]*100$, en la que "producto" incluye el producto inmediato y todos los productos en la vía derivados de él. Así, estos datos experimentales demuestran que la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* clonada, descrita en la presente como SEQ ID NO:1 y 2, desatura DGLA a ARA con eficacia.

Ejemplo 9: Síntesis de un gen de delta-5 desaturasa con codones optimizados ("EgD5S") para la expresión en *Yarrowia lipolytica*

La utilización de codones del gen de delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (SEQ ID NO:1 y 2; EgD5) se optimizó para la expresión en *Yarrowia lipolytica*, de una manera similar a la descrita en la publicación PCT n.º WO 2004/101753 y la patente de EEUU 7.125.672. De modo específico, se diseñó un gen de delta-5 desaturasa con codones optimizados (denominado "EgD5S"; SEQ ID NO:3) basándose en la secuencia codificadora del gen de delta-5 desaturasa de EgD5, según el patrón de utilización de codones de *Yarrowia lipolytica* (publicación PCT n.º WO 2004/101753), la secuencia consenso alrededor del codón de inicio de la traducción "ATG", y las reglas generales de estabilidad del ARN (Guhaniyogi, G. y J. Brewer, *Gene*, 265(1-2):11-23 (2001)). Además de la modificación del sitio de inicio de la traducción, se modificaron 198 pb de la región codificadora de 1350 pb (14,5%, figura 7), y se optimizaron 189 codones (42%). El contenido en GC se redujo desde 55,5% dentro del gen de tipo salvaje (es decir, EgD5) hasta 54,4% dentro del gen sintético (es decir, EgD5S). Se incorporó un sitio *NcoI* y sitios

NotI alrededor del codón de inicio de la traducción y después del codón de fin de EgD5S, respectivamente. Ninguna de las modificaciones en el gen con codones optimizados cambió la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (SEQ ID NO:2). El gen EgD5S diseñado (SEQ ID NO:3) fue sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ) y clonado en pUC57 (n.º de registro de GenBank Y14837) para generar pEgD5S (figura 6B; SEQ ID NO:48).

Ejemplo 10: Generación de la construcción pDMW369, que comprende EgD5S

El presente ejemplo describe la construcción del plásmido pDMW369 que comprende un gen quimérico FBAIN::EgD5S::Pex20. El plásmido pDMW369 (figura 6C; SEQ ID NO:49) se construyó reemplazando el fragmento *Nco I/Not I* de pZUF17 (figura 5B; SEQ ID NO:22) por el fragmento *Nco I/Not I* EgD5S de pEgD5S (figura 6B; SEQ ID NO:48). El producto de este acoplamiento fue pDMW369, que con ello contiene los siguientes componentes:

Tabla 8

Componentes del plásmido pDMW369 (SEQ ID NO:49)	
Sitios RE y nucleótidos dentro de SEQ ID NO:49	Descripción del fragmento y los componentes del gen quimérico
<i>EcoR I/BsW I</i> (6063-318)	FBAIN::EgD5S::Pex20, que comprende: - FBAIN: promotor FBAIN de <i>Yarrowia lipolytica</i> (publicación PCT n.º WO 2005/049805; patente de EEUU 7.202.356; indicado como "FBA1+intrón" en la figura) - EgD5S: delta-5 desaturasa con codones optimizados (SEQ ID NO:3, descrita en la presente como EgD5S) derivado de <i>Euglena gracilis</i> - Pex20: secuencia del terminador Pex20 del gen Pex20 de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AF054613)
1354-474	origen de la replicación del plásmido ColE1
2284-1424	gen de resistencia a la ampicilina (Amp ^R) para la selección en <i>E. coli</i>
3183-4476	secuencia de replicación autónoma de <i>Yarrowia</i> (ARS18; n.º de registro de GenBank A17608)
6020-4533	gen <i>Ura 3</i> de <i>Yarrowia</i> (n.º de registro de GenBank AJ306421)

Ejemplo 11: Expresión de la delta-5 desaturasa con codones optimizados ("EgD5S") en la cepa M4 de *Yarrowia lipolytica*

El plásmido pDMW369 (ejemplo 10, que comprende un gen quimérico FBAIN::EgD5S::Pex20) se transformó en la cepa M4 (ejemplo 7), según se describe en los métodos generales. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM. Después de 2 días de cultivo a 30 °C, los transformantes cultivados en las placas de MM se seleccionaron y se volvieron a cultivar en estrías en placas de MM fresco. Tras haber sido cultivadas, se recogieron células individuales de esas cepas mediante centrifugación, los lípidos se extrajeron y se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante transesterificación, y después se analizaron con un Hewlett-Packard 6890 GC.

Los análisis de GC mostraron que había aproximadamente 3,3% de DGLA y 2,7% de ARA del total de lípidos producidos en los tres transformantes, mientras que se determinó que la eficacia de la conversión de DGLA a ARA en estas tres cepas era de aproximadamente 45% (media, calculada como se describe en el ejemplo 8). Así, estos datos experimentales demuestran que la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* sintética con codones optimizados para la expresión en *Yarrowia lipolytica* (EgD5S, según se indica en SEQ ID NO:3) es aproximadamente 36% más eficaz para desaturar DGLA a ARA que el gen EgD5 de tipo salvaje (SEQ ID NO:1).

Ejemplo 12: Aislamiento de una delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* (CCMP459)

El presente ejemplo describe el aislamiento de la delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* (CCMP459) utilizada en el ejemplo 3 y en la figura 3 (también descrita en la solicitud de patente de EEUU n.º 11/737.772, presentada el 20 de abril, 2007). Esto requiere la síntesis de ADNc de *Pavlova lutheri* (CCMP459); la construcción del banco y la secuenciación; la identificación de los homólogos de delta-8 desaturasa; y la clonación de la delta-8 desaturasa de longitud completa a partir de ADN genómico.

Síntesis de ADNc de *Pavlova lutheri* (CCMP459), construcción del banco y secuenciación

Se sintetizó un banco de ADNc de *Pavlova lutheri* (CCMP459) según se describe en la publicación PCT n.º WO 2004/071467 (publicada el 26 de agosto, 2004). Brevemente, se obtuvieron sedimentos congelados de Pav459 de the Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP, West Boothbay Harbor, ME). Estos sedimentos se trituraron en nitrógeno líquido y el ARN total se extrajo de Pav459 utilizando el kit Qiagen

RNeasy® Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA), según las instrucciones del fabricante. A partir de este ARN total se aisló el ARNm utilizando resina de celulosa con oligo dT, que después se empleó para la construcción de un banco de ADNc utilizando el vector pSport1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADNc producido de esta manera se clonó direccionalmente (5' *SalI*/3' *NotI*) en el vector pSport1. El banco de Pav459 contenía aproximadamente $6,1 \times 10^5$ clones por ml, cada uno con un tamaño medio de la inserción de aproximadamente 1200 pb. El banco de *Pavlova lutheri* se denominó eps1c.

Para la secuenciación, primero se recuperaron los clones de los cultivos en glicerol archivados cultivados/congelados en placas de medio de congelación de 384 pocillos, y se inocularon con un recolector de colonias QPix® automático (Genetix) en placas de 96 pocillos profundos que contenían LB + ampicilina 100 mg/ml. Después de cultivar durante 20 hr a 37 °C, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se conservaron a -20 °C. Después los plásmidos se aislaron en un robot Eppendorf 5Prime, utilizando un método minipreparativo de lisis alcalina en formato de 96 pocillos modificado (Eppendorf PerfectPrep®). Brevemente, se empleó un filtro y un colector al vacío para facilitar la retirada de los restos celulares después de la precipitación con acetato. Entonces el ADN plasmídico se unió a una segunda placa de filtro directamente del filtrado, se lavó, se secó y se eluyó.

Se secuenciaron los extremos de los plásmidos en placas de 384 pocillos, utilizando el cebador T7 cebado con vector (SEQ ID NO:50) y el kit de secuenciación ABI BigDye versión 3 Prism. Para la reacción de secuenciación se emplearon 100-200 ng del molde y 6,4 pmol del cebador, y se repitieron 25 veces las siguientes condiciones de reacción: 96 °C durante 10 seg, 50 °C durante 5 seg y 60 °C durante 4 min. Después de la limpieza con etanol, los productos de la reacción de secuenciación de ciclos se separaron y se detectaron en secuenciadores automáticos Perkin-Elmer ABI 3700.

Identificación de homólogos de la enzima delta-8 desaturasa a partir del banco de ADNc de *Pavlova lutheri* eps1c

Se identificaron los clones de ADNc que codifican los homólogos de delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* (denominados en la presente delta-8 desaturasas) realizando búsquedas BLAST para la similitud con secuencias contenidas en la base de datos "nr" BLAST (según se describe en el ejemplo 3). El valor de P (probabilidad) de observar un apareamiento de una secuencia de ADNc con una secuencia contenida en la base de datos en la que se realizó la búsqueda solo por azar, según se calcula con BLAST, se indica en la presente como valores de "pLog", que representan el negativo del logaritmo del valor de P indicado. Por consiguiente, cuanto mayor sea el valor de pLog, mayor será la probabilidad de que la secuencia de ADNc y el "acierto" de BLAST representen proteínas homólogas.

La búsqueda con BLASTX utilizando la secuencia de nucleótidos del clon eps1c.pk002.f22 reveló la similitud de la proteína codificada por el ADNc con la delta-6 desaturasa de *Rhizopus stolonifer* (SEQ ID NO:51) (n.º de registro de NCBI AAX22052 (GI 60499699), locus AAX22052, CDS AY795076; Lu *et al.*, no publicado). La secuencia de una porción de la inserción de ADNc del clon eps1c.pk002.f22 se muestra en SEQ ID NO:52 (extremo 5' de la inserción de ADNc). Después se obtuvo la secuencia de la inserción completa (eps1c.pk002.f22:fin) y se muestra en SEQ ID NO:53. La secuencia de la secuencia de aminoácidos deducida (desde el nucleótido 1 de SEQ ID NO:53 hasta el primer codón de fin en el nucleótido 864 de SEQ ID NO:53) se muestra en SEQ ID NO:54. La secuenciación de la inserción completa se realizó utilizando un protocolo de transposición modificado. Los clones identificados para la secuenciación de la inserción completa se recuperaron de las cepas en glicerol archivadas como colonias individuales, y se aisló el ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Los moldes de plásmidos se transpusieron con el kit de transposición Template Generation System (TGS II) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN transpuesto se transformó en células EH10B electrocompetentes (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) mediante electroporación. Se seleccionaron aleatoriamente múltiples transformantes de cada reacción de transposición, se preparó el ADN plasmídico, y los moldes se secuenciaron como se indicó anteriormente (ABI BigDye v3.1) hacia fuera del sitio del acontecimiento de transposición, utilizando los cebadores exclusivos SeqE (SEQ ID NO: 55) y SeqW (SEQ ID NO:56).

Se recogieron los datos de secuencia (software ABI Prism Collections) y se ensamblaron utilizando el programa de ensamblaje de secuencias Phrap (P. Green, University of Washington, Seattle). Los ensamblajes se visualizaron con el editor de secuencias Consed (D. Gordon, University of Washington, Seattle) para la edición final.

La secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:54 se evaluó mediante BLASTP, produciendo un valor de pLog de 19,52 (valor de E de $3e-20$) frente a la delta-6 desaturasa de *Mortierella alpina* (n.º de registro de NCBI BAC82361 (GI 34221934), locus BAC82361, CDS AB070557; Sakuradani y Shimizu, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67:704-711 (2003)). Basándose en los resultados de la comparación de BLASTP con la desaturasa de *Mortierella alpina* y otras ácido graso desaturasas, la delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* no era de longitud completa y carecía de la secuencia en el extremo 5'.

Conación de la delta-8 desaturasa de longitud completa a partir del ADN genómico de *Pavlova lutheri*

Se aisló el ADN genómico de *Pavlova lutheri* (CCMP459) utilizando el kit Qiagen DNeasy® Plant Maxi Prep Kit según el protocolo del fabricante. Utilizando 1 columna maxi por 1 gr de sedimento de células congelado se aisló un total de 122 µg de ADN genómico a partir de 4 g de cultivo de *Pavlova lutheri*. La concentración final del ADN

genómico fue de 22,8 ng/μl. Se sintetizaron bancos GenomeWalker utilizando el kit Universal GenomeWalker™ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del fabricante (Prot# PT3042-1, versión PRO3300). Brevemente, se prepararon cuatro digestiones de restricción según el protocolo utilizando 300 ng de ADN genómico por reacción. Después de la limpieza con fenol, los sedimentos se disolvieron en 4 μl de agua y los adaptadores se acoplaron según el protocolo.

Para la PCR primaria, se empleó el kit de PCR genómica GC Advantage® (BD Biosciences Clontech) siguiendo el protocolo del fabricante (Prot # PT3090-1, versión PR1X433). Para cada digestión de restricción, 1 μl del banco se combinó con 22,8 μl de agua de calidad de PCR, 10 μl de 5x tampón de reacción de PCR genómica GC, 2,2 μl de Mg(CH₃CO₂)₂ 25 mM, 10 μl de GC-Melt (5 M), 1 μl de 50x mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 1 μl de mezcla de pol. genómica GC Advantage (50x), 1 μl de cebador AP1 Universal GenomeWalker® (10 μM, SEQ ID NO:57) y 1 μl de GSP PvDES (10 μM, SEQ ID NO:58). Después de una desnaturalización a 95 °C, se repitieron 35 veces las siguientes condiciones de reacción: 94 °C durante 30 seg, 68 °C durante 6 min. Después de estas condiciones de reacción se realizó una extensión adicional a 68 °C durante 6 min, seguido de un enfriamiento hasta 15 °C hasta la retirada.

La reacción de PCR primaria para cada banco se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa, y se observaron las bandas de ADN con unos pesos moleculares de aproximadamente 6 kB, 3,5 kB, 2,5 kB y 1,2 kB. Las bandas de ADN de cada banco se purificaron utilizando el kit de recuperación de ADN en gel Zymoclean™ (Zymo Research, Orange, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN resultante se clonó en el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante, y las inserciones se secuenciaron utilizando los cebadores T7 (SEQ ID NO:50) y M13-28Rev (SEQ ID NO:59) según se describió anteriormente. Entonces se obtuvieron otras secuencias utilizando un cebador de secuenciación específico de gen PavDES seq (SEQ ID NO:60) que se derivó de los datos de secuencia recién obtenidos. La secuencia del extremo 5' completa obtenida mediante paseo del genoma se muestra en SEQ ID NO:61. La secuencia de las regiones solapantes de la secuencia genómica (SEQ ID NO:61) y el EST totalmente secuenciado eps1c.pk002.f22.fis (SEQ ID NO:53) se alinearon utilizando Sequencher™ (versión 4.2, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) empleando el algoritmo de ensamblaje Large Gap. De modo interesante, la comparación demostró que el EST que se secuenció originariamente (SEQ ID NO:53) carece de 459 pb cuando se compara con la secuencia genómica (SEQ ID NO:61). Esta secuencia que falta en el EST parece ser una delección y no un intrón, puesto que no se identificaron sitios de corte de intrones claros en el ADN genómico en el extremo 5' del gen. La secuencia genómica para el extremo 5' (SEQ ID NO:61) se combinó con el extremo 3' de la secuencia EST (SEQ ID NO:53) para producir la SEQ ID NO:62. Utilizando el software de análisis de secuencia Using EditSeq™ 6.1 (DNASTAR Inc., Madison, WI), se identificó un ORF (SEQ ID NO:17). La secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO:17 se muestra en SEQ ID NO:18.

La secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:18 se evaluó con BLASTP, produciendo un valor de pLog de 35,10 (valor de E de 8e-36) frente a la delta-6 desaturasa de *Rhizopus stolonifer* (SEQ ID NO:63) (n.º de registro de NCBI ABB96724 (GI 83027409), locus ABB96724, CDS DQ291156; Zhang *et al.*, no publicado). Además, la delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* es 78,0% idéntica a la secuencia de delta-8 desaturasa de *Pavlova salina* (SEQ ID NO:64) descrita en la publicación PCT n.º WO 2005/103253 (publicada el 22 de abril, 2005) utilizando el método de Jotun Hein. Los cálculos del porcentaje de identidad de secuencia realizados mediante el método de Jotun Hein (Hein, J.J., Meth. Enz., 183:626-645 (1990)) se realizaron utilizando el programa MegAlign™ v6.1 del paquete bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI) con los parámetros por defecto para el alineamiento apareado (KTUPLE = 2). La delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* es 76,4% idéntica con la secuencia de delta-8 desaturasa de *Pavlova salina* utilizando el método Clustal V. Los cálculos del porcentaje de identidad de secuencia realizados mediante el método Clustal V (Higgins, D.G. y Sharp, P.M., Comput. Appl. Biosci., 5:151-153 (1989); Higgins *et al.*, Comput. Appl. Biosci., 8:189-191 (1992)) se realizaron utilizando el programa MegAlign™ v6.1 del paquete bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc.) con los parámetros por defecto para el alineamiento apareado (KTUPLE = 1, PENALIZACIÓN DE HUECO = 3, VENTANA = 5, DIAGONALES GUARDADAS = 5 y PENALIZACIÓN DE LONGITUD DE HUECO = 10). Las puntuaciones de BLAST y las probabilidades indican que el fragmento de SEQ ID NO:17 codifica la delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri* completa.

Las figuras 8A y 8B muestran un alineamiento Clustal V (con los parámetros por defecto) de SEQ ID NO:18 (la secuencia de aminoácidos de la delta-8 desaturasa de *Pavlova lutheri*), SEQ ID NO:64 (la secuencia de aminoácidos de la delta-8 desaturasa de *Pavlova salina*, *supra*), SEQ ID NO:16 (la secuencia de aminoácidos de la delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis*, secuencia descrita como SEQ ID NO:2 en la publicación PCT n.º WO 2006/012325; publicada el 2 de febrero, 2006), SEQ ID NO:63 (la secuencia de aminoácidos de la delta-6 ácido graso desaturasa de *Rhizopus stolonifer* (n.º de registro de NCBI ABB96724, *supra*)) y SEQ ID NO:51 (la secuencia de aminoácidos de la delta-6 ácido graso desaturasa de *Rhizopus stolonifer* (n.º de registro de NCBI AAX22052, *supra*)). Los resultados del alineamiento Clustal V demuestran que SEQ ID NO:18 es 76,4%, 22,6%, 22,2% y 22,2% idéntica a SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:51, respectivamente.

Ejemplo 13: Transformación de cultivos de embriones de soja somáticos

Condiciones de cultivo

Cultivos en suspensión embriogénicos de soja (cv. Jack) se mantuvieron en 35 ml de medio líquido SB196 (ver a

continuación) en un agitador rotatorio, 150 rpm, 28 °C con luces fluorescentes blancas frías con un fotoperiodo de 16:8 hr luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 60-85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Los cultivos se subcultivaron cada 7 días a 2 semanas inoculando aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de líquido fresco SB196 (el intervalo de subcultivo preferido es cada 7 días).

- 5 Los cultivos en suspensión embriogénicos de soja se transformaron con plásmidos de expresión de soja mediante el método del bombardeo de pistola de partículas (Klein *et al.*, Nature, 327:70 (1987)) utilizando un instrumento DuPont Biolistic PDS1000/HE (retroajuste de helio) para todas las transformaciones.

Inicio del cultivo en suspensión embriogénico de soja

- 10 Se iniciaron cultivos de soja dos veces cada mes con 5-7 días entre cada inicio. Se recogen vainas con semillas inmaduras de plantas de soja disponibles 45-55 días después de la plantación, se retiran las cáscaras y se colocan en una caja magenta esterilizada. Las semillas de soja se esterilizan agitándolas durante 15 min en una disolución de Clorox al 5% con 1 gota de jabón de marfil (es decir, 95 ml de agua destilada en autoclave más 5 ml de Clorox y 1 gota de jabón, bien mezclado). Las semillas se enjuagan utilizando dos botellas de 1 litro de agua destilada estéril y las que son menores que 4 mm se colocan en portaobjetos para microscopio individuales. El extremo pequeño de la semilla se corta y los cotiledones se extraen de la cubierta de la semilla por presión. Los cotiledones se trasladan a placas que contienen medio SB1 (25-30 cotiledones por placa). Las placas se envuelven con cinta de fibra y se conservan durante 8 semanas. Después de este tiempo, los embriones secundarios se cortan y se colocan en medio líquido SB196 durante 7 días.

Preparación del ADN para el bombardeo

- 20 Para el bombardeo se emplea un plásmido intacto o un fragmento de ADN plasmídico que contiene los genes de delta-5 desaturasa de interés y el gen del marcador seleccionable. Los fragmentos de los plásmidos de expresión de soja que comprenden la delta-5 desaturasa de la presente invención se obtienen mediante aislamiento en gel de los plásmidos digeridos. Los fragmentos de ADN resultantes se separan mediante una electroforesis en gel sobre agarosa SeaPlaque GTG al 1% (BioWhitaker Molecular Applications) y los fragmentos de ADN que contienen los
- 25 módulos de genes se cortan del gel de agarosa. El ADN se purifica de la agarosa utilizando la enzima de digestión GELase siguiendo el protocolo del fabricante.

- Se añade una parte alícuota de 50 μl de agua destilada estéril que contiene 3 mg de partículas de oro a 5 μl de una disolución de ADN 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (el plásmido intacto o el fragmento de ADN preparado como se describió anteriormente), 50 μl de CaCl_2 2,5 M, y 20 μl de espermidina 0,1 M. La mezcla se agita durante 3 min en el nivel 3 de un agitador de
- 30 vórtice y se centrifuga durante 10 seg en una microcentrífuga de escala experimental. Después de un lavado con 400 μl de etanol al 100%, el sedimento se suspende mediante sonicación en 40 μl de etanol al 100%. La suspensión de ADN (5 μl) se dispensa a cada disco volante del instrumento de discos Biolistic PDS1000/HE. Cada parte alícuota de 5 μl contiene aproximadamente 0,375 mg de partículas de oro por bombardeo (es decir, por disco).

Preparación del tejido y bombardeo con ADN

- 35 Aproximadamente 150-200 mg de cultivos en suspensión embrionarios de 7 días se colocan en una placa Petri vacía y estéril de 60 x 15 mm, y la placa se cubre con una malla de plástico. El tejido se bombardea con 1 o 2 disparos por placa ajustándose la presión de ruptura de membrana a 7584,23 kPa (1100 psi) y la cámara se somete a un vacío de 68,6-71,1 cm (27-28 pulgadas) de mercurio. El tejido se coloca aproximadamente a 8,9 cm (3,5 pulgadas) de la pantalla de retención/detención.

- 40 Selección de embriones transformados

- Los embriones transformados se seleccionan utilizando higromicina como marcador seleccionable. De modo específico, después del bombardeo, el tejido se coloca en medio SB196 fresco y se cultiva como se describió anteriormente. Seis días después del bombardeo el medio SB196 se intercambia por medio SB196 fresco que contiene higromicina 30 mg/l. El medio de selección se repone cada semana. De cuatro a seis semanas después de la selección, se observa tejido verde transformado creciendo de los agrupamientos embriogénicos necróticos no transformados. El tejido verde aislado se retira y se inocula en placas de múltiples pocillos para generar nuevos cultivos en suspensión embriogénicos transformados clónicamente propagados.
- 45

Maduración de los embriones

- 50 Los embriones se cultivan durante 4-6 semanas a 26 °C en medio SB196 con bombillas de luz fluorescente blanca fría (Phillips cool white Econowatt F40/CW/RS/EW) y Agro (Phillips F40 Agro) (40 vatios) con un fotoperiodo de 16:8 hr con una intensidad de luz de 90-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Después de este tiempo, los agrupamientos de embriones se trasladan a un medio de agar sólido, SB166, durante 1-2 semanas. Los agrupamientos después se subcultivan con medio SB103 durante 3 semanas. Durante este periodo, los embriones individuales se retiran de los agrupamientos y se seleccionan para alteraciones en su composición de ácidos grasos, según se describió anteriormente.

- 55 Recetas de los medios

ES 2 474 840 T3

Medio de proliferación líquido SB 196 - FN Lite (por litro)

MS FeEDTA - 100x disolución madre 1	10 ml
MS sulfato - 100x disolución madre 2	10 ml
FN Lite haluros - 100x disolución madre 3	10 ml
FN Lite P, B, Mo - 100x disolución madre 4	10 ml
Vitamina B5 (1 mUI)	1,0 ml
2,4-D (concentración final 10 mg/l)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 gm
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 gm
Asparagina	1,0 gm
Sacarosa (al 1%)	10 gm
pH 5,8	

Disoluciones madre de FN Lite

n.º de disolución madre	1000 ml	500 ml
1 MS Fe EDTA 100x disolución madre		
Na ₂ EDTA*	3,724 g	1,862 g
FeSO ₄ - 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g
*Añadir primero, disolver en una botella oscura con agitación.		
2 MS Sulfato 100x disolución madre		
MgSO ₄ - 7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
MnSO ₄ - H ₂ O	1,69 g	0,845 g
ZnSO ₄ - 7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
CuSO ₄ - 7H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
3 FN Lite haluros 100x disolución madre		
CaCl ₂ - 2H ₂ O	30,0 g	15,0 g
KI	0,083 g	0,0715 g
CoCl ₂ - 6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
4 FN Lite P, B, Mo 100x disolución madre		
KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

Medio sólido SB1 (por litro)

- 1 paquete de sales MS (Gibco/BRL, n.º de catálogo 11117-066)
- 1 ml de vitamina B5 1000x disolución madre
- 31,5 g de sacarosa
- 2 ml de 2,4-D (concentración final 20 mg/l)
- pH 5,7
- 8 g de agar TC

Medio sólido SB 166 (por litro)

- 1 paquete de sales MS (Gibco/BRL, n.º de catálogo 11117-066)
- 1 ml de vitamina B5 1000x disolución madre
- 60 g de maltosa
- 750 mg de $MgCl_2$ hexahidrato
- 5 g de carbón activado
- pH 5,7
- 2 g de gelrite

Medio sólido SB 103 (por litro)

- 1 paquete de sales MS (Gibco/BRL, n.º de catálogo 11117-066)
- 1 ml de vitamina B5 1000x disolución madre
- 60 g de maltosa
- 750 mg de $MgCl_2$ hexahidrato
- pH 5,7
- 2 g de gelrite

Medio sólido SB 71-4 (por litro)

- 1 botella de sales B5 de Gamborg con sacarosa (Gibco/BRL, n.º de catálogo 21153-036)
- pH 5,7
- 2 g de agar TC

Disolución madre de 2,4-D

- 5 Se obtiene prefabricada en Phytotech, n.º de catálogo D 295, concentración 1 mg/ml.

Disolución madre de vitamina B5 (por 100 ml)

Se conservan partes alícuotas a -20 °C.

- 10 g de mioinositol
- 100 mg de ácido nicotínico
- 100 mg de piridoxina HCl
- 1 g de tiamina

Si la disolución no se disuelve con rapidez, aplicar un nivel bajo de calor mediante la placa de agitación caliente.

Ejemplo 14: Análisis funcional de la delta-5 desaturasa de SEQ ID NO:1 y 2 en embriones de soja somáticos

- 10 Los embriones de soja somáticos maduros son un buen modelo de embriones cigóticos. Cuando están en el estado de embrión globular en cultivo líquido, los embriones de soja somáticos contienen cantidades muy pequeñas de triacilglicerol (TAG) o proteínas de almacenamiento típicas de los embriones de soja cigóticos en maduración. En esta etapa del desarrollo, la proporción de triacilglicéridos totales a los lípidos polares totales (fosfolípidos y glicolípidos) es de aproximadamente 1:4, que es típica de los embriones de soja cigóticos en la etapa del desarrollo
- 15 a partir de la cual se inicia el cultivo de embrión somático. También en la etapa globular, los ARNm para importantes proteínas de la semilla, la subunidad α' de la β -conglucina, el inhibidor de tripsina de Kunitz 3, y la lectina de semillas están casi totalmente ausentes. Tras la transferencia a un medio sin hormonas para permitir la diferenciación hacia el estado de embrión somático en maduración, TAG se convierte en la clase de lípidos más abundante. Además, los ARNm para la subunidad α' de la β -conglucina, el inhibidor de tripsina de Kunitz 3, y la
- 20 lectina de semillas se convierten en mensajeros muy abundantes en la población de ARNm total. Sobre esta base, el sistema de embrión de soja somático se comporta de un modo muy similar a los embriones de soja cigóticos en maduración *in vivo*, y por tanto constituye un sistema modelo bueno y rápido para analizar los efectos fenotípicos de la modificación de la expresión de genes en la vía biosintética de ácidos grasos (véase la publicación PCT n.º WO

2002/00904, ejemplo 3). De modo más importante, el sistema modelo también predice la composición de ácidos grasos de las semillas procedentes de plantas derivadas de embriones transgénicos.

Los embriones de soja somáticos transgénicos que contienen la delta-5 desaturasa de la presente invención se analizan de la siguiente forma. Se preparan los ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de un único embrión de soja somático madurado, mediante transesterificación. Los embriones individuales se colocan en un vial que contiene 50 µl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) y 0,5 ml de hexano, y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µl inyectados de la capa de hexano) se separan y se cuantifican utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundido Omegawax 320 (n.º de catálogo 24152, Supelco Inc.). La temperatura de la estufa se programó para mantenerse a 220 °C durante 2,6 min, aumentar hasta 240 °C a 20 °C/min y después mantenerse durante 2,4 min más. El gas vehículo se suministra mediante un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se comparan con los de patrones de ésteres metílicos disponibles en el mercado (Nu-Chek Prep., Inc.). De modo habitual, se analizan mediante GC 5-10 embriones por evento, utilizando la metodología descrita anteriormente.

Ejemplo 15: Coexpresión de otras combinaciones de módulos de promotor/gen/terminador en embriones de soja somáticos

Además de los genes, los promotores, los terminadores y los módulos de genes descritos en la presente, los expertos en la técnica pueden apreciar que otras combinación de módulos de promotor/gen/terminador pueden sintetizarse de un modo similar, pero no limitado, al descrito en la presente. Por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 2004/071467 y n.º WO 2004/071178 describen el aislamiento de una serie de secuencias de promotores y terminadores de la transcripción para su uso en la expresión específica de embrión en la soja. Además, las publicaciones PCT n.º WO 2004/071467, n.º WO 2005/047479 y n.º WO 2006/012325 describen la síntesis de múltiples combinaciones de módulos de promotor/gen/terminador mediante el acoplamiento de promotores, genes y terminadores de la transcripción individuales en combinaciones exclusivas. En general, se emplea un sitio *NotI* franqueado por el promotor adecuado (por ejemplo, los listados en la tabla 9, pero no exclusivamente) y un terminador de la transcripción (por ejemplo, los listados en la tabla 10, pero no exclusivamente) para clonar el gen deseado. Los sitios *NotI* pueden añadirse a un gen de interés, tales como los listados en la tabla 11, pero no exclusivamente, utilizando una amplificación por PCR con oligonucleótidos diseñados para introducir sitios *NotI* en los extremos 5' y 3' del gen. El producto de PCR resultante después se digiere con *NotI* y se clona en un módulo de promotor/*NotI*/terminador adecuado.

Además, las publicaciones PCT n.º WO 2004/071467, n.º WO 2005/047479 y n.º WO 2006/012325 describen el posterior acoplamiento de módulos de genes individuales en combinaciones exclusivas, junto con módulos de marcadores seleccionables adecuados, para obtener la expresión fenotípica deseada. Aunque esto se realiza principalmente utilizando diferentes sitios de enzimas de restricción, los expertos en la técnica pueden apreciar que puede utilizarse una serie de técnicas para lograr la combinación de promotor/gen/terminador de la transcripción deseada. Haciendo esto, puede lograrse cualquier combinación de módulos de promotor/gen/terminador de la transcripción específicos de embrión. Los expertos en la técnica también apreciarán que esos módulos pueden colocarse en fragmentos de ADN individuales o en múltiples fragmentos en los que la coexpresión de los genes es el resultado de la cotransformación de múltiples fragmentos de ADN.

Tabla 9

Promotores específicos de semillas		
Promotor	Organismo	Referencia del promotor
subunidad α' de la β -conglucina	soja	Beachy <i>et al.</i> , EMBO J., 4:3047-3053 (1985)
inhibidor de tripsina de Kunitz	soja	Jofuku <i>et al.</i> , Plant Cell, 1:1079-1093 (1989)
anexina	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467
glicina Gy1	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467
albúmina 2S	soja	patente de EEUU 6.177.613
legumina A1	guisante	Rerie <i>et al.</i> , Mol. Gen. Genet, 225:148-157 (1991)
subunidad β de la β -conglucina	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467
BD30 (también denominado P34)	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467
legumina A2	guisante	Rerie <i>et al.</i> , Mol. Gen. Genet, 225:148-157 (1991)

Tabla 10

Terminadores de la transcripción		
Terminador de la transcripción	Organismo	Referencia
faseolina 3'	judía	publicación PCT n.º WO 2004/071467
inhibidor de tripsina de Kunitz 3'	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467
BD30 (también denominado P34) 3'	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467
legumina A2 3'	guisante	publicación PCT n.º WO 2004/071467
albúmina 2S 3'	soja	publicación PCT n.º WO 2004/071467

Tabla 11

Genes de la vía biosintética de PUFA		
Gen	Organismo	Referencia
delta-6 desaturasa	<i>Saprolegnia diclina</i>	publicación PCT n.º WO 2002/081668
delta-6 desaturasa	<i>Mortierella alpina</i>	patente de EEUU 5.968.809
elongasa	<i>Mortierella alpina</i>	publicación PCT n.º WO 2000/12720; patente de EEUU 6.403.349
delta-5 desaturasa	<i>Mortierella alpina</i>	patente de EEUU 6.075.183
delta-5 desaturasa	<i>Saprolegnia diclina</i>	publicación PCT n.º WO 2002/081668
delta-15 desaturasa	<i>Fusarium moniliforme</i>	publicación PCT n.º WO 2005/047479
delta-17 desaturasa	<i>Saprolegnia diclina</i>	publicación PCT n.º WO 2002/081668
elongasa	<i>Thraustochytrium aureum</i>	publicación PCT n.º WO 2002/08401; patente de EEUU 6.677.145
elongasa	<i>Pavlova</i> sp.	Pereira <i>et al.</i> , Biochem. J., 384:357-366 (2004)
delta-4 desaturasa	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	publicación PCT n.º WO 2002/090493
delta-9 elongasa	<i>Isochrysis galbana</i>	publicación PCT n.º WO 2002/077213
delta-9 elongasa	<i>Euglena gracilis</i>	solicitud de patente de EEUU n.º 11/601563
delta-8 desaturasa	<i>Euglena gracilis</i>	publicación PCT n.º WO 2000/34439; patente de EEUU 6.825.017; publicación PCT n.º WO 2004/057001; publicación PCT n.º WO 2006/012325
delta-8 desaturasa	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Sayanova <i>et al.</i> , FEBS Lett., 580:1946-1952 (2006)
delta-8 desaturasa	<i>Pavlova salina</i>	publicación PCT n.º WO 2005/103253
delta-8 desaturasa	<i>Pavlova lutheri</i>	solicitud de patente de EEUU n.º 11/737.772

Ejemplo 16: Selección con clorsulfurona (ALS) y regeneración de plantas

Selección con clorsulfurona (ALS)

- 5 Después del bombardeo, el tejido vegetal se divide entre dos matraces con medio SB196 fresco y se cultiva como se describe en el ejemplo 13. De 6 a 7 días después del bombardeo, el SB196 se intercambia por medio SB196 fresco que contiene el agente de selección de clorsulfurona 100 ng/ml. El medio de selección se repone cada semana. De 4 a 6 semanas después de la selección se observa tejido verde transformado creciendo de los agrupamientos embriogénicos necróticos no transformados. El tejido verde aislado se retira y se inocula en placas de múltiples pocillos que contienen medio SB196 para generar nuevos cultivos en suspensión embriogénicos transformados clónicamente propagados.
- 10

Regeneración de embriones somáticos de soja en plantas

Para obtener plantas completas a partir de cultivos en suspensión embriogénicos, el tejido debe regenerarse. Los embriones se maduran como se describe en el ejemplo 13. Después de subcultivar en medio SB103 durante 3

semanas, los embriones individuales se retiran de los agrupamientos y se seleccionan para alteraciones en su composición de ácidos grasos según se describe en el ejemplo 14. Debe advertirse que cualquier fenotipo detectable que resulte de la expresión de los genes de interés puede seleccionarse en esta etapa. Esto incluye, pero no se limita a alteraciones en el perfil de ácidos grasos, perfil y contenido en proteínas, contenido en carbohidratos, velocidad de crecimiento, viabilidad, o la capacidad para desarrollarse normalmente en una planta de soja.

Los embriones individuales madurados se desecan colocándolos en una placa Petri pequeña vacía (35 x 10 mm) durante aproximadamente 4 a 7 días. Las placas se sellan con cinta de fibra (creando una pequeña cámara de humedad). Los embriones desecados se plantan en medio SB71-4, en donde se deja que germinen bajo las mismas condiciones de cultivo que las descritas anteriormente. Las plántulas germinadas se retiran del medio de germinación y se enjuagan a fondo con agua y después se plantan en Redi-Earth en una bandeja compacta de 24 células cubierta por una cúpula de plástico transparente. Después de 2 semanas se retira la cúpula y se deja las plantas se endurezcan durante otra semana. Si las plántulas parecen robustas se transplantan a macetas de 25,4 cm (10 pulgadas) de Redi-Earth con hasta 3 plántulas por maceta. Después de 10 a 16 semanas, las semillas maduras se recolectan, se pican y se analizan para los ácidos grasos, según se describió en el ejemplo 14.

Las recetas de los medios pueden encontrarse en el ejemplo 13, y la disolución madre de clorsulfurona es 1 mg/ml en hidróxido de amonio 0,01 N.

Ejemplo 17: Compración de la especificidad de sustrato de la delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* (MaD5) con la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (EgD5) en *Yarrowia lipolytica*

El presente ejemplo describe la comparación de la especificidad de sustrato de una delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* (MaD5; SEQ ID NO:67 y 68) que se describe en la patente de EEUU 6.075.183 y las publicaciones PCT n.º WO 2004/071467 y WO 2005/047479) con la de EgD5 (SEQ ID NO:2) en *Yarrowia lipolytica*.

Este trabajo incluye las siguientes etapas: (1) construcción del vector de expresión pY98 de *Yarrowia* que comprende MaD5; (2) transformación de pY98 y pDMW367 en la cepa Y2224 de *Yarrowia*; y (3) comparación de los perfiles de lípidos dentro de los organismos transformantes que comprenden pY98 o pDMW367 después de suministrar sustratos de ácidos grasos.

Construcción del vector de expresión pY98 de *Yarrowia* que comprende MaD5

El plásmido pY5-22 (SEQ ID NO:69) es un plásmido lanzadera que puede replicarse en *E. coli* y *Yarrowia lipolytica*, que contiene lo siguiente: una secuencia de replicación autónoma de *Yarrowia* (ARS18; n.º de registro de GenBank M91600); un origen de la replicación plasmídico ColE1; un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) para la selección en *E. coli*; un gen URA3 de *Yarrowia* (n.º de registro de GenBank AJ306421) para la selección en *Yarrowia*; y un módulo TEF::NcoI/NotI::XPR quimérico, en el que "XPR" está a aproximadamente 100 pb de la región 3' del gen *Xpr* de *Yarrowia* (n.º de registro de GenBank M17741). Aunque la construcción del plásmido pY5-22 no se describe en la presente en detalle, este se deriva de pY5 (previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 2004/101757).

El plásmido pY5-22GPD (SEQ ID NO:70) se creó a partir de pY5-22 (SEQ ID NO:69) reemplazando el promotor de TEF por el promotor de GPD de *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO:71) utilizando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. El "promotor de GPD" de *Yarrowia* se refiere a la región no traducida 5' cadena arriba delante del codón de inicio de la traducción "ATG" de una proteína codificada por el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) de *Yarrowia lipolytica* y que es necesaria para la expresión (publicación PCT n.º WO 2005/003310). De modo más específico, el promotor de GPD de *Yarrowia lipolytica* se amplificó a partir del plásmido pYZDE2-S (SEQ ID NO:72; que ha sido descrito previamente en la solicitud de patente de EEUU n.º 11/737.772, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia) utilizando los oligonucleótidos GPDsense (SEQ ID NO:73) y GPDantisense (SEQ ID NO:74). El fragmento de ADN resultante se digirió con *SalI*/*NotI* y se clonó en el fragmento *SalI*/*NotI* de pY5-22 (SEQ ID NO:69), reemplazando así al promotor de TEF y el sitio *NcoI*/*NotI* por el promotor de GPD y un sitio *NotI* exclusivo, produciendo con ello pY5-22GPD (SEQ ID NO:70).

El gen de delta-5 desaturasa de *The Mortierella alpina* (SEQ ID NO:67) se liberó de pKR136 (SEQ ID NO:75; que ha sido descrito previamente en la publicación PCT n.º WO 2004/071467 (cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia)) mediante una digestión con *NotI* y se clonó en el sitio *NotI* de pY5-22GPD para producir pY98 (SEQ ID NO:76; figura 9).

Transformación de pY98 (que comprende MaD5) y pDMW367 (que comprende EgD5) en la cepa Y2224 de *Yarrowia* y comparación de los perfiles lipídicos

La cepa Y2224 se aisló de la siguiente manera: Células de *Yarrowia lipolytica* ATCC n.º 20362 de una placa de agar YPD (extracto de levadura al 1%, bactopectona al 2%, glucosa al 2%, agar al 2%) se cultivó en estrías en una placa de MM (75 mg/l de cada uno de uracilo y uridina, YNB 6,7 g/l con sulfato de amonio, sin aminoácidos, y glucosa 20 g/l) que contenía 5-FOA 250 mg/l (Zymo Research). Las placas se incubaron a 28 °C y cuatro de las colonias resultantes se cultivaron por separado en placas de MM que contenían 5-FOA 200 mg/ml y placas de MM que carecían de uracilo y uridina para confirmar la auxotrofia de uracilo de *Ura3*.

La cepa Y2224 se transformó con pY98 (SEQ ID NO:76, figura 9) y pDMV367 (SEQ ID NO:23, figura 5C, ejemplo 6) según se describe en los métodos generales.

Colonias individuales del transformante de *Yarrowia lipolytica* que contiene pY98 (SEQ ID NO:76) o pDMV367 (SEQ ID NO:23) se cultivaron en 3 ml de MM sin uracilo suplementado con tergitol al 0,2% a 30 °C durante 1 día. Después de esto se trasladaron 0,1 ml a 3 ml del mismo medio suplementado con EDA, ETrA, DGLA, ETA o sin ácidos grasos. Se incubaron durante 16 h a 30 °C, 250 rpm y después se obtuvieron los sedimentos mediante centrifugación. Las células se lavaron una vez con agua, se sedimentaron mediante centrifugación y se secaron al aire. Los sedimentos se transesterificaron (Roughan, G. y Nishida, I., Arch. Biochem. Biophys., 276(1):38-46 (1990)) con 500 µl de metóxido de sodio al 1% durante 30 min a 50 °C, tras lo cual se añadieron 500 µl de NaCl 1 M y 100 µl de heptano. Después de un mezclado a fondo y una centrifugación, los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se analizaron mediante GC.

Los FAME (5 µl inyectados de la capa de hexano) se separaron y se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (n.º de catálogo 24152, Supelco Inc.). La temperatura de la estufa se programó para que se mantuviese a 220 °C durante 2,6 min, aumentase hasta 240 °C a 20 °C/min y después se mantuviese durante 2,4 min más. El gas vehículo fue suministrado por un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de patrones disponibles en el mercado (Nu-Chek Prep, Inc.).

Los perfiles de ácidos grasos de *Yarrowia lipolytica* que expresa pY98 (SEQ ID NO:76) o pDMV367 (SEQ ID NO:23) y alimentados con diversos sustratos se muestran en la figura 10A. En la figura 10A, las zonas en gris indican los sustratos empleados y los productos producidos; los ácidos grasos se identifica como 16:0 (palmitato), 16:1, 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, GLA, ALA, STA, EDA, SCI (ácido esciadónico o ácido *cis*-5,11,14-eicosatrienoico; 20:3 omega-6), DGLA, ARA, ETrA, JUP (ácido juniperónico o ácido *cis*-5,11,14,17-eicosatrienoico; 20:4 omega-3), ETA y EPA. Las composiciones de ácidos grasos se expresan como el porcentaje en peso (% en p.) de los ácidos grasos totales.

El porcentaje de delta-5 desaturación ("% delta-5 desat.") de EgD5 y MaD5 para cada sustrato se muestra en la figura 10B y se calcula dividiendo en porcentaje en peso para el producto (SCI, JUP, ARA o EPA) entra la suma del porcentaje en peso para el sustrato y el producto (EDA y SCI, ETA y JUP, DGLA y ARA, o ETA y EPA, respectivamente) y multiplicando por 100 para expresar un porcentaje, dependiendo del sustrato empleado.

Las actividades de EgD5 y MaD5 se comparan utilizando la proporción del porcentaje de delta-5 desaturación ("Propor. Desat Eg/Ma") en la figura 10B y se calculan dividiendo el porcentaje de delta-5 desaturación para EgD5 sobre un sustrato concreto entre el porcentaje de delta-5 desaturación para MaD5 sobre el mismo sustrato.

La especificidad de sustrato de EgD5 y MaD5 para el sustrato de ácido graso omega-6 correcto (es decir, DGLA) frente al ácido graso subproducto (es decir, SCI) o el sustrato de ácido graso omega-3 correcto (es decir, ETA) frente al ácido graso subproducto (es decir, JUP) también se muestra en la figura 10B. De modo específico, la especificidad de sustrato ("Prop. Prod./Subprod.") para los sustratos de omega-6 se calcula dividiendo el porcentaje de delta-5 desaturación ("% delta-5 desat.") para DGLA entre el porcentaje de delta-5 desaturación ("% delta-5 desat.") para EDA, y se muestra en las mismas líneas que los resultados para DGLA. La especificidad de sustrato ("Prop. Prod./Subprod.") para los sustratos de omega-3 se calcula dividiendo el porcentaje de delta-5 desaturación ("% delta-5 desat.") para ETA entre el porcentaje de delta-5 desaturación ("% delta-5 desat.") para ETrA, y se muestra en las mismas líneas que los resultados para ETA. Además, se determinó la proporción de especificidad de sustrato ("Prop. Prod./Subprod. Eg/Ma") para los sustratos de omega-6 dividiendo la especificidad de sustrato de EgD5 sobre los sustratos de omega-6 (es decir, DGLA/EDA) entre la de MaD5. Se calculó la proporción de especificidad de sustrato ("Prop. Prod./Subprod. Eg/Ma") para los sustratos de omega-3 dividiendo la especificidad de sustrato de EgD5 sobre los sustratos de omega-3 (es decir, ETA/ETrA) entre la de MaD5.

La preferencia de EgD5 y MaD5 por sustratos de omega-6 u omega-3 se compara utilizando la proporción del porcentaje de delta-5 desaturación ("Prop. n-6/n-3") en la figura 10B, y se calcula dividiendo el porcentaje de delta-5 desaturación de EgD5 y MaD5 sobre un sustrato de omega-6 concreto (DGLA o EDA) entre el porcentaje de delta-5 desaturación sobre el correspondiente sustrato de omega-3 (ETA o ETrA, respectivamente).

A partir de los resultados de la figura 10B, es evidente que EgD5 es aproximadamente 2,6 a 2,9 veces más activa en *Yarrowia* que MaD5 cuando se emplean DGLA, EDA y ETA como sustratos. La excepción es la actividad para ETrA, que es aproximadamente la misma para ambas enzimas. La especificidad de sustrato de EgD5 y MaD5 por el sustrato de omega-6 correcto (es decir, DGLA frente a EDA) es aproximadamente la misma en *Yarrowia* pero existe una preferencia de aproximadamente 2,5 mayor de EgD5 por ETA (con relación a ETrA) frente a MaD5. La alta actividad y la especificidad de sustrato preferida por ETA frente a ETrA de EgD5 puede ser útil para la producción de PUFA de cadena larga. La EgD5 también muestra preferencia por sustratos de omega-6 (es decir, EDA y DGLA) frente a los sustratos de omega-3 (es decir, ETrA y ETA), respectivamente.

Ejemplo 18: Construcción del vector de expresión de soja eKR916 para la coexpresión de la delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* (MaD5) con una delta-9 elongasa derivada de *Euglena gracilis* (EgD9e) y una delta-8 desaturasa

derivada de *Euglena gracilis* (EgD8)

El presente ejemplo describe la construcción de un vector de soja para la coexpresión de MaD5 (SEQ ID NO:67, ejemplo 17) con EgD9e (SEQ ID NO:77; que se describe en la solicitud de EEUU n.º 11/601.563 (presentada el 16 de noviembre, 2006; n.º de expediente del abogado BB-1562) y EgD8 (SEQ ID NO:78; descrita como Eg5 en la publicación PCT n.º WO 2006/012325).

Delta-9 elongasa de *Euglena gracilis* (EgD9e)

Un clon del banco de ADNc de *Euglena* (eeg1c), denominado eeg1c.pk001.n5f, que contiene la delta-9 elongasa de *Euglena gracilis* (EgD9e; SEQ ID NO:77) se empleó como molde para amplificar EgD9e con los cebadores oligonucleotídicos oEugEL1-1 (SEQ ID NO:79) y oEugEL1-2 (SEQ ID NO:80) utilizando la ADN polimerasa VentR® (n.º de catálogo M0254S, New England Biolabs Inc., Beverly, MA) siguiendo el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN resultante se clonó en el vector de clonación pCR-Blunt® utilizando el kit de clonación de PCR Zero Blunt® (Invitrogen Corporation), siguiendo el protocolo del fabricante, para producir pKR906 (SEQ ID NO:81).

Un plásmido de partida pKR72 (n.º de registro ATCC PTA-6019; SEQ ID NO:82, secuencia de 7085 pb), un derivado de pKS123 que ha sido previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 02/008269 (cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia), contiene el gen de higromicina B fosfotransferasa (HPT) (Gritz, L. y Davies, J., *Gene*, 25:179-188 (1983)), flanqueado por el promotor de T7 y un terminador de la transcripción (concretamente, un módulo T7prom/HPT/T7term), y un origen de la replicación bacteriano (ori) para la selección y replicación en bacterias (por ejemplo, *E. coli*). Además, pKR72 también contiene HPT, flanqueado por el promotor de 35S (Odell *et al.*, *Nature*, 313:810-812 (1985)) y el terminador de la transcripción NOS 3' (Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1:561-570 (1982)) (concretamente, un módulo 35S/HPT/NOS3' cassette) para la selección en plantas, tales como la soja. pKR72 también contiene un sitio de restricción *NotI*, flanqueado por el promotor para la subunidad α' de β -conglucininina (Beachy *et al.*, *EMBO J.*, 4:3047-3053 (1985)) y la región de fin de la transcripción 3' del gen de faseolina (Doyle *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261:9228-9238 (1986)), lo cual permite una potente expresión específica de tejido en las semillas de soja de los genes clonados en el sitio *NotI*.

El fragmento Asci del plásmido pKS102 (SEQ ID NO:83), previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 02/00905 (cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia), que contiene un módulo T7prom/hpt/T7term y un origen bacteriano *ori*, se combinó con el fragmento Ascl del plásmido pKR72 (SEQ ID NO:82), que contiene un módulo β con/*NotI*/Phas para producir pKR197 (SEQ ID NO:84), previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 04/071467 (cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia).

El gen de la delta-9 elongasa de *Euglena gracilis* se liberó de pKR906 (SEQ ID NO:81) mediante una digestión con *NotI* y se clonó en el sitio *NotI* de pKR197 (SEQ ID NO:84) para producir el vector de clonación intermedio vector pKR911 (SEQ ID NO:85).

Delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis* (EgD8)

El plásmido pKR680 (SEQ ID NO:86), que ha sido previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 2006/012325 (cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia), contiene la delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis* (EgD8; SEQ ID NO:78; descrita como Eg5 en el documento WO 2006/012325) flanqueada por un promotor del inhibidor de tripsina de soja de Kunitz (Kti) (Jofuku *et al.*, *Plant Cell*, 1:1079-1093 (1989)) y la región de terminación 3' Kti, cuyo aislamiento se describe en la patente de EEUU 6.372.965, seguido del terminador de la transcripción de albúmina de soja, que ha sido previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 2004/071467 (concretamente, un módulo Kti/*NotI*/Kti3'Salb3').

El plásmido pKR680 (SEQ ID NO:86) se digirió con *BsWI*, y el fragmento que contenía EgD8 se clonó en el sitio *BsWI* de pKR911 (SEQ ID NO:85) para producir pKR913 (SEQ ID NO:87).

Delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* (MaD5)

El plásmido pKR767 (SEQ ID NO:88), que ha sido previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 2006/012325 (cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia), contiene la delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* (MaD5; SEQ ID NO:67) flanqueada por el promotor para el gen Gy1 de glicinina de soja y la región de fin de la transcripción 3' de legumina A2 de soja (concretamente, un módulo Gy1/MaD5/legA2, cuya construcción se describe en el documento WO 2006/012325).

El módulo Gy1/MaD5/legA2 se liberó de pKR767 (SEQ ID NO:88) mediante una digestión con *SbfI* y el fragmento resultante se clonó en el sitio *SbfI* de pKR913 (SEQ ID NO:87) para producir pKR916 (SEQ ID NO:89). En la figura 11A se muestra un dibujo esquemático de pKR916. De esta forma, la delta-9 elongasa de *Euglena gracilis* (indicada como "eug el1" en la figura 11A) se coexpresó con la delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis* (indicada como "eug d8-sq5" en la figura 11A) y la delta-5 desaturasa de *Mortierella alpina* (indicada como "DELTA 5 DESATURASA M ALPINA" en la figura 11A) detrás de promotores fuertes específicos de semilla.

Ejemplo 19: Construcción del vector de expresión de soja pKR1037 para la coexpresión de la delta-5 desaturasa de

Euglena gracilis (EgD5) con una delta-9 elongasa derivada de *Euglena gracilis* (EgD9e) y una delta-8 desaturasa derivada de *Euglena gracilis* (EgD8)

El presente ejemplo describe la construcción de un vector de soja para la coexpresión de EgD5 (SEQ ID NO:1, ejemplo 5) con EgD9e (SEQ ID NO:77, ejemplo 18) y EgD8 (SEQ ID NO:78, ejemplo 18).

- 5 El plásmido de partida pKR974 (SEQ ID NO:90) es idéntico a pKR767 (SEQ ID NO:88, ejemplo 18) excepto que el fragmento *NotI* que contiene MaD5 ha sido reemplazado por un fragmento *NotI* que contiene la delta-5 desaturasa de *Saprolegnia diclina* (SdD5; SEQ ID NO:94, que se describe en la publicación PCT n.º WO 2004/071467). Además, un sitio *MfeI* en el terminador legA2 de pKR767 (SEQ ID NO:88) se retira mediante digestión con *MfeI*, rellenando el sitio *MfeI* y reacoplando (es decir, CAATTG se convierte en CAATTAATTG), y por tanto, el terminador legA2 de pKR974 (SEQ ID NO:90) tiene 770 pb frente a 766 pb para pKR767 (SEQ ID NO:88).

- 10 Para clonar EgD5 en un vector de expresión de soja es necesario introducir un sitio de restricción *NotI* en el extremo 5' del gen. Los expertos en la técnica sabrán que hay muchas maneras de introducir sitios de restricción en genes, tales como, pero sin limitarse a PCR o mediante subclonación en vectores que contienen los sitios apropiados. En este caso, para introducir un sitio *NotI* en el extremo 5' de EgD5 (SEQ ID NO:1), pDMW367 (SEQ ID NO:23) se digirió con *MfeI* y después se digirió parcialmente con *NcoI*. El fragmento *NcoI/MfeI* que contiene una EgD5 de longitud completa (SEQ ID NO:1) se clonó en el sitio *NcoI/MfeI* de un vector de clonación intermedio que tiene un sitio *NotI* directamente cadena arriba del sitio *NcoI* (concretamente, GCGGCCGCAACCATGG). El plásmido resultante después se digiere con *NotI*, y el fragmento que contiene EgD5 (SEQ ID NO:1) se clonó en el sitio *NotI* de pKR974 (SEQ ID NO:90) para producir pKR1032 (SEQ ID NO:91).

- 20 El módulo Gy1/EgD5/legA2 se liberó de pKR1032 (SEQ ID NO:91) mediante una digestión con *SbfI*, y el fragmento resultante se clonó en el sitio *SbfI* de pKR913 (SEQ ID NO:87) para producir pKR1037 (SEQ ID NO:92). En la figura 11B se muestra un dibujo esquemático de pKR1037 (SEQ ID NO:92). De esta forma, la delta-9 elongasa de *Euglena gracilis* (indicada como "eug el1" en la figura 11B) puede coexpresarse con la delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis* (indicada como "eug d8-sq5" en la figura 11 B) y la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (indicada como "eug d5 DS" en la figura 11 B) detrás de promotores fuertes específicos de semilla.

- 25 Ejemplo 20: Coexpresión de la delta-9 elongasa de *Euglena gracilis*, la delta-8 desaturasa de *Euglena gracilis*, y la delta-17 desaturasa de *Saprolegnia diclina* con la delta-5 desaturasa I de *Mortierella alpina* (pKR916 y nKR328) o la delta-5 desaturasa de *Euglena gracilis* (pKR1037 y pKR328) en embriones somáticos de soja

- 30 El presente ejemplo describe la transformación y la expresión en embriones somáticos de soja de pKR916 (SEQ ID NO:89, ejemplo 18, que contiene EgD9e, EgD8 y MaD5) con pKR328 (SEQ ID NO:93, figura 11C, previamente descrito en la publicación PCT n.º WO 04/071467), que contiene la delta-17 desaturasa de *Saprolegnia diclina* (SdD17) y el gen de higromicina fosfotransferasa para la selección sobre higromicina. El presente ejemplo también describe la transformación y la expresión en embriones somáticos de soja de pKR1037 (SEQ ID NO:92, ejemplo 19, que contiene EgD9e, EgD8 y EgD5) con pKR328 (SEQ ID NO:93, figura 11 C).

- 35 Un cultivo en suspensión embriogénico de soja (cv. Jack) se transformó con el fragmento *Ascl* que contiene el módulo de expresión de pKR916 (SEQ ID NO:89) y el plásmido intacto pKR328 (SEQ ID NO:93), o con el fragmento *Ascl* que contiene el módulo de expresión de pK1037 (SEQ ID NO:92) y el plásmido intacto pKR328 (SEQ ID NO:93), según se describe en el ejemplo 13.

- 40 Los embriones se maduraron en medio líquido de histodiferenciación y maduración de soja (medio líquido SHaM; Schmidt *et al.*, *Cell Biology and Morphogenesis*, 24:393 (2005)) utilizando un procedimiento modificado. Brevemente, después de 4 semanas de selección en SB196, según se describe en el ejemplo 13, se trasladaron los agrupamientos de embriones a 35 ml de SB228 (medio líquido SHaM) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El tejido se mantuvo en medio líquido SHaM en un agitador rotatorio a 130 rpm y 26 °C con luces fluorescentes blancas frías con un fotoperiodo de 16:8 hr luz/oscuridad a una intensidad lumínica de 60-85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ durante 2 semanas a medida que los embriones maduraban. Los embriones que crecieron durante 2 semanas en medio líquido SHaM

- 45 tienen el mismo tamaño y contenido en ácidos grasos que los embriones cultivados en SB166/SB103 durante 5-8 semanas, según se describe en el ejemplo 13.

Recetas de los medios

SB 228 - Histodiferenciación y maduración de soja (SHaM) (por litro)

H ₂ O DDI	600 ml
FN-Lite Macro Salts para SHaM 10x	100 ml
MS Micro Salts 1000x	1 ml
MS FeEDTA 100 x	10 ml
CaCl 100x	6,82 ml

SB 228 - Histodiferenciación y maduración de soja (SHaM) (por litro)

Vitamina B5 1000x	1 ml
L-metionina	0,149 g
Sacarosa	30 g
Sorbitol	30 g

Ajustar el volumen a 900 ml

pH 5,8

Autoclave

Añadir al medio enfriado (≤ 30 °C)

*Glutamina (concentración final 30 mM) al 4% 110 ml

*Nota: el volumen final será de 1010 ml después de la adición de glutamina.

Puesto que la glutamina se degrada con relativa rapidez, puede resultar preferido añadirla inmediatamente antes de utilizar el medio. Si se añade glutamina, la caducidad es de 2 semanas; el medio base puede conservarse durante más tiempo sin glutamina.

FN-Lite Macro para SHAM 10x - Disolución madre n.º 1 (por litro)

(NH ₄) ₂ SO ₄ (sulfato de amonio)	4,63 g
KNO ₃ (nitrato de potasio)	28,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (sulfato de magnesio heptahidrato)	3,7 g
KH ₂ PO ₄ (fosfato de potasio monobásico)	1,85 g
Completar hasta el volumen	
Autoclave	

5

MS Micro 1000x - Disolución madre n.º 2 (por 1 litro)

H ₃ BO ₃ (ácido bórico)	6,2 g
MnSO ₄ ·H ₂ O (sulfato de manganeso monohidrato)	16,9 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (sulfato de cinc heptahidrato)	8,6 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (molibdato de sodio dihidrato)	0,25 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O (sulfato de cobre pentahidrato)	0,025 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O (cloruro de cobalto hexahidrato)	0,025 g
KI (yoduro de potasio)	0,8300 g
Completar hasta el volumen	
Autoclave	

FeEDTA 100x - Disolución madre n.º 3 (por litro)

Na ₂ EDTA* (EDTA sodio)	3,73 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O (sulfato de hierro heptahidrato)	2,78 g

*El EDTA debe disolverse completamente antes de añadir hierro.

Completar hasta el volumen

La disolución es fotosensible. La botella o botellas deben envolverse en una lámina de aluminio para omitir la luz.

Autoclave

Ca 100x - Disolución madre n.º 4 (por litro)

CaCl ₂ ·2H ₂ O (cloruro de calcio dihidrato)	44 g
Completar hasta el volumen	
Autoclave	

Vitamina B5 100x - Disolución madre n.º 5 (por litro)

Tiamina·HCl	10 g
Ácido nicotínico	1 g
Piridoxina·HCl	1 g
Mioinositol	100 g
Completar hasta el volumen	
Conservar congelada	

Glutamina al 4% - Disolución madre n.º 6 (por litro)

Agua DDI calentada hasta 30 °C	900 ml
L-glutamina	40 g

Añadir gradualmente con agitación y aplicando calor bajo

No superar 35 °C

Completar hasta el volumen

Esterilizar mediante filtración

Conservar congelada*

*Nota: Calentar la disolución madre descongelada en un baño a 31 °C para disolver completamente los cristales.

5 Después de la maduración en medio líquido SHaM, los embriones individuales se retiraron de los agrupamientos, se secaron y se seleccionaron para alteraciones en su composición de ácidos grasos, tal como se describió anteriormente.

10 Un subconjunto de los embriones de soja (concretamente, seis embriones por acontecimiento) transformados con pKR916 (SEQ ID NO:89) y pKR328 (SEQ ID NO:93), o pKR1037 (SEQ ID NO:92) y pKR328 (SEQ ID NO:93), se recolectaron e introdujeron en viales de GC de vidrio y se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante transesterificación. Para la transesterificación se añadieron 50 µl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) y 0,5 ml de hexano a los embriones en los viales de vidrio y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µl inyectados de la capa de hexano) se separaron y se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (n.º de catálogo 24152, Supelco Inc.). La temperatura de la estufa se programó para mantenerse a 15 220 °C durante 2,6 min, aumentar hasta 240 °C a 20 °C/min y después mantenerse durante 2,4 min más. El gas vehículo se suministra mediante un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se comparan con los de patrones de ésteres metílicos disponibles en el mercado (Nu-Chek Prep., Inc.).

20 De esta forma, se analizaron 60 acontecimientos transformados con pKR916 (SEQ ID NO:89) y pKR328 (SEQ ID NO:93) y 45 acontecimientos transformados con pKR1037 (SEQ ID NO:92) y pKR328 (SEQ ID NO:93). La media de los perfiles de ácidos grasos para los diez acontecimientos que tienen la mayor actividad delta-5 desaturasa para cada transformación (pKR916 y pKR328, pKR1037 y pKR328) se muestran en la figura 12A y la figura 12B, respectivamente.

25 En las figuras 12A y 12B, los ácidos grasos se identifican como 16:0 (palmitato), 18:0 (ácido esteárico), 18:1 (ácido oleico), LA, ALA, EDA, SCI, DGLA, ARA, ERA, JUP, ETA y EPA. Los ácidos grasos listados como "otros" incluyen: 18:2 (5,9), GLA, STA, 20:0, 20:1(11), 20:2 (7,11) o 20:2 (8,11) y DPA. Cada uno de estos "otros" ácidos grasos está presente con una abundancia relativa menor que 3,0% de los ácidos grasos totales. Las composiciones de ácidos grasos para un embrión individual se expresan como el porcentaje en peso (% en p) de los ácidos grasos totales, y la media de la composición de ácidos grasos es una media de seis embriones individuales por cada acontecimiento.

30 La actividad de la delta-5 desaturasa para los sustratos "correctos" (es decir, DGLA y ETA) se expresa como el porcentaje de delta-5 desaturación ("Correcto % delta-5 desat."), calculado según la siguiente fórmula: $[(\text{producto})/(\text{sustrato} + \text{producto})] \times 100$. De modo más específico, el porcentaje de delta-5 desaturación para los

sustratos “correctos” se determinó como: $([ARA + EPA]/[DGLA + ETA + ARA + EPA]) \times 100$.

La actividad de la delta-5 desaturase para los sustratos “incorrectos” (es decir, EDA y ERA) también se expresa como el porcentaje de delta-5 desaturación (“Incorrecto % delta-5 desat.”), calculado como: $([SCI + JUP]/[EDA + ERA + SCI + JUP]) \times 100$.

- 5 Las especificidades de sustrato de MaD5 y EgD5 por los sustratos “correctos” (es decir, DGLA y ETA) frente a los sustratos “incorrectos” (es decir, EDA y ERA) se compararon, y la comparación se muestra en la figura 13. En la figura 13, la actividad de la delta-5 desaturasa por los sustratos “correctos” (“Correcto % delta-5 desat.”) se representa en el eje de abscisas, y la actividad de la delta-5 desaturase para los sustratos “incorrectos” (“Incorrecto % delta-5 desat.”) se representa en el eje de ordenadas para MaD5 (datos de la figura 12A) y EgD5 (datos de la figura 12B).

- 10 La figura 12B demuestra que la actividad de EgD5 en embriones de soja es muy alta, con una media de conversión (Correcto % delta-5 desat.) del 77% al 99% en los diez acontecimientos con mayor puntuación. La especificidad de sustrato de EgD5 (figura 13) tiene preferencia por los sustratos “correctos” frente a los sustratos “incorrectos”, cuando se compara con MaD5. Debido a la alta actividad y especificidad de sustrato, EgD5 puede ser útil para producir PUFA tales como, pero sin limitarse a EPA y DHA, en una célula hospedante.
- 15

LISTA DE SECUENCIAS

<110> E. I. du Pont de Nemours & Company
 <120> Delta-5 desaturasa y su uso para fabricar ácidos grasos poliinsaturados
 <130> BB1629
 5 <150> documento US 60/801.172
 <151> 17-05-2006
 <160> 94
 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 10 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> *Euglena gracilis*

<220>
 <221> característica_misc
 15 <222> (1)..(1350)
 <223> delta-5 desaturasa

<400> 1

atggctctca	gtcttaccac	agaacagctg	ttagaacgcc	ctgatttggg	tgcgattgat	60
ggcatcctct	acgaccttga	agggcttgcc	aaagtccatc	caggaggaga	tttgattctc	120
gcttctgggtg	cctctgatgc	ctccccctct	ttttattcaa	tgcatccata	cgtcaaaccg	180
gagaattcca	aattgcttca	acagtccgtc	cgagggaagc	atgaccgcac	ctcgaaggac	240
attgtctaca	cgtatgattc	tcccttcgca	caagacgtta	agcggacaat	gcgcgaggtg	300
atgaaaggga	ggaactggta	cgcaaccctt	ggcttctggc	tgcgcaccgt	tgggatcctc	360
gccgtgacgg	ccttttgcca	gtggcactgg	gctaccacgg	ggatggtgct	gtggggcctg	420
ttgactggat	tcatgcacat	gcagatcggc	ttatccatcc	agcatgatgc	gtcccacggg	480
gccatcagca	agaagccttg	ggccaacgcc	ctcttcgcct	acggcattga	cgtcatcgga	540
tcgtcccggg	ggatttggct	gcagtcgcac	atcatgcggc	accacaccta	caccaaccag	600
cacggcctcg	acctggatgc	ggagtcggca	gagccgttcc	tggtgttcca	caactacccc	660
gccgcaaaca	ccgcccgaag	gtgggtccac	cgcttccaag	cttggtacat	gtaccttggtg	720
ctggggggcat	acgggggtatc	gctgggtgtac	aaccgcgtct	acattttccg	gatgcagcac	780
aatgacacca	tcccagagtc	tgtcacggcc	atgcggggaga	atggctttct	gcggcgctac	840
cgcacacttg	cattcgtgat	gcgagctttc	ttcatcttcc	ggaccgcatt	cttgccctgg	900
tacctcactg	ggacctcatt	gctgatcacc	attcctctgg	tgcccactgc	aactgggtgcc	960

ttcttgacgt tcttcttcat tttgtccac aattttgatg gctccgaacg gatccccgac 1020
aagaactgca aggttaagag ctctgagaag gacgttgagg ctgaccaa at tgactggat 1080
cgggcgagcagg tggagacgtc ctccacatac ggtggcccca tcgccatgtt cttcactggc 1140
ggtctcaatt tccagatcga gcaccacctc tttccccgga tgcgtcttg gcactacccc 1200
ttcgtccagc aggcgggtccg ggagtgttgc gaacgccatg gaggcgata tgttttctac 1260
cctaccatcg tcggcaacat catctccacc ctgaagtaca tgcataaggt ggggtgtcgtc 1320
cactgcgtga aggacgcaca ggattcctga 1350

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 2

Met Ala Leu Ser Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Glu Arg Pro Asp Leu
1 5 10 15

Val Ala Ile Asp Gly Ile Leu Tyr Asp Leu Glu Gly Leu Ala Lys Val
20 25 30

His Pro Gly Gly Asp Leu Ile Leu Ala Ser Gly Ala Ser Asp Ala Ser
35 40 45

Pro Leu Phe Tyr Ser Met His Pro Tyr Val Lys Pro Glu Asn Ser Lys
50 55 60

Leu Leu Gln Gln Phe Val Arg Gly Lys His Asp Arg Thr Ser Lys Asp
65 70 75 80

Ile Val Tyr Thr Tyr Asp Ser Pro Phe Ala Gln Asp Val Lys Arg Thr
85 90 95

Met Arg Glu Val Met Lys Gly Arg Asn Trp Tyr Ala Thr Pro Gly Phe
100 105 110

Trp Leu Arg Thr Val Gly Ile Ile Ala Val Thr Ala Phe Cys Glu Trp
115 120 125

His Trp Ala Thr Thr Gly Met Val Leu Trp Gly Leu Leu Thr Gly Phe
130 135 140

Met His Met Gln Ile Gly Leu Ser Ile Gln His Asp Ala Ser His Gly
145 150 155 160

Ala Ile Ser Lys Lys Pro Trp Val Asn Ala Leu Phe Ala Tyr Gly Ile
165 170 175

Asp Val Ile Gly Ser Ser Arg Trp Ile Trp Leu Gln Ser His Ile Met
180 185 190

Arg His His Thr Tyr Thr Asn Gln His Gly Leu Asp Leu Asp Ala Glu
195 200 205

Ser Ala Glu Pro Phe Leu Val Phe His Asn Tyr Pro Ala Ala Asn Thr
210 215 220

Ala Arg Lys Trp Phe His Arg Phe Gln Ala Trp Tyr Met Tyr Leu Val
225 230 235 240

Leu Gly Ala Tyr Gly Val Ser Leu Val Tyr Asn Pro Leu Tyr Ile Phe
245 250 255

Arg Met Gln His Asn Asp Thr Ile Pro Glu Ser Val Thr Ala Met Arg
260 265 270

Glu Asn Gly Phe Leu Arg Arg Tyr Arg Thr Leu Ala Phe Val Met Arg
275 280 285

Ala Phe Phe Ile Phe Arg Thr Ala Phe Leu Pro Trp Tyr Leu Thr Gly
290 295 300

Thr Ser Leu Leu Ile Thr Ile Pro Leu Val Pro Thr Ala Thr Gly Ala
305 310 315 320

Phe Leu Thr Phe Phe Phe Ile Leu Ser His Asn Phe Asp Gly Ser Glu
325 330 335

Arg Ile Pro Asp Lys Asn Cys Lys Val Lys Ser Ser Glu Lys Asp Val
340 345 350

Glu Ala Asp Gln Ile Asp Trp Tyr Arg Ala Gln Val Glu Thr Ser Ser
355 360 365

Thr Tyr Gly Gly Pro Ile Ala Met Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe
370 375 380

Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Trp His Tyr Pro
385 390 395 400

Phe Val Gln Gln Ala Val Arg Glu Cys Cys Glu Arg His Gly Val Arg
405 410 415

Tyr Val Phe Tyr Pro Thr Ile Val Gly Asn Ile Ile Ser Thr Leu Lys
420 425 430

Tyr Met His Lys Val Gly Val Val His Cys Val Lys Asp Ala Gln Asp
435 440 445

Ser

<210> 3

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> *Euglena gracilis*

<220>

<221> característica_misc

<223> delta-5 desaturasa sintética (con codones optimizados) para *Yarrowia lipolytica*

<400> 3

```

atggctctct cccttactac cgagcagctg ctcgagcgcac ccgacctggt tgccatcgac      60
ggcattctct acgatctgga aggtcttgcc aaggtccatc ccggaggcga cttgatcctc      120
gcttctgggtg cctccgatgc ttctcctctg ttctactcca tgcaccctta cgtcaagccc      180
gagaactcga agctgcttca acagtctctg cgaggcaagc acgaccgaac ctccaaggac      240
attgtctaca cctacgactc tccctttgca caggacgtca agcgaactat gcgagaggtc      300
atgaaaggtc ggaactggta tgccacacct ggattctggc tgcgaaccgt tggcatcatt      360
gctgtcaccg ccttttgcca gtggcactgg gctactaccg gaatgggtgct gtgggggtctc      420
ttgactggat tcatgcacat gcagatcggc ctgtccattc agcacgatgc ctctcatggt      480
gccatcagca aaaagccctg ggtcaacgct ctctttgcct acggcatcga cgtcattgga      540
tcgtccagat ggatctggct gcagtctcac atcatgcgac atcacaccta caccaatcag      600
catgggtctcg acctggatgc cgagtcgcga gaaccattcc ttgtgttcca caactaccct      660
gctgccaaaca ctgctcgaaa gtggtttcac cgattccagg cctgggtacat gtacctcgtg      720
cttgaggcct acggcgtttc gctgggtgtac aacctctctc acatcttccg aatgcagcac      780
aacgacacca ttcccagatc tgtcacagcc atgcgagaga acggctttct gcgacggtac      840
cgaacccttg cattcgttat gcgagcttcc ttcatctttc gaaccgcctt cttgccctgg      900
tatctcactg gaacctccct gctcatcacc attcctctgg tgcccactgc taccgggtgcc      960
ttctcacct tctttttcat cttgtctcac aatttcgatg gctcggagcg aatccccgac     1020

```

10

aagaactgca aggtcaagag ctccgagaag gacgttgaag ccgatcagat cgactgggtac 1080
 agagctcagg tggagacetc ttccacctac ggtggacca ttgccatgtt ctttactggc 1140
 ggtctcaact tccagatcga gcatcacctc ttctctcgaa tgtcgtcttg gcactatccc 1200
 ttcgtgcagc aagctgtccg agagtgttgc gaacgacacg gagttcggta cgtcttctac 1260
 cctaccattg tgggcaacat catttcacc ctcaagtaca tgcacaaagt cgggtgtggtt 1320
 cactgtgtca aggacgctca ggattcctaa 1350

<210> 4

<211> 590

<212> ADN

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 4

ggccaccaca tctacaccaa ccagcacggc ctcgacctgg atgcggagtc ggcagagccg 60
 ttcttgggtg tccacaacta ccccgccgca aacaccgccc gaaagtgggt ccaccgcttc 120
 caagcttggg acatgtacct tgtgctgggg gcatacgggg tategctggg gtacaacccg 180
 ctctacattt tccggatgca gcacaatgac accatcccag agtctgtcac ggccatgcgg 240
 gaaaatggct ttctgcggcg ctaccgcaca cttgcattcg tgatgcgagc tttcttcac 300
 ttccggaccg cattcttgcc ctggtacctc actgggacct cattgctgat caccattcct 360
 ctggtgccc cgcgaactgg tgccttcttg acgttcttct tcattttgtc ccacaatttt 420
 gatggctccg aacggatccc cgacaagaac tgcaaggtta agagctctga gaaggacggt 480
 gaggtgacc aaattgactg gtatcggggc caggtggaga cgtcctccac atacggtggc 540
 cccatcgcca tgttcttcac tggcgggtctc aactaccaaa tcgtccacca 590

<210> 5

<211> 196

<212> PRT

10 <213> *Euglena gracilis*

<400> 5

Gly His His Ile Tyr Thr Asn Gln His Gly Leu Asp Leu Asp Ala Glu
 1 5 10 15

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

Ala Arg Lys Trp Phe His Arg Phe Gln Ala Trp Tyr Met Tyr Leu Val
 35 40 45

Leu Gly Ala Tyr Gly Val Ser Leu Val Tyr Asn Pro Leu Tyr Ile Phe

50	55	60
Arg Met Gln His Asn Asp Thr Ile Pro Glu Ser Val Thr Ala Met Arg		
65	70	75 80
Glu Asn Gly Phe Leu Arg Arg Tyr Arg Thr Leu Ala Phe Val Met Arg		
	85	90 95
Ala Phe Phe Ile Phe Arg Thr Ala Phe Leu Pro Trp Tyr Leu Thr Gly		
	100	105 110
Thr Ser Leu Leu Ile Thr Ile Pro Leu Val Pro Thr Ala Thr Gly Ala		
	115	120 125
Phe Leu Thr Phe Phe Phe Ile Leu Ser His Asn Phe Asp Gly Ser Glu		
	130	135 140
Arg Ile Pro Asp Lys Asn Cys Lys Val Lys Ser Ser Glu Lys Asp Val		
	145	150 155 160
Glu Ala Asp Gln Ile Asp Trp Tyr Arg Ala Gln Val Glu Thr Ser Ser		
	165	170 175
Thr Tyr Gly Gly Pro Ile Ala Met Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr		
	180	185 190
Gln Ile Val His		
	195	

<210> 6

<211> 797

<212> ADN

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 6

cacagaacag ctgtagaac gccctgattt ggttgcgatt gatggcatcc tctacgacct	60
tgaagggtt gccaaagttc atccaggagg agatttgatt ctgcttctg gtgcctctga	120
tgctccccct ctcttttatt caatgcatcc atacgtcaaa ccggagaatt ccaaattgct	180
tcaacagttc gtccgaggga agcatgaccg cacctcgaag gacattgtct acacgtatga	240
ttctcccttc gcacaagacg ttaagcggac aatgcgcgag gtgatgaaag ggaggaactg	300
gtacgcaacc cctggcttct ggctgcgcac cgttgggatc atcgccgtga cggccttttg	360
cgagtggcac tgggctacca cggggatggt gctgtggggc ctggtgactg gattcatgca	420
catgcagatc ggcttatcca tccagcatga tgcgtccac ggggccatca gcaaggagcc	480

ttgggtcaac gccctcttcg cctacggcat tgacgtcatc ggatcgtccc ggtggatttg 540
gctgcagtca cacatcatgc ggcaccacac ctacaccaac cagcacggcc tcgacctgga 600
tgcggagtcg gcagagccgt tcctggtggt ccacagctac cccgccgcaa acaccgcccg 660
aaagtggttc caccgcttcc aagcttggtg catgtacctt gcgctggggg catacggggg 720
atcgctgggtg tacaacccgc tctacatttt ccggatgcag cacaatgaca ccatcccaga 780
gtctgtcacg gccatgc 797

<210> 7

<211> 559

<212> ADN

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 7

cacagaacag ctgttagaac gccctgattt ggttgcgatt gatggcatcc tctacgacct 60
tgaagggctt gccaaagttc atccaggagg agatttgatt ctgccttctg gtgcctctga 120
tgccctccct ctcttttatt caatgcatcc atacgtcaaa ccggagaatt ccaaattgct 180
tcaacagttc gtccgagggg agcatgaccg cacctcgaag gacattgtct acacgtatga 240
ttctcccttc gcacaagacg ttaagcggac aatgcgcgag gtgatgaaag ggaggaactg 300
gtacgcaacc cctggcttct ggcgtgcgcac cgttgggac atcgccgtga cggccttttg 360
cgagtggcac tgggctacca cggggatggt gctgtggggc ctgttgactg gattcatgca 420
catgcagatc ggcttatcca tccagcatga tgcgtcccac ggggccatca gcaaggagcc 480
ttgggtcaac gccctcttcg cctacggcat tgacgtcatc ggatcgtccc ggtggatttg 540
gctgcagtca cacatcatg 559

<210> 8

<211> 273

10 <212> ADN

<213> *Euglena gracilis*

<400> 8

ggaatggctc tcagtcttac cacagaacag ctgttagaac gccctgattt ggttgcgatt 60
gatggcatcc tctacgacct tgaagggctt gccaaagttc atccaggagg agatttgatt 120
ctgccttctg gtgcctctga tgccctccct ctcttttatt caatgcatcc atacgtcaaa 180
ccggagaatt ccaaattgct tcaacagttc gtccgagggg agcatgaccg cacctcgaag 240
gacattgtct acacgtatga ttctcccttc gca 273

<210> 9

15 <211> 20

<212> ADN

<213> *Euglena gracilis*

<400> 9

ggaatggctc tcagtcttac 20

20 <210> 10

<211> 728
<212> ADN
<213> *Euglena gracilis*

<400> 10

```
cctcactggg acctcattgc tgatcaccat tctctcgggtg cccacygcaa ctggtgcctt      60
cttgacgttc ttcttcattt tgtcccacaa ttttgatggc tccgaacgga tccccgacaa      120
gaactgcaag gttaagagct ctgagaagga cgttgaggct gaccaaattg actggtatcg      180
ggcgcaggtg gagacgtcct ccacatacgg tggccccatc gccatgttct tcaactggcgg      240
tctcaatttc cagatcgagc accacctctt tccccggatg tcgtcttggc actaccctt      300
cgtccagcag gcggtccggg agtggtgcga acgccatgga gtgcgatatg ttttctaccc      360
taccatcgtc ggcaacatca tctccacct gaagtacatg cataagggtg gtgtcgtcca      420
ctgcgtgaag gacgcacagg attcctgagg ggcaggggtga ccaagaacga tcatcgatgt      480
gttcttcttg ccctttgggtg gggtaactgc cagattgctc cactgaaccg tatcctaact      540
ctgacctctt ccaacctgtt gttgagtgtt tgctttatgc tccaaagtgg cttcttattt      600
ggtgacctgt ggggcagcgg cacctgtgcc atgcagctga taaccaggc tgctactcta      660
agttggatgg ccaatcgtct ggcattgata tccctgctca gcgttgcat ccaatggttt      720
5  gcttatcc                                728
```

<210> 11
<211> 464
<212> ADN
<213> *Euglena gracilis*

10 <400> 11

```
cctctttccc cggatgtcgt cttggcacta ccccttcgtc cagcaggcgg tccgggagtg      60
ttgcgaacgc catggagtgc gatatgtttt ctacctacc atcgtcggca acatcatctc      120
caccctgaag tacatgcata aggtgggtgt cgtccactgc gtgaaggacg cacaggatc      180
ctgaggggca gggtgaccaa gaacgatcat cgatgtgttc ttctggccct ttggtgggg      240
actcgccaga ttgtccact gaaccgtatc ctaactctga ccctctccaa ccctgtgttg      300
agtgtttgct ttatgctcca aagtggcttc ttatttggtg acccgtgggg cagcggcacc      360
tgtgccatgc agctgataac ccaggctgct actctaagtt ggatggccaa tcgtctggca      420
ttgatatccc tgctcagcgt tgcattccaa tgggttgctt atcc                                464
```

<210> 12
<211> 456
<212> PRT
15 <213> *Pythium irregulare* (n.º de registro de GenBank AAL13311)

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<223> delta-5 desaturasa

<400> 12

Met	Gly	Thr	Asp	Gln	Gly	Lys	Thr	Phe	Thr	Trp	Gln	Glu	Val	Ala	Lys	1	5	10	15
His	Asn	Thr	Ala	Lys	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ile	Arg	Gly	Glu	Val	Tyr	20	25	30	
Asp	Val	Thr	Glu	Trp	Ala	Asp	Lys	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Ile	35	40	45	
Val	Leu	His	Ser	Gly	Arg	Glu	Cys	Thr	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Tyr	His	50	55	60	
Pro	Phe	Ser	Asn	Arg	Ala	Asp	Lys	Ile	Leu	Ala	Lys	Tyr	Lys	Ile	Gly	65	70	75	80
Lys	Leu	Val	Gly	Gly	Tyr	Glu	Phe	Pro	Val	Phe	Lys	Pro	Asp	Ser	Gly	85	90	95	
Phe	Tyr	Lys	Glu	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Ala	Glu	Tyr	Phe	Lys	Thr	Asn	100	105	110	
Asn	Leu	Asp	Pro	Lys	Ala	Ala	Phe	Ala	Gly	Leu	Trp	Arg	Met	Val	Phe	115	120	125	
Val	Phe	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Tyr	Met	Gly	Met	Asn	Glu	Leu	Ile	130	135	140	
Pro	Gly	Asn	Val	Tyr	Ala	Gln	Tyr	Ala	Trp	Gly	Val	Val	Phe	Gly	Val	145	150	155	160
Phe	Gln	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	His	Val	Met	His	Asp	Ser	Ser	His	Ala	165	170	175	
Ala	Cys	Ser	Ser	Ser	Pro	Ala	Met	Trp	Gln	Ile	Ile	Gly	Arg	Gly	Val	180	185	190	
Met	Asp	Trp	Phe	Ala	Gly	Ala	Ser	Met	Val	Ser	Trp	Leu	Asn	Gln	His				

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

Lys Pro Val Glu Ile His Met Gly
450 455

<210> 13

<211> 477

<212> PRT

5 <213> *Phytophthora megasperma* (n.º de registro de GenBank CADS3323)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> delta-5 desaturasa

<400> 13

Met Ala Pro Ile Glu Thr Val Lys Asp Ala Asn Glu Gly Leu His Gln
1 5 10 15

Arg Lys Gly Ala Ala Ala Ala Ser Lys Asp Thr Thr Thr Phe Thr Trp
20 25 30

Gln Asp Val Ala Lys His Asn Thr Ala Lys Ser Ala Trp Val Thr Ile
35 40 45

Arg Gly Val Val Tyr Asp Val Thr Glu Trp Ala Asp Arg His Pro Gly
50 55 60

Gly Arg Glu Leu Val Leu Leu His Ser Gly Arg Glu Cys Thr Asp Thr
65 70 75 80

Phe Asp Ser Tyr His Pro Phe Ser Asp Arg Ala Asp Lys Ile Leu Ala
85 90 95

Lys Tyr Ala Ile Gly Lys Leu Val Gly Gly Ser Glu Phe Pro Thr Tyr
100 105 110

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

Tyr Phe Lys Asp Asn Lys Leu Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Ser Gly Leu
130 135 140

Trp Arg Met Ile Leu Val Ala Ile Val Gly Ala Val Ala Tyr Met Gly
145 150 155 160

Met Asn Gln Leu Leu Pro Gly Asn Ile Tyr Ala His Tyr Ala Trp Gly
165 170 175

Ala Leu Phe Gly Val Cys Gln Ala Leu Pro Leu Leu His Val Met His
180 185 190

Asp Ala Ser His Ala Ala Ile Thr Ser Ser Pro Thr Gly Trp Arg Leu
195 200 205

Ile Gly Arg Leu Ala Met Asp Trp Val Ala Gly Ala Asn Met Val Ser
210 215 220

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

Gly Ala Asp Pro Asp Leu Pro Val Asp Phe Lys Ser Asp Val Arg Arg
245 250 255

Ile Val Tyr Arg Gln Val Leu Leu Pro Ile Tyr Lys Tyr Gln His Leu
260 265 270

Tyr Leu Pro Pro Leu Tyr Gly Val Leu Gly Leu Lys Phe Arg Val Gln
275 280 285

Asp Val Phe Glu Thr Phe Val Thr Leu Thr Asn Gly Pro Leu Arg Val
290 295 300

Asn Pro Leu Ser Val Gly Asp Trp Ala Glu Met Ile Leu Ser Lys Ala
305 310 315 320

Phe Trp Val Phe Tyr Arg Ile Tyr Leu Pro Leu Ala Val Leu Gln Val
325 330 335

Asp Pro Ala Arg Phe Trp Gly Val Phe Phe Leu Ala Glu Phe Ser Thr
340 345 350

Gly Trp Tyr Leu Ala Phe Asn Phe Gln Val Ser His Val Ser Thr Ala
355 360 365

Cys Glu Tyr Pro Gly Gly Asp Glu Glu Val Thr Ser Ile Asp Asp Glu
370 375 380

Trp Ala Ile Ser Gln Val Lys Ser Ser Val Asp Tyr Gly His Gly Ser
385 390 395 400

Phe Ile Thr Thr Phe Leu Thr Gly Ala Leu Asn Tyr Gln Val Thr His
405 410 415

His Leu Phe Pro Gly Val Ser Gln Tyr His Tyr Pro Ala Ile Ala Pro
420 425 430

Leu Ile Leu Asp Val Cys His Lys Tyr Lys Val Lys Tyr Asn Val Leu
435 440 445

Pro Asp Phe Thr Ala Ala Met Ala Gly His Phe Asp His Leu Val Ile
450 455 460

Met Gly Lys Met Gly Lys Arg Val Thr Ile His Met Gly
465 470 475

<210> 14

<211> 469

<212> PRT

5 <213> *Phaeodactylum tricornutum* (n.º de registro de GenBank AAL92562)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> delta-5 desaturasa

<400> 14

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
1 5 10 15

Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
20 25 30

Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
35 40 45

Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe
50 55 60

Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His
65 70 75 80

Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp
85 90 95

Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys
100 105 110

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

Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu

10

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

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

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala
465

<210> 15

<211> 467

<212> PRT

5 <213> *Dictyostelium discoideum* (n.º de registro de GenBank XP_640331)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> delta-5 desaturasa

<400> 15

Met Met Glu Thr Asn Asn Glu Asn Lys Glu Lys Leu Lys Leu Tyr Thr
1 5 10 15

Trp Asp Glu Val Ser Lys His Asn Gln Lys Asn Asp Leu Trp Ile Ile
20 25 30

Val Asp Gly Lys Val Tyr Asn Ile Thr Lys Trp Val Pro Leu His Pro
35 40 45

Gly Gly Glu Asp Ile Leu Leu Leu Ser Ala Gly Arg Asp Ala Thr Asn
50 55 60

Leu Phe Glu Ser Tyr His Pro Met Thr Asp Lys His Tyr Ser Leu Ile
65 70 75 80

Lys Gln Tyr Glu Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Glu His Pro Lys Tyr
85 90 95

Val Glu Lys Ser Glu Phe Tyr Ser Thr Leu Lys Gln Arg Val Arg Lys
100 105 110

His Phe Gln Thr Ser Ser Gln Asp Pro Lys Val Ser Val Gly Val Phe
115 120 125

Thr Arg Met Val Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Phe Val Thr Tyr Tyr Leu
130 135 140

Ser Gln Phe Ser Thr Asp Arg Phe Trp Leu Asn Cys Ile Phe Ala Val
145 150 155 160

Leu Tyr Gly Val Ala Asn Ser Leu Phe Gly Leu His Thr Met His Asp
165 170 175

Ala Cys His Thr Ala Ile Thr His Asn Pro Met Thr Trp Lys Ile Leu
180 185 190

Gly Ala Thr Phe Asp Leu Phe Ala Gly Ala Ser Phe Tyr Ala Trp Cys
195 200 205

His Gln His Val Ile Gly His His Leu Tyr Thr Asn Val Arg Asn Ala
210 215 220

Asp Pro Asp Leu Gly Gln Gly Glu Ile Asp Phe Arg Val Val Thr Pro
225 230 235 240

Tyr Gln Ala Arg Ser Trp Tyr His Lys Tyr Gln His Ile Tyr Ala Pro
245 250 255

Ile Leu Tyr Gly Val Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Ile Gln Asp His Glu
260 265 270

Ile Phe Thr Lys Lys Ser Asn Gly Ala Ile Arg Tyr Ser Pro Ile Ser
275 280 285

Thr Ile Asp Thr Ala Ile Phe Ile Leu Gly Lys Leu Val Phe Ile Ile
290 295 300

Ser Arg Phe Ile Leu Pro Leu Ile Tyr Asn His Ser Phe Ser His Leu
305 310 315 320

Ile Cys Phe Phe Leu Ile Ser Glu Leu Val Leu Gly Trp Tyr Leu Ala
325 330 335

Ile Ser Phe Gln Val Ser His Val Val Glu Asp Leu Gln Phe Met Ala
340 345 350

Thr Pro Glu Ile Phe Asp Gly Ala Asp His Pro Leu Pro Thr Thr Phe
355 360 365

Asn Gln Asp Trp Ala Ile Leu Gln Val Lys Thr Thr Gln Asp Tyr Ala
370 375 380

Gln Asp Ser Val Leu Ser Thr Phe Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu Gln
385 390 395 400

Val Ile His His Cys Phe Pro Thr Ile Ala Gln Asp Tyr Tyr Pro Gln
405 410 415

Ile Val Pro Ile Leu Lys Glu Val Cys Lys Glu Tyr Asn Val Thr Tyr
420 425 430

His Tyr Lys Pro Thr Phe Thr Glu Ala Ile Lys Ser His Ile Asn Tyr
435 440 445

Leu Tyr Lys Met Gly Asn Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Pro Val Asn
450 455 460

Lys Asn Asp
465

<210> 16

<211> 421

<212> PRT

5 <213> *Euglena gracilis*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> delta-8 desaturasa

<300>

10 <302> DELTA-8 DESATURASA Y SU USO PARA FABRICAR ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

<310> documento WO2006012325

<311> 24-06-2005

<312> 02-02-2006

<313> (1) .. (421)

15 <300>

<302> DELTA-8 DESATURASA Y SU USO PARA FABRICAR ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

<310> documento WO2006012326

<311> 24-06-2005

<312> 02-02-2006

20 <313> (1) .. (421)

<400> 16

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

Cys Phe Gln Ser Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp Asn
245 250 255

Gln Phe Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala Leu
260 265 270

His Trp Thr Leu Lys Thr Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile
275 280 285

Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe
290 295 300

Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Gly Asp Ser Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His
325 330 335

Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly
340 345 350

Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg
355 360 365

His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys
370 375 380

His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile
385 390 395 400

Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro
405 410 415

Ala Gly Lys Ala Leu
420

<210> 17

<211> 1269

<212> ADN

5 <213> *Pavlova lutheri*

<220>

<221> característica_misc

<223> delta-8 desaturasa

<400> 17

```

atgggcaagg gtggagacgg cggcgcgag gcggtgagcg ggaccgacgc gtctctcgct    60
gaggtgagct ccgtcgatag caagagcgtg cagctcgtgc tctacggcaa gcgcgtggat    120
gtcacaaagt tccagaaggc acaccggggc gggagcaagg tgttccgcat cttccaggag    180
cgcgacgcga cggagcagtt cgagtcttac cactcgccca aggccatcaa gatgatggag    240
ggcatgctca agaagtcgga ggatgcgccc gcttccgtgc cctgcccctc gcggtccacc    300
atgggacacg agttcaagga gatgattgag cgccacaaga gggctggtct ctacgacctt    360
tgcccgttgg acgagctggt caagctcacc atcgctcctg cgcccatctt cgtgggcgcc    420
tatctcgtgc ggagcggcgt ctgccccctc gcgggcgcgc tctccatggg ctttggttc    480
tacctcgacg gctggcttgc tcacgactac ctgcatcacg cagtcttcaa gggctcggtc    540
aacacgctcg tcaaggcgaa caacgccatg ggatacgcgc tcggcttcct ccagggttac    600
gacgtggcct ggtggcgcg cgcgcataac acgcaccacg tgtgcaccaa cgaggatggt    660
tcggaccggg acatcaagac ggcgcccctg ctcatctacg tgcgagagaa cccgtccatt    720
gccaagcggc tcaacttctt ccagcgtggt cagcagtact actatgtgcc gaccatggcc    780
atcctcgacc tctactggcg cctggagtcc atcgcgtagc tggctgtgcg cctgcctaag    840
atgtggatgc aggccgcgc tcttgccgct cactacgcgc tctgtgctg ggtcttcgca    900
gcgcatctca acctcatccc tctcatgatg gttgcacgcg gcttcgcgac gggcatcggt    960
gtctttgcaa cccactatgg tgaggacatc ctcgaccgcg agcacgtcga gggcatgacg   1020
ctcgtcgagc agaccgcaa gacctccggt aacatcacgg gcggctggct agtgaacgtg   1080
ctcaggggct tcatctccct gcagaccgag catcacctct tccccatgat gccaccggc   1140
aacctaata ga ctatccagcc cgaggtagc gacttcttca agaagcatgg cctcgagtac   1200
cgcgagggca acctcttcca gtgcgtgcac cagaacatca aggtctcgc cttcgagcac   1260
ctcctccac                                     1269

```

<210> 18

<211> 423

<212> PRT

5 <213> *Pavlova lutheri*

<400> 18

```

Met Gly Lys Gly Gly Asp Gly Gly Ala Gln Ala Val Ser Gly Thr Asp
1           5           10           15

```

```

Ala Ser Leu Ala Glu Val Ser Ser Val Asp Ser Lys Ser Val His Val
20           25           30

```

```

Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe Gln Lys Ala His

```

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

Ala Ala His Tyr Ala Leu Leu Cys Trp Val Phe Ala Ala His Leu Asn
 290 295 300

Leu Ile Pro Leu Met Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Thr Gly Ile Val
 305 310 315 320

Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu Asp Arg Glu His Val
 325 330 335

Glu Gly Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Lys Thr Ser Arg Asn Ile
 340 345 350

Thr Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly Phe Ile Ser Leu Gln
 355 360 365

Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr Gly Asn Leu Met Thr
 370 375 380

Ile Gln Pro Glu Val Arg Asp Phe Phe Lys Lys His Gly Leu Glu Tyr
 385 390 395 400

Arg Glu Gly Asn Leu Phe Gln Cys Val His Gln Asn Ile Lys Ala Leu
 405 410 415

Ala Phe Glu His Leu Leu His
 420

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región conservada n.º 1 dentro de delta-5 y delta-8 desaturasas

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (4) .. (4)

<223> X = Ile o Val

<400> 19

Gly His His Xaa Tyr Thr Asn
 1 5

<210> 20

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región conservada n.º 2 dentro de delta-5 y delta-8 desaturasas

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (2) .. (2)

<223> X = Y o F

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4) .. (4)
 <223> X = Val o Ile

5 <400> 20

Asn Xaa Gln Xaa Glu His His
 1 5

<210> 21
 <211> 476
 <212> PRT

10 <213> *Thalassiosira pseudonana* (n.º de registro de GenBank AAX14502)

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> delta-8 desaturasa

<400> 21

Met Pro Pro Asn Ala Asp Ile Ser Arg Ile Arg Asn Arg Ile Pro Thr
 1 5 10 15

Lys Thr Gly Thr Val Ala Ser Ala Asp Asn Asn Asp Pro Ala Thr Gln
 20 25 30

Ser Val Arg Thr Leu Lys Ser Leu Lys Gly Asn Glu Val Val Ile Asn
 35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Asp Ile Ala Asp Phe Val His Pro Gly Gly Glu Val
 50 55 60

Val Lys Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Ile Gln Tyr Asn Met Ile
 65 70 75 80

His Pro Tyr His Thr Gly Lys His Leu Glu Lys Met Lys Ala Val Gly
 85 90 95

Lys Val Val Asp Trp Gln Ser Asp Tyr Lys Phe Asp Thr Pro Phe Glu
 100 105 110

15

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

Leu Ser Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Ile Asn Ser Asp Arg
355 360 365

Asp Pro Thr Ala Asp Phe Lys Lys Thr Gly Glu Gln Val Cys Trp Phe
370 375 380

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

Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro
405 410 415

Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Thr Val Arg Glu
420 425 430

Val Cys Lys Lys His Gly Met Ser Tyr Ala Tyr Tyr Pro Trp Ile Gly
435 440 445

Gln Asn Leu Val Ser Thr Phe Lys Tyr Met His Arg Ala Gly Ser Gly
450 455 460

Ala Asn Trp Glu Leu Lys Pro Leu Ser Gly Ser Ala
465 470 475

<210> 22

<211> 8165

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pZUF17

<400> 22

gtacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca	60
ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat	120
taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc	180
tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca	240
aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca	300
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg	360
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaaccgc	420
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt	480
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggggaag cgtggcgctt	540
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc	600

tgtgtgcacg aaccccccg	tcagcccgac cgctgcgcct	tatccggtaa ctatcgtctt	660
gagccaacc cggtaaagaca	cgacttatcg ccactggcag	cagccactgg taacaggatt	720
agcagagcga ggtatgtagg	cggtgctaca gagttcttga	agtgggtggc taactacggc	780
tacactagaa ggacagtatt	tggtatctgc gctctgctga	agccagttac cttcggaaaa	840
agagttggta gctcttgatc	cggcaaacaa accaccgctg	gtagcgggtg tttttttgtt	900
tgcaagcagc agattacgcg	cagaaaaaaa ggatctcaag	aagatccttt gatcttttct	960
acgggggtctg acgctcagtg	gaacgaaaac tcacgttaag	ggatttttgt catgagatta	1020
tcaaaaagga tcttcacctt	gatcctttta aattaaaaat	gaagttttaa atcaatctaa	1080
agtatatatg agtaaacttg	gtctgacagt taccaatgct	taatcagtga ggcacctatc	1140
tcagcgatct gtctatttct	ttcatccata gttgcctgac	tccccgtcgt gtagataact	1200
acgatacggg agggcttacc	atctggcccc agtgctgcaa	tgataccgcg agacccacgc	1260
tcaccggctc cagattttatc	agcaataaac cagccagccg	gaagggccga gcgcagaagt	1320
ggctcctgcaa ctttatccgc	ctccatccag tctattaatt	gttgccggga agctagagta	1380
agtagttcgc cagttaatag	tttgcgcaac gttgttgcca	ttgctacagg catcgtgggtg	1440
tcacgctcgt cgtttggtat	ggcttcattc agctccggtt	cccaacgata aaggcgagtt	1500
acatgatccc ccattgtgtg	caaaaaagcg gttagctcct	tcggctcctc gatcgttgctc	1560
agaagtaagt tggccgcagt	gttatcactc atggttatgg	cagcactgca taattctctt	1620
actgtcatgc catccgtaag	atgcttttct gtgactgggtg	agtactcaac caagtcattc	1680
tgagaatagt gtatgcggcg	accgagttgc tcttgcccgg	cgtcaatacg ggataatacc	1740
gcgccacata gcagaacttt	aaaagtgtc atcattggaa	aacgttcttc ggggcgaaaa	1800
ctctcaagga tcttaccgct	gttgagatcc agttcgatgt	aaccactcgt tgcacccaac	1860
tgatcttcag catcttttac	tttcaccagc gtttctgggt	gagcaaaaac aggaaggcaa	1920
aatgccgcaa aaaaggggaat	aagggcgaca cggaaatgtt	gaatactcat actcttcctt	1980
tttcaatatt attgaagcat	ttatcagggt tattgtctca	tgagcggata catatttgaa	2040
tgtattttaga aaaataaaca	aataggggtt ccgcgcacat	ttccccgaaa agtgccacct	2100
gacgcgcctt gtagcggcgc	attaagcgcg gcgggtgtgg	tggttacgcg cagcgtgacc	2160
gctacacttg ccagcgcctt	agcgcgcgct cctttcgctt	tcttcccttc ctttctcgcc	2220
acgttcgcgc gctttccccg	tcaagctcta aatcgggggc	tccctttagg gttccgattt	2280
agtgccttac ggcacctcga	ccccaaaaaa cttgattagg	gtgatggttc acgtagtggg	2340
ccatcgccct gatagacggt	ttttcgccct ttgacgttgg	agtccacgtt ctttaatagt	2400
ggactcttgt tccaaactgg	aacaacactc aaccctatct	cggtctattc ttttgattta	2460

taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt	2520
aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttcca ttcgccattc aggctgcgca	2580
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg	2640
gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta	2700
aaacgacggc cagtgaattg taatacgact cactataggg cgaattgggt accgggcccc	2760
ccctcgaggt cgatggtgtc gataagcttg atatcgaatt catgtcacac aaaccgatbt	2820
tcgcctcaag gaaacctaat tctacatccg agagactgcc gagatccagt ctacactgat	2880
taattttcgg gccaaataatt taaaaaaatc gtgttatata atattatatg tattatatat	2940
atacatcatg atgatactga cagtcattgt ccattgctaa atagacagac tccatctgcc	3000
gcctccaact gatgtttctca atatttaagg ggtcatctcg cattgtttta taataaacag	3060
actccatcta ccgcctccaa atgatgttct caaaatatat tgtatgaact tatttttatt	3120
acttagtatt attagacaac ttacttgctt tatgaaaaac acttcctatt taggaaacaa	3180
tttataatgg cagttcgctt atttaacaat ttatgtagaa taaatgttat aaatgcgtat	3240
gggaaatctt aaatatggat agcataaatg atatctgcat tgcctaattc gaaatcaaca	3300
gcaacgaaaa aaatcccttg tacaacataa atagtcatcg agaaatatca actatcaaag	3360
aacagctatt cacacgttac tattgagatt attattggac gagaatcaca cactcaactg	3420
tctttctctc ttctagaaat acaggtaaa gtatgtacta ttctcattgt tcatacttct	3480
agtcatttca tcccacatat tccttggatt tctctccaat gaatgacatt ctatcttgca	3540
aattcaacaa ttataataag atataccaaa gtagcgggat agtggcaatc aaaaagcttc	3600
tctggtgtgc ttctcgctatt tatttttatt ctaatgatcc attaaaggta tatatttatt	3660
tcttgttata taatcctttt gtttattaca tgggctggat acataaagggt attttgattt	3720
aattttttgc ttaaattcaa tccccctcg ttcagtgtca actgtaatgg taggaaatta	3780
ccatactttt gaagaagcaa aaaaaatgaa agaaaaaaaa aatcgtattt ccaggttaga	3840
cgttccgcag aatctagaat gcggtatgcg gtacattggt cttcgaacgt aaaagttgcg	3900
ctccctgaga tattgtacat ttttgctttt acaagtacaa gtacatcgta caactatgta	3960
ctactgttga tgcattccaca acagtttggt ttgttttttt ttgttttttt tttttcta	4020
gattcattac cgctatgtat acctacttgt acttgtagta agccgggtta ttggcggtca	4080
attaatcata gacttatgaa tctgcacggg gtgcgctgcg agttactttt agcttatgca	4140
tgtactttgg gtgtaatat gggatctggt cggaaatcaa cggatgctca atcgatttcg	4200
acagtaatta attaagtcac acacaagtca gctttcttcg agcctcatat aagtataagt	4260

agttcaacgt	attagcactg	tacccagcat	ctccgtatcg	agaaacacaa	caacatgccc	4320
cattggacag	atcatgcgga	tacacagggt	gtgcagtatc	atacatactc	gatcagacag	4380
gtcgtctgac	catcatacaa	gctgaacaag	cgctccatac	ttgcacgctc	tctatatata	4440
cagttaaatt	acatatccat	agtctaacct	ctaacagtta	atcttctggt	aagcctccca	4500
gccagccttc	tggatatcgct	tggcctcctc	aataggatct	cggttctggc	cgtacagacc	4560
tcggccgaca	attatgatat	ccgttcgggt	agacatgaca	tcctcaacag	ttcgggtactg	4620
ctgtccgaga	gcgtctccct	tgtcgtcaag	acccaccccg	ggggtcagaa	taagccagtc	4680
ctcagagtcg	cccttaggtc	ggttctgggc	aatgaagcca	accacaaact	cggggtcgga	4740
tcgggcaagc	tcaatgggtct	gcttgaggta	ctcgccagtg	gccagagagc	ccttgcaaga	4800
cagctcggcc	agcatgagca	gacctctggc	cagcttctcg	ttgggagagg	ggactaggaa	4860
ctccttgtag	tgggagttct	cgtagtcaga	gacgtcctcc	ttcttctggt	cagagacagt	4920
ttcctcggca	ccagctcgca	ggccagcaat	gattccgggt	ccgggtacac	cgtgggcgtt	4980
ggtgatatcg	gaccactcgg	cgattcgggt	acaccgggtac	tgggtgcttga	cagtgttgcc	5040
aatatctgcg	aactttctgt	cctcgaacag	gaagaaaccg	tgcttaagag	caagttcctt	5100
gaggggggagc	acagtgccgg	cgtaggtgaa	gtcgtcaatg	atgtcgatat	gggttttgat	5160
catgcacaca	taagggtccga	ccttatcggc	aagctcaatg	agctccttgg	tgggtggtaac	5220
atccagagaa	gcacacaggt	tggttttctt	ggctgccacg	agcttgagca	ctcgagcggc	5280
aaaggcggac	ttgtggacgt	tagctcgagc	ttcgtaggag	ggcatttttg	tgggtgaagag	5340
gagactgaaa	taaatttagt	ctgcagaact	ttttatcgga	accttatctg	gggcagtgaa	5400
gtatatgtta	tggtaatagt	tacgagttag	ttgaacttat	agatagactg	gactatacgg	5460
ctatcgggtcc	aaattagaaa	gaacgtcaat	ggtctcttgg	gcgtcgccct	tgccgacaaa	5520
aatgtgatca	tgatgaaagc	cagcaatgac	gttgacagctg	atattgttgt	cggccaaccg	5580
cgccgaaaac	gcagctgtca	gaccacagc	ctccaacgaa	gaatgtatcg	tcaaagtgat	5640
ccaagcacac	tcatagttgg	agtcgtactc	caaaggcggc	aatgacgagt	cagacagata	5700
ctcgtcgact	caggcgacga	cggaattcct	gcagcccatc	tcgagaattc	aggagagacc	5760
gggttgggcg	cgtatttgtg	tccccaaaaa	cagccccaat	tgccccggag	aagacggcca	5820
ggccgcctag	atgacaaatt	caacaactca	cagctgactt	tctgccattg	ccactagggg	5880
ggggcctttt	tatatggcca	agccaagctc	tccacgtcgg	ttgggctgca	cccaacaata	5940
aatgggtagg	gttgacacaa	caaagggatg	ggatgggggg	tagaagatac	gaggataacg	6000
gggctcaatg	gcacaaataa	gaacgaatac	tgccattaag	actcgtgate	cagcgactga	6060
caccattgca	tcattctaagg	gcctcaaaaac	tacctcgga	ctgctgcgct	gatctggaca	6120

ccacagaggt	tccgagcact	ttagggtgca	ccaaatgtcc	caccaggtgc	aggcagaaaa	6180
cgctggaaca	gcgtgtacag	tttgtcttaa	caaaaagtga	ggcgctgag	gtcgagcagg	6240
gtggtgtgac	ttgttatagc	ctttagagct	gcgaaagcgc	gtatggattt	ggctcatcag	6300
gccagattga	gggtctgtgg	acacatgtca	tgttagtgt	cttcaatcgc	cccctggata	6360
tagccccgac	aataggccgt	ggcctcattt	ttttgccttc	cgcacatttc	cattgctcgg	6420
taccacacac	ttgcttctcc	tgcacttgcc	aaccttaata	ctggtttaca	ttgaccaaca	6480
tcttacaagc	ggggggcttg	tctagggtat	atataaacag	tggctctccc	aatcggttgc	6540
cagtctcttt	tttcctttct	ttccccacag	attcgaaatc	taaactacac	atcacacaat	6600
gcctgttact	gacgtcctta	agcgaaagtc	cggtgtcatc	gtcggcgacg	atgtccgagc	6660
cgtgagtatc	cacgacaaga	tcagtgtcga	gacgacgcgt	tttgtgtaat	gacacaatcc	6720
gaaagtcgct	agcaacacac	actctctaca	caaactaacc	cagctctcca	tggctgagga	6780
taagaccaag	gtcgagtccc	ctaccctgac	tgagctgaag	cactctatcc	ctaacgcttg	6840
ctttgagtcc	aacctcggac	tctcgtctta	ctacactgcc	cgagcgatct	tcaacgcac	6900
tgcctctgct	gctctgctct	acgtgccccg	atctactccc	ttcattgccg	ataacgttct	6960
gctccacgct	ctggtttgcg	ccacctacat	ctacgtgcag	ggtgtcatct	tctggggttt	7020
ctttaccgtc	ggtcacgact	gtggtcactc	tgccttctcc	cgataccact	ccgtcaactt	7080
catcattggc	tgcattcatg	actctgccat	tctgaactcc	ttcgagtcct	ggcgagtgc	7140
ccaccgacac	catcacaaga	acactggcaa	cattgataag	gacgagatct	tctaccctca	7200
tcggtccgtc	aaggacctcc	aggacgtgcg	acaatgggtc	tacaccctcg	gaggtgcttg	7260
gtttgtctac	ctgaaggctg	gatatgctcc	tccaaccatg	tcccactttg	acccctggga	7320
ccctctctctg	cttcgacgag	cctccgctgt	catcgtgtcc	ctcggagtct	gggtgcctt	7380
cttcgctgcc	tacgcctacc	tcacatactc	gctcggcttt	gccgtcatgg	gcctctacta	7440
ctatgctcct	ctctttgtct	ttgcttcgtt	cctcgtcatt	actaccttct	tgcattcaca	7500
cgacgaaget	actccctggg	acggtgactc	ggagtggacc	tacgtcaagg	gcaacctgag	7560
ctccgtcgac	cgatcgtag	gagctttcgt	ggacaacctg	tctcaccaca	ttggcaccca	7620
ccaggtccat	cacttggtcc	ctatcattcc	ccactacaag	ctcaacgaag	ccaccaagca	7680
ctttgctgcc	gcttaccctc	acctcgtgag	acgtaacgac	gagcccatca	ttactgcctt	7740
cttcaagacc	gctcacctct	ttgtcaacta	cggagctgtg	cccagagactg	ctcagatttt	7800
cacctcaaaa	gagtctgccg	ctgcagccaa	ggccaagagc	gactaagcgg	ccgcaagtgt	7860
ggatggggaa	gtgagtgcgc	ggttctgtgt	gcacaattgg	caatccaaga	tggatggatt	7920

caacacaggg atatagcag ctacgtggtg gtgcgaggat atagcaacgg atatttatgt 7980
 ttgacacttg agaatgtacg atacaagcac tgtccaagta caatactaaa catactgtac 8040
 atactcatac tcgtacccgg gcaacggttt cacttgagtg cagtggctag tgctcttact 8100
 cgtacagtgt gcaatactgc gtatcatagt ctttgatgta tatcgtattc attcatgtta 8160
 gttgc 8165

<210> 23

<211> 8438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pDMW367

<400> 23

catggctctc agtcttacca cagaacagct gttagaacgc cctgatttgg ttgcgattga 60
 tggcactctc tacgaccttg aagggttgc caaagttcat ccaggaggag atttgattct 120
 cgcttctggt gcctctgatg cctccctctc cttttattca atgcatccat acgtcaaacc 180
 ggagaattcc aaattgcttc aacagttcgt ccgaggggaag catgaccgca cctcgaagga 240
 cattgtctac acgtatgatt ctcccttcgc acaagacggt aagcggacaa tgcgcgaggt 300
 gatgaaaggg aggaactggt acgcaacccc tggcttctggt ctgcgaccg ttgggatcat 360
 cgccgtgacg gccttttgcg agtggcactg ggctaccacg gggatggtgc tgtggggcct 420
 gttgactgga ttcattgcaca tgcagatcgg ctatccatc cagcatgatg cgtcccacgg 480
 ggccatcagc aagaagcctt gggtaacgc cctcttcgcc tacggcattg acgtcatcgg 540
 atcgtcccgg tggatttggc tgcagtcgca catcatcggg caccacacct acaccaacca 600
 gcacggcctc gacctggatg cggagtcggc agagccggtc ctggtgttcc acaactaccc 660
 cgccgcaaac accgcccga agtggttcca ccgcttccaa gcttggtaca tgtaccttgt 720
 gctgggggca tacggggtat cgctggtgta caaccgcctc tacattttcc ggatgcagca 780
 caatgacacc atcccagagt ctgtcacggc catgcgggaa aatggctttc tgcggcgcta 840
 ccgcacaett gcattcgtga tgcgagcttt ctcatcttc cggaccgcat tcttgccctg 900
 gtacctcact gggacctcat tgctgatcac cattcctctg gtgcccaccg caactggtgc 960
 cttcttgacg ttcttcttca ttttgtecca caattttgat ggctccgaac ggatccccga 1020
 caagaactgc aagggttaaga gatctgagaa ggacgttgag gctgaccaa ttgactggta 1080
 tcgggcgag gtggagacgt cctccacata cgggtggccc atcgccatgt tcttcaactg 1140
 cgggtctcaat ttccagatcg agcaccacct ctttccccgg atgtcgtctt ggcactaccc 1200
 cttcgtccag caggcggctc gggagtgttg cgaacgccat ggagtgcgat atgttttcta 1260

ccctaccatc gtcggcaaca tcctctccac cctgaagtac atgcataagg tgggtgtcgt	1320
ccactgcgtg aaggacgcac aggattccta agcggccgca agtgtggatg gggaagtgag	1380
tgcccggttc tgtgtgcaca attggcaatc caagatggat ggattcaaca cagggatata	1440
gcgagctacg tgggtggtgcg aggatatagc aacggatatt tatgtttgac acttgagaat	1500
gtacgatata agcactgtcc aagtacaata ctaaacatac tgtacatact catactcgta	1560
cccgggcaac ggtttcactt gagtgcagtg gctagtgtct ttactcgta agtgtgcaat	1620
actgcgtatc atagtctttg atgtatatcg tattcattca tgttagttgc gtacgagccg	1680
gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgccct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt	1740
tgcgctcaact gcccgttttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg	1800
gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgtct ttcgcttcc tcgctcactg	1860
actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa	1920
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc	1980
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc	2040
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat	2100
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc	2160
cgtttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct	2220
cacgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg	2280
aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc	2340
cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga	2400
ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa	2460
ggacagtatt tggatatctg gctctgtga agccagttac cttcggaaaa agagttggta	2520
gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtggt tttttttgtt tgcaagcagc	2580
agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg	2640
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga	2700
tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg	2760
agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct	2820
gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg	2880
agggttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc	2940
cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa	3000
ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc	3060

cagttaatag	tttgcgcaac	gttggttgcca	ttgctacagg	catcgtggtg	tcacgctcgt	3120
cgtttggtat	ggcttcattc	agctccgggt	cccaacgata	aaggcgaggt	acatgatccc	3180
ccatgttggtg	caaaaaagcg	gttagctcct	tcggctcctcc	gacggttggtc	agaagtaagt	3240
tggccgcagt	gttatcactc	atgggttatgg	cagcactgca	taattctctt	actgtcatgc	3300
catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggtg	agtactcaac	caagtcattc	tgagaatagt	3360
gtatgcggcg	accgagttgc	tcttgcccgg	cgtcaatacg	ggataatacc	gcgccacata	3420
gcagaacttt	aaaagtgtc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	3480
tcttaccgct	gttgagatcc	agttcgatgt	aaccactcgc	tgcacccaac	tgatcttcag	3540
catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaac	aggaaggcaa	aatgccgcaa	3600
aaaagggaat	aaggcgacac	cggaaatgtt	gaatactcat	actcttctct	tttcaatatt	3660
attgaagcat	ttatcagggg	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	tgtatttaga	3720
aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccacct	gacgcgcctt	3780
gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	gctacacttg	3840
ccagcgcctt	agcgcctcgt	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgccc	3900
gctttccccg	tcaagctcta	aatcgggggc	tccctttagg	gttcgatttt	agtgttttac	3960
ggcacctcga	ccccaaaaaa	cttgatttagg	gtgatgggtc	acgtagtggg	ccatcgccct	4020
gatagacggg	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacgtt	ctttaatagt	ggactcttgt	4080
tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggctctatt	ttttgattta	taagggattt	4140
tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	aacgcgaatt	4200
ttaacaaaat	attaacgctt	acaatttcca	ttcgccattc	aggctgcgca	actgttgggg	4260
agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaagggg	gatgtgctgc	4320
aaggcgatta	agttgggtaa	cgccagggtt	ttcccagtcg	cgacgttgta	aaacgacggc	4380
cagtgaattg	taatacgact	cactataggg	cgaattgggt	accgggcccc	ccctcgaggt	4440
cgatggtgtc	gataagcttg	atatcgaatt	catgtcacac	aaaccgatct	tcgcctcaag	4500
gaaacctaata	tctacatccg	agagactgcc	gagatccagt	ctacactgat	taattttcgg	4560
gccataaatt	taaaaaaatc	gtgttatata	atattatatg	tattatatat	atacatcatg	4620
atgatactga	cagtcatgtc	ccattgctaa	atagacagac	tccatctgcc	gcctccaact	4680
gatgttctca	atatttaagg	ggcatctctg	cattgtttta	taataaacag	actccatcta	4740
ccgcctccaa	atgatgttct	caaaatatat	tgtatgaact	tatttttatt	acttagtatt	4800
attagacaac	ttacttgctt	tatgaaaaac	acttctctatt	taggaaacaa	tttataatgg	4860
cagttcggtc	atttaacaat	ttatgtagaa	taaagtgtat	aaatgcgtat	gggaaatctt	4920

aaatatggat	agcataaatg	atatctgcat	tgccataattc	gaaatcaaca	gcaacgaaaa	4980
aaatcccttg	tacaacataa	atagtcacg	agaaatatca	actatcaaag	aacagctatt	5040
cacacgttac	tattgagatt	attattggac	gagaatcaca	cactcaactg	tctttctctc	5100
ttctagaaat	acaggtacaa	gtatgtacta	ttctcattgt	tcatacttct	agtcatttca	5160
tcccacatat	tccttggatt	tctctccaat	gaatgacatt	ctatcttgca	aattcaacaa	5220
ttataataag	atataccaaa	gtagcggat	agtggcaatc	aaaaagcttc	tctggtgtgc	5280
ttctcgtatt	tatttttatt	ctaattgatcc	attaaaggta	tatatattatt	tcttggtata	5340
taatcctttt	gtttattaca	tgggctggat	acataaagggt	attttgattt	aattttttgc	5400
ttaaattcaa	tccccctcg	ttcagtgta	actgtaatgg	taggaaatta	ccatactttt	5460
gaagaagcaa	aaaaaatgaa	agaaaaaaa	aatcgtattt	ccagggtaga	cgttccgcag	5520
aatctagaat	gcggtatgcg	gtacattgtt	cttcgaacgt	aaaagttgcg	ctccctgaga	5580
tattgtacat	ttttgctttt	acaagtacaa	gtacatcgta	caactatgta	ctactgttga	5640
tgcacccaca	acagtttggt	ttgttttttt	ttgttttttt	tttttcta	gattcattac	5700
cgctatgtat	acctacttgt	acttgtagta	agccgggtta	ttggcggtca	attaatcata	5760
gacttatgaa	tctgcacggt	gtgcgctgcg	agttactttt	agcttatgca	tgctacttgg	5820
gtgtaatat	gggatctggt	cggaatcaa	cggatgctca	atcgatttcg	acagtaatta	5880
attaagtcac	acacaagtca	gctttcttcg	agcctcatat	aagtataagt	agttcaacgt	5940
attagcactg	taccagcat	ctccgtatcg	agaaacacaa	caacatgccc	cattggacag	6000
atcatgcgga	tacacaggtt	gtgcagtatc	atacatactc	gatcagacag	gtcgtctgac	6060
catcatacaa	gctgaacaag	cgctccatac	ttgcacgctc	tctatataca	cagttaaatt	6120
acatatccat	agtctaacct	ctaacagtta	atcttctggt	aagcctccca	gccagccttc	6180
tggtatcgct	tggectctc	aataggatct	cggttctggc	cgtacagacc	tcggccgaca	6240
attatgatat	ccgttccggt	agacatgaca	tcctcaacag	ttcgggtactg	ctgtccgaga	6300
gcgtctccct	tgctgtcaag	acccaccccg	gggttcagaa	taagccagtc	ctcagagtcg	6360
cccttaggtc	ggttctgggc	aatgaagcca	accacaaact	cggggtcgga	tcgggcaagc	6420
tcaatggtct	gcttgaggta	ctcgccagtg	gccagagagc	ccttgcaaga	cagctcggcc	6480
agcatgagca	gacctctggc	cagcttctcg	ttgggagagg	ggactaggaa	ctccttgtag	6540
tgggagttct	cgtagtcaga	gacgtcctcc	ttcttctggt	cagagacagt	ttcctcggca	6600
ccagctcgca	ggccagcaat	gattccggtt	ccgggtacac	cgtgggcggt	ggtgatatcg	6660
gaccactcgg	cgattcgggtg	acaccggtag	tggtgcttga	cagtgttgcc	aatatctgcg	6720

aacttttctgt	cctcgaacag	gaagaaaccg	tgcttaagag	caagttcctt	gaggggggagc	6780
acagtgccgg	cgtaggtgaa	gtcgtcaatg	atgtcgatat	gggttttgat	catgcacaca	6840
taaggtccga	ccttatcggc	aagctcaatg	agctccttgg	tggtggtaac	atccagagaa	6900
gcacacaggt	tggttttctt	ggctgccacg	agcttgagca	ctcgagcggc	aaaggcggac	6960
ttgtggacgt	tagctcgagc	ttcgtaggag	ggcatttttg	tggtgaagag	gagactgaaa	7020
taaatttagt	ctgcagaact	ttttatcggg	accttatctg	gggcagtgaa	gtatatgtta	7080
tggtaatagt	tacgagttag	ttgaacttat	agatagactg	gactatacgg	ctatcgggtcc	7140
aaattagaaa	gaacgtcaat	ggctctctgg	gcgtcgcctt	tgccgacaaa	aatgtgatca	7200
tgatgaaagc	cagcaatgac	gttgcagctg	atattgttgt	cggccaaccg	cgccgaaaac	7260
gcagctgtca	gacccacagc	ctccaacgaa	gaatgtatcg	tcaaagtgat	ccaagcacac	7320
tcatagttgg	agtcgtactc	caaaggcggc	aatgacgagt	cagacagata	ctcgtcgact	7380
caggcgacga	cggaattcct	gcagcccatc	tgcagaattc	aggagagacc	gggttggcgg	7440
cgtattttgtg	tcccaaaaaa	cagccccaat	tgccccggag	aagacggcca	ggccgcctag	7500
atgacaaatt	caacaactca	cagctgactt	tctgccattg	ccactagggg	ggggcctttt	7560
tatatggcca	agccaagctc	tccacgtcgg	ttgggctgca	cccaacaata	aatgggtagg	7620
gttgacacaa	caaagggatg	ggatgggggg	tagaagatac	gaggataacg	gggctcaatg	7680
gcacaaataa	gaacgaatac	tgccattaag	actcgtgatc	cagcgactga	caccattgca	7740
tcatctaagg	gcctcaaaac	tacctcggaa	ctgctgcgct	gatctggaca	ccacagaggt	7800
tccgagcact	ttaggttgca	ccaaatgtcc	caccaggtgc	aggcagaaaa	cgctggaaca	7860
gcgtgtacag	tttgtcttaa	caaaaagtga	gggcgctgag	gtcgagcagg	gtgggtgtac	7920
ttgttatagc	ctttagagct	gcgaaagcgc	gtatggattt	ggctcatcag	gccagattga	7980
gggtctgtgg	acacatgtca	tgttagtgtg	cttcaatcgc	cccttgata	tagccccgac	8040
aataggccgt	ggcctcattt	ttttgccttc	cgcacatttc	cattgctcgg	tacccacacc	8100
ttgcttctcc	tgactttgcc	aaccttaata	ctggtttaca	ttgaccaaca	tcttacaagc	8160
ggggggcttg	tctaggggat	atataaacag	tggtctctcc	aatcggttgc	cagtctcttt	8220
tttcctttct	ttccccacag	attcgaaatc	taaactacac	atcacacaat	gcctgttact	8280
gacgtcctta	agcgaaagtc	cggtgtcatc	gtcggcgacg	atgtccgagc	cgtgagtatc	8340
cacgacaaga	tcagtgtcga	gacgacgcgt	tttgtgtaat	gacacaatcc	gaaagtcgct	8400
agcaacacac	actctctaca	caaactaacc	cagctctc			8438

<210> 24

<211> 12649

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKUNF12T6E

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (2507)..(2507)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (2512) .. (2515)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 24

taaccctcac taaagggaac aaaagctgga gctccaccgc ggacacaata tctggtcaaa	60
tttcagtttc gttacataaa tcgttatgtc aaaggagtggt gggagggttaa gagaattatc	120
accggcaaac tatctgttaa ttgctaggta cctctagacg tccaccggg tcgcttggtg	180
gccgaagagg ccggaatctc gggccgcggt ggcggccgct tagttggtct tggacttctt	240
gggcttcttc aggtaggact ggacaaagaa gttgccgaac agagcgagca gggatgatcat	300
gtacacgccg agcagctgga ccagagcctg agggtagtcg caggggaaga ggtagtcgta	360
cagggactgc accagcatag ccatgaactg ggtcatctgc agagtgggtga tgtagggtct	420
gatgggcttg acgaagccga agccctgaga ggaaaagaag tagtaggcgt acatgacggt	480
gtggacgaag gagttgagga tgacggagaa gtaggcgtcg ccaccaggag cgtacttggc	540
aatagcccac cagatggcga agatgggtggc atgggtgtac acgtgcagga agggagacctg	600
gttgaacttc ttgcacagga tcatgatagc ggtgtccagg aactcgtagg ccttgagagc	660
gtagaacacg tagacgattc gggacatgcc ctgagcgtgg gactcgttgc ccttctccat	720
gtcgttgccg aagaccttgt agccaccag gatagcctgt cggatggtct cgacgcacat	780
gtagagggac agtccgaaga ggaacagggt gtggagcagc ttgatggtct tcagctcgaa	840
gggcttctcc atctgcttca tgatgggaat gccgaagagc agcatggcca tgtagccgac	900
ctcgaaggcg agcatggtgg agacgtccat catgggcaga ccgtcgttca gagcgtaggg	960
cttagctccg tccatccact ggtcgacacc ggtctcgact cgtccgacca cgtcgtccca	1020
gacagaggag ttggccatgg tgaatgattc ttatactcag aaggaaatgc ttaacgattt	1080
cgggtgtgag ttgacaagga gagagagaaa agaagaggaa aggtaatctg gggacgggtg	1140
tcttttatac ccttggtctaa agtcccaacc acaaagcaaa aaaattttca gtagtctatt	1200
ttgcgtccgg catgggttac ccggtatggc agacaaagaa actagtacaa agtctgaaca	1260
agcgtagatt ccagactgca gtaccctacg cccttaacgg caagtgtggg aaccggggga	1320

10

gggttgatat gtggggtgaa gggggctctc gccgggggttg ggcccgtac tgggtcaatt 1380
 tgggggtcaat tggggcaatt ggggctgttt tttgggacac aaatacgccg ccaacccggt 1440
 ctctcctgaa ttctgcatcg atcgaggaag aggacaagcg gctgcttctt aagtttgtga 1500
 catcagtatc caaggcacca ttgcaaggat tcaaggcttt gaacccgtca tttgccattc 1560
 gtaacgctgg tagacaggtt gatcggttcc ctacggcttc cacctgtgtc aatcttctca 1620
 agctgcctga ctatcaggac attgatcaac ttcggaagaa acttttgtat gccattcgat 1680
 cacatgctgg ttctgatttg tottagagga acgcatatac agtaatcata gagaataaac 1740
 gatattcatt tattaagta gatagttgag gtagaagttg taaagagtga taaatagcgg 1800
 ccgcgcctac ttaagcaacg ggcttgataa cagcgggggg ggtgcccacg ttgttgccgt 1860
 tgcggaagaa cagaacccc ttaccagcac cctcggcacc agcgtgggc tcaacccact 1920
 ggcacatacg cgcactgagg tacatggcgc ggatgaagcc acgaggacca tctggacat 1980
 cagcccggta gtgcttgccc atgatgggct taatggcctc ggtggcctcg tccgcgttgt 2040
 agaaggggat gctgctgacg tagtgggtga ggacatgagt ctgatgatg ccgtggagaa 2100
 ggtggcggcc gatgaagccc atctcacggt caatggtagc agcggcacca cggacgaagt 2160
 tccactcgtc gttggtgtag tggggaaggg tagggctcgt gtgctggagg aaggtgatgg 2220
 caacgagcca gtggttaacc cagaggtagg gaacaaagta ccagatggcc atgttgtaga 2280
 aaccgaactt ctgaacgagg aagtacagag cagtggccat cagaccgata ccaatatcgc 2340
 tgaggacgat gagcttagcg tcactgttct cgtacagagg gctgcgggga tcgaagtgg 2400
 taacaccacc gccgaggccg ttatgcttgc ccttgccgcg accctcacgc tggcgtcgt 2460
 ggtagttgtg gccggttaaca ttggtgatga ggtagttggg ccagccnacg annnnctcag 2520
 taagatgagc gagctcgtgg gtcattcttc cgagaagagt agectgctgc tcgcgggttc 2580
 ggggaacgaa gaccatgtca cgctccatgt tgccagtggc cttgtggtgc tttcgggtgg 2640
 agatttgcca gctgaagtag gggacaagga ggggaagagt aagaaccag ccagtaatgt 2700
 cgttgatgat gcgagaatcg gagaaagcac cgtgaccgca ctcatgggca ataaccaga 2760
 gaccagtacc gaaaagaccc tgaagaacgg tgtacacggc ccacagacca gcgcgggagg 2820
 ggggtggagg gatatatctg ggggtcacia agttgtacca gatgctgaaa gtggtagtca 2880
 ggaggacaat gtcgcggagg atataaccgt atcccttgag agcggagcgc ttgaagcagt 2940
 gcttagggat ggcattgtag atgtccttga tggtaaagtc gggaacctcg aactggttgc 3000
 cgtaggtgtc gagcatgaca ccatactcgg acttgggctt ggcgatatca acctcggaca 3060
 tggacgagag cgatgtggaa gaggccgagt ggcggggaga gtctgaagga gagacggcgg 3120

cagactcaga atccgtcaca gtagttgagg tgacggtgcg tctaagcgca gggttctgct	3180
tgggcagagc cgaagtggac gccatggaga gctgggtag tttgtgtaga gagtgtgtgt	3240
tgctagcgac tttcggattg tgctattaca caaaacgcgt cgtctcgaca ctgatcttgt	3300
cgtggatact cacggctcgg acatcgtcgc cgacgatgac accggacttt cgcttaagga	3360
cgtcagtaac aggcattgtg tgatgtgtag tttagatttc gaatctgtgg ggaaagaaag	3420
gaaaaaagag actggcaacc gattgggaga gccactgttt atatataccc tagacaagcc	3480
ccccgcttgt aagatgttgg tcaatgtaaa ccagtattaa ggttggcaag tgcaggagaa	3540
gcaagggtgtg ggtaccgagc aatggaaatg tgcggaaggc aaaaaaatga ggccacggcc	3600
tattgtcggg gctatatcca gggggcgatt gaagtacact aacatgacat gtgtccacag	3660
accctcaatc tggcctgatg agccaaatcc atacgcgctt tcgcagctct aaaggctata	3720
acaagtcaca ccaccctgct cgacctcagc gccctcactt tttgttaaga caaactgtac	3780
acgctgttcc agcgttttct gcctgcacct ggtgggacat ttggtgcaac ctaaagtgt	3840
cggaacctct gtggtgtcca gatcagcgca gcagttccga ggtagttttg aggcccttag	3900
atgatgcaat ggtgtcagtc gctggatcac gagtcttaat ggcagtattc gttcttattt	3960
gtgccattga gccccgttat cctcgtatct tctaccccc atcccatccc tttgttggtg	4020
caaccctacc catttattgt tgggtgcagc ccaaccgacg tggagagctt ggcttgcca	4080
tataaaaagg ccccccccta gtggcaatgg cagaaagtca gctgtgagtt gttgaatttg	4140
tcatctaggc ggccctggcg tcttctccgg ggcaattgtt cctctatagt actgcgtaca	4200
ctgttttaaac agtgtacgca gatctgcgac gacggaattc ctgcagccca tctgcagaat	4260
tcaggagaga cggggttggc ggcgtatttg tgtcccaaaa aacagcccca attgccccaa	4320
ttgaccccaa attgaccag tagcggggcc aaccccggcg agagccccct tcacccaca	4380
tatcaaacct cccccggttc ccacacttgc cgttaagggc gtaggggtact gcagtctgga	4440
atctacgctt gttcagactt tgtactagtt tctttgtctg gccatccggg taacccatgc	4500
cggacgcaaa atagactact gaaaattttt ttgctttgtg gttgggactt tagccaaggg	4560
tataaaagac caccgtcccc gaattacctt tcctcttctt ttctctctct ccttgtcaac	4620
tcacaccoga aatcgttaag catttccttc tgagtataag aatcattcac catggctgcc	4680
gctccctctg tgcgaaacct taccgagcc gaggttctga acgctgaggc tctgaacgag	4740
ggcaagaagg acgctgaggc tcccttcttg atgatcatcg acaacaagggt gtacgacgtc	4800
cgagagttcg tccctgacca tccctggaggc tccgtgattc tcaccacgt tggcaaggac	4860
ggcaccgacg tctttgacac ctttcatccc gaggtctgctt gggagactct cgccaacttc	4920
tacgttggag acattgacga gtccgaccga gacatcaaga acgatgactt tgccgctgag	4980

gtccgaaagc	tgcgaaccct	gttccagtct	ctcggctact	acgactcctc	taaggcctac	5040
tacgccttca	aggtctcctt	caacctctgc	atctggggac	tgtccaccgt	cattgtggcc	5100
aagtggggtc	agacctccac	cctcgccaac	gtgctctctg	ctgccctgct	cggcctgttc	5160
tggcagcagt	gcggatggct	ggctcacgac	tttctgcacc	accaggctct	ccaggaccga	5220
ttctgggggtg	atctcttcgg	agccttcctg	ggagggtgtct	gccagggtct	ctcctcttcc	5280
tggtggaagg	acaagcacia	cactcaccat	gccgtcccca	acgtgcatgg	caggagatcct	5340
gacattgaca	cccaccctct	cctgacctgg	tccgagcacg	ctctggagat	gttctccgac	5400
gtccccgatg	aggagctgac	ccgaatgtgg	tctcgattca	tggctcctgaa	ccagacctgg	5460
ttctacttcc	ccattctctc	cttcgctcga	ctgtcttggt	gcctccagtc	cattctcttt	5520
gtgctgcccc	acggtcaggc	tcacaagccc	tccggagctc	gagtgcctcat	ctccctggtc	5580
gagcagctgt	ccctcgccat	gactggacc	tggtagctcg	ctaccatgtt	cctgttcac	5640
aaggatcctg	tcaacatgct	cgtgtacttc	ctgggtgtctc	aggctgtgtg	cggaaacctg	5700
ctcgccatcg	tgttctccct	caaccacaac	ggtatgcctg	tgatctccaa	ggaggaggct	5760
gtcgacatgg	atttctttac	caagcagatc	atcactggtc	gagatgtcca	tcctggactg	5820
ttcgccaact	ggttcaccgg	tggcctgaac	taccagatcg	agcatcacct	gttcccttcc	5880
atgcctcgac	acaacttctc	caagatccag	cctgccgtcg	agaccctgtg	caagaagtac	5940
aacgtccgat	accacaccac	tggtagatc	gagggaactg	ccgagggtct	ctcccgactg	6000
aacgaggctc	ccaaggccac	ctccaagatg	ggcaaggctc	agtaagcggc	cgcagagaa	6060
gataaatata	taaatacatt	gagatattaa	atgcgctaga	ttagagagcc	tcatactgct	6120
cggagagaag	ccaagacgag	tactcaaagg	ggattacacc	atccatatcc	acagacacaa	6180
gctggggaaa	ggttctatat	acactttccg	gaataccgta	gtttccgatg	ttatcaatgg	6240
gggcagccag	gatttcaggc	acttcgggtg	ctcgggggtga	aatggcggtc	ttggcctcca	6300
tcaagtcgta	ccatgtcttc	atttgccctg	caaagtaaaa	cagaagcaga	tgaagaatga	6360
acttgaagtg	aaggaattta	aattgccccg	gagaagacgg	ccaggccgcc	tagatgacaa	6420
attcaacaac	tcacagctga	ctttctgcca	ttgccactag	gggggggcct	ttttatatgg	6480
ccaagccaag	ctctccacgt	cggttgggct	gcacccaaca	ataaatgggt	agggttgac	6540
caacaaaggg	atgggatggg	gggtagaaga	tacgaggata	acggggctca	atggcacaaa	6600
taagaacgaa	tactgccatt	aagactcgtg	atccagcgac	tgacaccatt	gcatcatcta	6660
agggcctcaa	aactacctcg	gaactgctgc	gctgatctgg	acaccacaga	ggttccgagc	6720
actttaggtt	gcaccaaattg	tcccaccagg	tgcaggcaga	aaacgctgga	acagcgtgta	6780

cagtttgtct taacaaaaag tgagggcgct gaggtcgagc aggggtggtgt gacttggtat	6840
agcctttaga gctgcgaaag cgcgtatgga tttggctcat caggccagat tgaggggtctg	6900
tggacacatg tcatgttagt gtacttcaat cgccccctgg atatagcccc gacaataggc	6960
cgtggcctca tttttttgcc ttccgcacat ttccattgct cggtacccac accttgcttc	7020
tectgcactt gccaacctta atactggttt acattgacca acatcttaca agcggggggc	7080
ttgtctaggg tatatataaa cagtggctct cccaatcggg tgccagtctc ttttttctt	7140
tctttcccca cagattcgaa atctaaacta cacatcacac aatgcctgtt actgacgtcc	7200
ttaagcgaaa gtccgggtgc atcgtcggcg acgatgtccg agccgtgagt atccacgaca	7260
agatcagtgt cgagacgacg cgttttgtgt aatgacacaa tccgaaagtc gctagcaaca	7320
cacactctct acacaaacta acccagctct ccatggagtc cattgctccc ttctgcctt	7380
ccaagatgcc tcaggacctg ttcatggacc tcgccagcgc tatcgggtgc cgagctgttc	7440
cctacgtcga tccccggag gctgccctgg ttgcccaggc cgagaagtac attcccacca	7500
ttgtccatca cactcgaggc ttcttggttg ccgtggagtc tccccggct cgagagctgc	7560
ctctgatgaa ccccttcac gtgctcctga tcgtgctgc ctacctggtc accgtgtttg	7620
tgggtatgca gatcatgaag aactttgaac gattcgaggt caagaccttc tccctcctgc	7680
acaacttctg tctggctctc atctccgct acatgtgcgg tggcatcctg tacgaggctt	7740
atcaggccaa ctatggactg ttgagaacg ctgccgatca caccttcaag ggtctcccta	7800
tggctaagat gatctggctc ttctacttct ccaagatcat ggagtttgc gacaccatga	7860
tcatggctct caagaagaac aaccgacaga tttcctttct gcacgtgtac caccactctt	7920
ccatcttcac catctgggtg ctggctacct tcgttgctcc caacggtgaa gcctacttct	7980
ctgctgcctt gaactccttc atccacgtca tcatgtacgg ctactacttt ctgtctgccc	8040
tgggcttcaa gcagggtgctg ttcatcaagt tctacatcac tcgatcccag atgaccagt	8100
tctgcatgat gtctgtccag tcttctggtg acatgtacgc catgaaggte cttggccgac	8160
ctggataccc cttcttcac accgctctgc tctggttcta catgtggacc atgctcggtc	8220
tcttctacaa cttttaccga aagaacgcca agctcgccaa gcaggccaag gctgacgctg	8280
ccaaggagaa ggccagaaag ctccagtaag cggccgcaag tgtggatggg gaagtgagtg	8340
cccggttctg tgtgcacaat tggcaatcca agatggatgg attcaacaca gggatatagc	8400
gagctacgtg gtggtgagag gatatagcaa cggatattta tgtttgacac ttgagaatgt	8460
acgatacaag cactgtccaa gtacaatact aaacatactg tacatactca tactcgtacc	8520
cgggcaacgg tttcacttga gtgcagtggc tagtgccttt actcgtacag tgtgcaatac	8580
tgcgtatcat agtctttgat gtatatcgta ttcattcatg ttagttgcgt acgaagtcgt	8640

caatgatgtc gatatgggtt ttgatcatgc acacataagg tccgacctta tcggcaagct	8700
caatgagctc cttgggtggtg gtaacatcca gagaagcaca cagggttggtt ttcttggtctg	8760
ccacgagctt gagcactcga gcggcaaagg cggacttggtg gacgttagct cgagcttcgt	8820
aggagggcat tttgggtggtg aagaggagac tgaaataaat ttagtctgca gaacttttta	8880
tcggaacctt atctggggca gtgaagtata tggtatggta atagttacga gttagttgaa	8940
cttatagata gactggacta tacggctatc ggtccaaatt agaaagaacg tcaatggctc	9000
tctgggcgtc gcctttgccg acaaaaatgt gatcatgatg aaagccagca atgacgttgc	9060
agctgatatt gttgtcggcc aaccgcgccg aaaacgcagc tgtcagacct acagcctcca	9120
acgaagaatg tatcgtcaaa gtgatecaag cacactcata gttggagtcg tactccaaag	9180
gcggcaatga cgagtcagac agatactcgt cgaccttttc cttgggaacc accaccgtca	9240
gcccttctga ctcacgtatt gtagccaccg acacaggcaa cagtcctgtg atagcagaat	9300
atgtcttgtc ggtccatttc tcaccaactt taggcgtcaa gtgaatgttg cagaagaagt	9360
atgtgccttc attgagaatc ggtgttgctg atttcaataa agtcttgaga tcagtttggc	9420
gcgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg	9480
ctcttcgctt tcctcgtca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggtgc ggcgagcgtt	9540
atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa	9600
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc	9660
gtttttccat aggtccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt caagtcagag	9720
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgtt cccctggaa gtcctcgt	9780
gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tcccttcggg	9840
aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg	9900
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgc cttatccgg	9960
taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac	10020
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg	10080
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt	10140
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg	10200
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc	10260
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt	10320
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctatgcctt ttaaattaaa aatgaagttt	10380
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag	10440

tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt 10500
 cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgtcg caatgatacc 10560
 gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 10620
 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg 10680
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac 10740
 aggcatcggtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 10800
 atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc 10860
 tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 10920
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 10980
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 11040
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 11100
 ttggggcgga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 11160
 tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 11220
 aacaggaagg caaatgccg caaaaaagg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 11280
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag gggtattgtc tcatgagcgg 11340
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 11400
 aaaagtgcc cctgatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 11460
 tcaggaaatt gtaagcgta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag 11520
 ctcatTTTTT aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac 11580
 cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga 11640
 ctccaacgtc aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggccactac gtgaaccatc 11700
 accctaataca agttttttgg ggtcgagggt ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg 11760
 gagccccga tttagagctt gacggggaaa gccggcgaaac gtggcgagaa aggaagggaa 11820
 gaaagcgaaa ggagcgggcg ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac 11880
 caccacaccc gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg tccattcgcc attcaggctg 11940
 cgcaactgtt gggaagggcg atcgggtgcg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa 12000
 ggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt 12060
 tgtaaaacga cggccagtga attgtaatac gactcactat agggcgaaatt gggcccgacg 12120
 tcgcatgcag tgggtgtatt gtgactgggg atgtagttga gaataagtca tacacaagtc 12180
 agctttcttc gagcctcata taagtataag tagttcaacg tattagcact gtaccagca 12240
 tctccgtatc gagaaacaca acaacatgcc ccattggaca gatcatgcgg atacacaggt 12300

tgtgcagtat catacatact cgatcagaca ggctcgtctga ccatcataca agctgaacaa 12360
 gcgctccata cttgcacgct ctctatatac acagttaaat tacatatcca tagtctaacc 12420
 tctaacagtt aatcttcttg taagcctccc agccagcctt ctggtatcgc ttggcctcct 12480
 caataggatc tcggttcttg ccgtacagac ctcggccgac aattatgata tccgttcggg 12540
 tagacatgac atcctcaaca gttcgggtact gctgtccgag agcgtctccc ttgtcgtcaa 12600
 gacccacccc gggggtcaga ataagccagt cctcagagtc gcccttaat 12649

<210> 25

<211> 819

<212> ADN

5 <213> *Thraustochytrium aureum*

<220>

<221> característica_misc

<223> elongasa sintética (con codones optimizados) para *Yarrowia lipolytica*

<400> 25

atggccaaact cctctgtctg ggacgacgtg gtcggacgag tcgagaccgg tgctgaccag 60
 tggatggacg gagctaagcc ctacgctctg accgacgggc tgcccatgat ggacgtctcc 120
 accatgctcg ccttcgaggt cggctacatg gccatgctgc tcttcggcat tcccatcatg 180
 aagcagatgg agaagccctt cgagctgaag accatcaagc tgctccacaa cctgttccctc 240
 ttcggactgt cctctacat gtgcgtcgag accatccgac aggctatcct ggggtggctac 300
 aaggtcttcg gcaacgacat ggagaagggc aacgagtcgc acgctcaggg catgtcccga 360
 atcgtctacg tgttctacgt ctccaaggcc tacgagttcc tggacaccgc tatcatgate 420
 ctgtgcaaga agttcaacca ggtctccttc ctgcacgtgt accaccatgc caccatcttc 480
 gccatctggt gggctattgc caagtaacgt cctgggtggcg acgctaactt ctccgtcate 540
 ctcaactcct tcgtccacac cgtcatgtac gctaactact tcttttcttc tcagggettc 600
 ggcttcgtca agcccatcaa gccctacatc accactctgc agatgaccca gttcatggct 660
 atgctggtgc agtccctgta cgactacctc ttcctctgag actaccctca ggctctggtc 720
 cagctgctcg gcgtgtacat gatcaccctg ctgcgtctgt tcggcaactt ctttgtccag 780
 tcctaccta gaagaagcccaa gaagtccaag accaactaa 819

10

<210> 26

<211> 272

<212> PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*

15

<400> 26

Met Ala Asn Ser Ser Val Trp Asp Asp Val Val Gly Arg Val Glu Thr
1 5 10 15

Gly Val Asp Gln Trp Met Asp Gly Ala Lys Pro Tyr Ala Leu Thr Asp
20 25 30

Gly Leu Pro Met Met Asp Val Ser Thr Met Leu Ala Phe Glu Val Gly
35 40 45

Tyr Met Ala Met Leu Leu Phe Gly Ile Pro Ile Met Lys Gln Met Glu
50 55 60

Lys Pro Phe Glu Leu Lys Thr Ile Lys Leu Leu His Asn Leu Phe Leu
65 70 75 80

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

Leu Gly Gly Tyr Lys Val Phe Gly Asn Asp Met Glu Lys Gly Asn Glu
100 105 110

Ser His Ala Gln Gly Met Ser Arg Ile Val Tyr Val Phe Tyr Val Ser
115 120 125

Lys Ala Tyr Glu Phe Leu Asp Thr Ala Ile Met Ile Leu Cys Lys Lys
130 135 140

Phe Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Thr Ile Phe
145 150 155 160

Ala Ile Trp Trp Ala Ile Ala Lys Tyr Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
165 170 175

Phe Ser Val Ile Leu Asn Ser Phe Val His Thr Val Met Tyr Ala Tyr
180 185 190

Tyr Phe Phe Ser Ser Gln Gly Phe Gly Phe Val Lys Pro Ile Lys Pro
195 200 205

Tyr Ile Thr Thr Leu Gln Met Thr Gln Phe Met Ala Met Leu Val Gln
210 215 220

Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Phe Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Ala Leu Val
225 230 235 240

Gln Leu Leu Gly Val Tyr Met Ile Thr Leu Leu Ala Leu Phe Gly Asn

		245		250		255
	Phe Phe Val Gln Ser Tyr Leu Lys Lys Pro Lys Lys Ser Lys Thr Asn					
		260		265		270
5	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial					
	<220> <223> Cebador 5-1A <400> 27					
	gghcaycayr tbtayacaaa		20			
10	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial					
	<220> <223> Cebador 5-1B <400> 28					
	gghcaycayr tbtayaccaa		20			
20	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial					
	<220> <223> Cebador 5-1C <400> 29					
25	gghcaycayr tbtayacgaa		20			
	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial					
30	<220> <223> Cebador 5-1D <400> 30					
	gghcaycayr tbtayactaa		20			
35	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial					
	<220> <223> Cebador 5-5AR <400> 31					
40	tgrtgvacaa yytgrwartt		20			
	<210> 32 <211> 20 <212> ADN					

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 5-5BR	
	<400> 32	
5	tgrtgvaccta yytgrwartt	20
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador 5-5CR	
	<400> 33	
	tgrtgvacca yytgrwartt	20
	<210> 34	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 5-5DR	
20	<400> 34	
	tgrtgvacga yytgrwartt	20
	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ODMW480	
	<400> 35	
	ccgataccag tcaatttggc cagcctc	27
30	<210> 36	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador CDSIII 5'	
	<400> 36	
	aagcagtggc atcaacgcag agt	23
	<210> 37	
	<211> 28	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ODMW479	
	<400> 37	
45	cttaaccttg cagttcttgc cggggatc	28
	<210> 38	

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador DNR CDS 5'
 <400> 38
 caacgcagag tggccattac gg 22
 <210> 39
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador YL791
 <400> 39
 15 cacctcgcgc attgtccgct taacgct 27
 <210> 40
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador YL792
 <400> 40
 tgcgaaggga gaatcatacg tgtagac 27
 <210> 41
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador ODMW469
 30 <400> 41
 cttcatcttc cggaccgcat tcttgc 26
 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador AUAP
 <400> 42
 ggccacgcgt cgactagtag 20
 40 <210> 43
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador ODMW470
 <400> 43
 cctcactggg acctcattgc tgatcacc 28

<210> 44
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador YL794
 <400> 44
 ttccatggc ttcagctt accacagaac ag 32
 10 <210> 45
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador YL797
 15 <400> 45
 gtacatgtac caagcttga agcgggtg 27
 <210> 46
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador YL796
 <400> 46
 caccgctcc aagcttgga catgtac 27
 25 <210> 47
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador YL795
 <400> 47
 ttgcggccg ctaggaatc ctgtgcgtcc ttcacgcag 39
 <210> 48
 <211> 4070
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Plásmido pEgD5S
 <400> 48

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatâtgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaagg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg acctcgcgaa	420
tgcatttaga tccatggctc tctcccttac taccgagcag ctgctcgagc gacccgacct	480
ggttgccatc gacggcattc tctacgatct ggaaggctct gccaaaggctc atcccggagg	540
cgacttgatc ctcgcttctg gtgcctccga tgcttctcct ctgttctact ccatgcaccc	600
ttacgtcaag cccgagaact cgaagctgct tcaacagttc gtgcgaggca agcacgaccg	660
aacctccaag gacattgtct acacctacga ctctcccttt gcacaggacg tcaagcgaac	720
tatgcgagag gtcattgaaag gtcggaactg gtatgccaca cctggattct ggctgcgaac	780
cgttggcatc attgctgtca ccgccttttg cgagtggcac tgggtacta ccggaatggt	840
gctgtgggtt ctcttgactg gattcatgca catgcagatc ggctgtoca ttcagcacga	900
tgcctctcat ggtgccatca gcaaaaagcc ctgggtcaac gctctctttg cctacggcat	960
cgacgtcatt ggatcgteca gatggatctg gctgcagtct cacatcatgc gacatcacac	1020
ctacaccaat cagcatggtc tcgacctgga tgccgagtcc gcagaaccat tccttgtgtt	1080
ccacaactac cctgctgcca acactgctcg aaagtggttt caccgattcc aggctggta	1140

catgtacctc	gtgcttggag	cctacggcgt	ttcgctggtg	tacaaccttc	tctacatctt	1200
ccgaatgcag	cacaacgaca	ccattcccga	gtctgtcaca	gccatgcgag	agaacggctt	1260
tctgcgacgg	taccgaacct	ttgcattegt	tatgcgagct	ttcttcatct	ttcgaaccgc	1320
cttcttgccc	tggtatctca	ctggaacctc	cctgtctatc	accattcctc	tggtgcccac	1380
tgctaccggt	gccttctctc	ccttcttttt	catcttgtct	cacaacttcg	atggctcgga	1440
gcgaatcccc	gacaagaact	gcaaggctca	gagctccgag	aaggacgttg	aagccgatca	1500
gatcgactgg	tacagagctc	aggtggagac	ctcttccacc	tacggtggac	ccattgccat	1560
gttctttact	ggcggctctc	acttccagat	cgagcatcac	ctctttcctc	gaatgtcgtc	1620
ttggcactat	cccttcgtgc	agcaagctgt	ccgagagtgt	tgcgaaacgac	acggagttcg	1680
gtacgtcttc	taccctacca	ttgtgggcaa	catcatttcc	accctcaagt	acatgcacaa	1740
agtcggtgtg	gttcaactgtg	tcaaggacgc	tcaggattcc	taagcggccg	catcggatcc	1800
cgggcccgtc	gactgcagag	gcctgcatgc	aagcttggcg	taatcatggt	catagctgtt	1860
tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaa	atagcagccg	gaagcataaa	1920
gtgtaaagcc	tgggggtgct	aatgagtgtg	ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcact	1980
gcccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	gccaaacgcg	2040
ggggagaggg	ggtttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	2100
ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacgggttatc	2160
cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	2220
gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	2280
tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagaggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	2340
ggcgctttcc	cctggaagct	ccctcgtgcg	ctctcctggt	ccgacctgc	cgtttaccgg	2400
atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	2460
gtatctcagt	tcgggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aaccccccg	2520
tcagcccgac	cgtgcgcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtcacaacc	cggtaagaca	2580
cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	2640
cgggtgtaca	gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	gaacagtatt	2700
tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	2760
cggcaaacaa	accaccgctg	gtagcgggtg	tttttttgtt	tgcaagcagc	agattacgcg	2820
cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	acgctcagtg	2880
gaacgaaaac	tcacgttaag	ggatttttgg	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	2940

gatcctttta aattaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg	3000
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg	3060
ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc	3120
atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagattttatc	3180
agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc	3240
ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag	3300
tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat	3360
ggcttcattc agtccgggtt cccaacgata aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg	3420
caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt	3480
gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag	3540
atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg	3600
accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt	3660
aaaagtgtc atcattggaa aacgtttctc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct	3720
gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac tgatcttcag catcttttac	3780
tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat	3840
aagggcgaca cggaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat	3900
ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca	3960
aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat	4020
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc	4070

<210> 49

<211> 8438

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pDMW369

<400> 49

ggccgcaagt gtggatgggg aagtgagtgc ccggttctgt gtgcacaatt ggcaatccaa	60
gatggatgga ttcaacacag ggatatagcg agctacgtgg tggcgagagg atatagcaac	120
ggatatttat gtttgacact tgagaatgta cgatacaagc actgtccaag tacaatacta	180
aacatactgt acatactcat actcgtaccc gggcaacggt ttcacttgag tgcagtggct	240
agtgctctta ctcgtagagt gtgcaatact gcgtatcata gtctttgatg tatatcgat	300
tcattcatgt tagttgcgta cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgccta	360
gagtgaagta actcacatta attgcgttgc gtcactgcc cgctttccag tcgggaaacc	420

tgtcgtgcc	gctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcgg	ttgcgtattg	480
ggcgtcttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggcgttcgg	ctgcggcgag	540
cggtatcagc	tactcaaaag	gcggaatac	ggttatccac	agaatcagg	gataacgcag	600
gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	660
tggcggtttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	720
agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	780
tctgcgctc	tctgttccg	acctgcgcg	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	840
cggaagcgt	ggcgctttct	catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	900
ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	ccccggttca	gcccgaaccg	tgcgccttat	960
ccggtaaacta	tctcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	1020
ccactggtaa	caggattagc	agagcgagg	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	1080
ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	1140
cagttacctt	cgaaaaaaga	gttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	1200
gcggtgggtt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	1260
atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	cgtaagggga	1320
ttttggtcat	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	ccttttaa	taaaaatgaa	1380
gttttaaatc	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	1440
tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	gcctgactcc	1500
ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	gctgcaatga	1560
taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atztatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	1620
gggcccagcg	cagaagtgg	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagtct	attaattggt	1680
gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacggt	gttgccattg	1740
ctacaggcat	cgtggtgtca	cgctcgtcgt	ttggtatggc	ttcattcagc	tccggttccc	1800
aacgatcaag	gcgagttaca	tgatccccca	tgttgtgcaa	aaaagcgggt	agctccttcg	1860
gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagttgg	ccgcagtgtt	atcactcatg	gttatggcag	1920
cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaagatg	cttttctgtg	actggtgagt	1980
actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgtg	tgccggcgacc	gagttgctct	tgccccgcgt	2040
caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	gaactttaaa	agtgtcatc	attggaaaac	2100
gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctgtt	gagatccagt	tcgatgtaac	2160
ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcgtt	tctgggtgag	2220

caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa	2280
tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	2340
gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	2400
cccgaaaaagt gccacctgac gcgccttgta gcggcgcaatt aagcgcgggc ggtgtgggtg	2460
ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccttagc gcccgctcct ttcgctttct	2520
tcccttcctt tctcgccacg ttcgcgggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc	2580
ctttaggggt ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg	2640
atggttcacg tagtgggcca tcgcctgat agacggtttt tcgccccttg acgttgagat	2700
ccacgttctt taatagtga ctcttgctcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg	2760
tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc	2820
tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttccattc	2880
gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg	2940
ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc	3000
ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga	3060
attgggtacc gggccccccc tcgaggtcga tgggtgctgat aagcttgata tcgaattcat	3120
gtcacacaaa ccgatcttcg cctcaaggaa acctaatctt acatccgaga gactgccgag	3180
atccagtcta cactgattaa ttttcgggcc aataatttaa aaaaatcgtg ttatataata	3240
ttatatgtat tatatatata catcatgatg atactgacag tcatgtccca ttgctaaata	3300
gacagactcc atctgcggcc tccaactgat gttctcaata tttaaggggt catctcgcac	3360
tgtttaataa taaacagact ccatctaccg cctccaaatg atgttctcaa aatatattgt	3420
atgaacttat ttttattact tagtattatt agacaactta cttgctttat gaaaaacact	3480
tcctatttag gaaacaattt ataatggcag ttcgttcatt taacaattta tgtagaataa	3540
atgttataaa tgcgtatggg aaatcttaaa tatggatagc ataaatgata tctgcattgc	3600
ctaattcgaa atcaacagca acgaaaaaaaa tcccttgtag aacataaata gtcacgcaga	3660
aatatcaact atcaaagaac agctattcac acgttactat tgagattatt attggacgag	3720
aatcacacac tcaactgtct ttctctcttc tagaaataca ggtacaagta tgtactattc	3780
tcattgttca tacttctagt catttcatcc cacatatcc ttcgatttct ctccaatgaa	3840
tgacattcta tcttgcaaat tcaacaatta taataagata taccaaagta gcggtatagt	3900
ggcaatcaaa aagcttctct ggtgtgcttc tcgtatttat ttttattcta atgatccatt	3960
aaaggtatat atttatttct tggtatataa tccttttggt tattacatgg gctggataca	4020
taaaggtatt ttgatttaat tttttgctta aattcaatcc cccctcgctc agtgtcaact	4080

gtaatggtag gaaattacca tacttttgaa gaagcaaaaa aaatgaaaga aaaaaaaaaat	4140
cgtatttcca ggtagacgt tccgcagaat ctagaatgcg gtatgcggtta cattgttctt	4200
cgaacgtaaa agttgcgctc cctgagatat tgtacatttt tgctttttaca agtacaagta	4260
catcgtacaa ctatgtacta ctgttgatgc atccacaaca gtttgttttg tttttttttg	4320
tttttttttt ttctaattgat tcattaccgc tatgtatacc tacttgtact tgtagtaagc	4380
cgggttattg gcgttcaatt aatcatagac ttatgaatct gcacgggtgtg cgtgcgagt	4440
tacttttagc ttatgcatgc tacttgggtg taatattggg atctgttcgg aaatcaacgg	4500
atgctcaatc gatttcgaca gtaattaatt aagtcataca caagtcagct ttcttcgagc	4560
ctcatataag tataagtagt tcaacgtatt agcactgtac ccagcatctc cgtatcgaga	4620
aacacaacaa catgccccat tggacagatc atgcgggatac acaggttggtg cagtataata	4680
catactcgat cagacaggtc gtctgaccat catacaagct gaacaagcgc tccatacttg	4740
cacgctctct atatacacag ttaaattaca tatccatagt ctaacctcta acagttaatc	4800
ttctggtaag cctcccagcc agccttctgg tatcgcttgg cctcctcaat aggatctcgg	4860
ttctggccgt acagacctcg gccgacaatt atgatataccg ttccggtaga catgacatcc	4920
tcaacagttc ggtactgctg tccgagagcg tctcccttgt cgtcaagacc cccccgggg	4980
gtcagaataa gccagtcctc agagtcgccc ttaggtcgggt tctgggcaat gaagccaacc	5040
acaaactcgg ggtcggatcg ggcaagctca atggtctgct tggagtactc gccagtggcc	5100
agagagccct tgcaagacag ctcgccagc atgagcagac ctctggccag cttctcgttg	5160
ggagagggga ctaggaactc ctgtactgg gagttctcgt agtcagagac gtcctccttc	5220
ttctgttcag agacagtttc ctcggcacca gctcgcaggc cagcaatgat tccggttcg	5280
ggtacaccgt gggcgttggg gatatacggac cactcggcga ttcggtgaca ccggtactgg	5340
tgcttgacag tgttgccaat atctgcgaac tttctgtcct cgaacaggaa gaaaccgtgc	5400
ttaagagcaa gttccttgag ggggagcaca gtgccggcgt aggtgaagtc gtcaatgatg	5460
tcgatatggg ttttgatcat gcacacataa ggtccgacct tatcggcaag ctcaatgagc	5520
tccttggttg tggtaacatc cagagaagca cacaggttgg ttttcttggc tgccacgagc	5580
ttgagcactc gagcggcaaa ggcggacttg tggacgttag ctcgagcttc gtaggagggc	5640
attttggttg tgaagaggag actgaaataa atttagtctg cagaactttt tatcggaacc	5700
ttatctgggg cagtgaagta tatgttatgg taatagttac gagttagttg aacttataga	5760
tagactggac tatacggcta tcggtccaaa ttagaaagaa cgtcaatggc tctctgggcg	5820
tcgcctttgc cgacaaaaat gtgatcatga tgaaagccag caatgacgtt gcagctgata	5880

ttgttgctcg	ccaaccgcgc	cgaaaacgca	gctgtcagac	ccacagcctc	caacgaagaa	5940
tgtatcgta	aagtgatcca	agcacactca	tagttggagt	cgtactccaa	aggcggcaat	6000
gacgagtcag	acagatactc	gtcgactcag	gcgacgacgg	aattcctgca	gcccattctgc	6060
agaattcagg	agagaccggg	ttggcggcgt	atttgtgtcc	caaaaaacag	ccccatttgc	6120
cccggagaag	acggccaggc	cgcttagatg	acaaattcaa	caactcacag	ctgactttct	6180
gccattgcc	ctaggggggg	gcctttttat	atggccaagc	caagctctcc	acgtcggttg	6240
ggctgcaccc	aacaataaat	gggtaggggt	gcaccaacaa	agggatggga	tggggggtag	6300
aagatacgag	gataacgggg	ctcaatggca	caaataagaa	cgaatactgc	cattaagact	6360
cgtgatccag	cgactgacac	cattgcatca	tctaagggcc	tcaaaactac	ctcgggaactg	6420
ctgcgctgat	ctggacacca	cagaggttcc	gagcacttta	ggttgacca	aatgtccac	6480
caggtgcagg	cagaaaacgc	tggaacagcg	tgtacagttt	gtcttaacaa	aaagtgaggg	6540
cgctgaggtc	gagcaggggtg	gtgtgacttg	ttatagcctt	tagagctgcg	aaagcgcgta	6600
tggatttggc	tcatcaggcc	agattgaggg	tctgtggaca	catgtcatgt	tagtgtactt	6660
caatcgcccc	ctggatatag	ccccgacaat	aggccgtggc	ctcatttttt	tgccttcgcg	6720
acatttccat	tgtcgggtac	ccacaccttg	cttctcctgc	acttgccaac	cttaataactg	6780
gtttacattg	accaacatct	tacaagcggg	gggcttgtct	agggtatata	taaacagtgg	6840
ctctcccaat	cggttgccag	tctctttttt	cctttcttct	cccacagatt	cgaaatctaa	6900
actacacatc	acacaatgcc	tgttactgac	gtccttaagc	gaaagtccgg	tgtcatcgtc	6960
ggcgacgatg	tccgagccgt	gagtatccac	gacaagatca	gtgtcgagac	gacgcgtttt	7020
gtgtaatgac	acaatccgaa	agtcgctagc	aacacacact	ctctacacaa	actaaccag	7080
ctctccatgg	ctctctccct	tactaccgag	cagctgctcg	agcgaccgga	cctgggtggc	7140
atcgacggca	ttctctacga	tctggaaggt	cttgccaagg	tccatcccgg	aggcgacttg	7200
atcctcgctt	ctggtgcctc	cgatgcttct	cctctgttct	actccatgca	cccttacgtc	7260
aagcccgaga	actcgaagct	gottcaacag	ttcgtgcgag	gcaagcacga	ccgaacctcc	7320
aaggacattg	tctacacct	cgactctccc	tttgcacagg	acgtcaagcg	aactatgcga	7380
gaggtcatga	aaggtcggaa	ctggtatgcc	acacctggat	tctggctgcg	aaccgttggc	7440
atcattgctg	tcaccgcctt	ttgcgagtgg	cactgggcta	ctaccggaat	ggtgctgtgg	7500
ggtctcttga	ctggattcat	gcacatgcag	atcggcctgt	ccattcagca	cgatgcctct	7560
catggtgcc	tcagcaaaaa	gccctgggtc	aacgctctct	ttgcctacgg	catcgacgtc	7620
attggatcgt	ccagatggat	ctggtgcag	tctcacatca	tgcgacatca	cacctacacc	7680
aatcagcatg	gtctcgacct	ggatgccgag	tccgcagaac	cattccttgt	gttccacaac	7740

```
taccctgctg ccaacactgc tcgaaagtgg ttccaccgat tccaggcctg gtacatgtac 7800
ctcgtgcttg gagcctacgg cgtttcgcgtg gtgtacaacc ctctctacat cttccgaatg 7860
cagcacaacg acaccattcc cgagtctgtc acagccatgc gagagaacgg ctttctgcga 7920
cgggtaccgaa cccttgcatt cgttatgcga gctttcttca tctttcgaac cgccttcttg 7980
ccctgggtatc tcactggaac ctccctgctc atcaccattc ctctggtgcc cactgctacc 8040
ggtgccttcc tcaccttctt ttctcatcttg tctcacaact tcgatggctc ggagcgaatc 8100
cccgacaaga actgcaaggt caagagctcc gagaaggacg ttgaagccga tcagatcgac 8160
tggtacagag ctcagggtga gacctcttcc acctacgggtg gacccattgc catgttcttt 8220
actggcggtc tcaacttcca gatcgagcat cacctcttcc ctggaatgct gtcttggcac 8280
tatcccttcg tgcagcaagc tgtccgagag tgttgccaac gacacggagt tcggtacgtc 8340
ttctacccta ccattgtggg caacatcatt tccaccttca agtacatgca caaagtcggt 8400
gtgggttcaact gtgtcaagga cgctcaggat tcctaagc 8438
```

<210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador T7
 <400> 50

ggaaacagct atgaccatg 19

<210> 51
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> *Rhizopus stolonifer* (n.º de registro de GenBank AAX22052)
 <400> 51

Met Ser Thr Leu Asp Arg Gln Ser Ile Phe Thr Ile Lys Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Ser Ile Ser Gln Arg Ile His Asp Gly Asp Glu Glu Ala Met Lys Phe
 20 25 30

Ile Ile Ile Asp Lys Lys Val Tyr Asp Val Thr Glu Phe Ile Glu Asp
 35 40 45

His Pro Gly Gly Ala Gln Val Leu Leu Thr His Val Gly Lys Asp Ala
 50 55 60

Ser Asp Val Phe His Ala Met His Pro Glu Ser Ala Tyr Glu Val Leu
65 70 75 80

Asn Asn Tyr Phe Val Gly Asp Val Gln Glu Thr Val Val Thr Glu Lys
85 90 95

Ser Ser Ser Ala Gln Phe Ala Val Glu Met Arg Gln Leu Arg Asp Gln
100 105 110

Leu Lys Lys Glu Gly Tyr Phe His Ser Ser Lys Leu Phe Tyr Ala Tyr
115 120 125

Lys Val Leu Ser Thr Leu Ala Ile Cys Ile Ala Gly Leu Ser Leu Leu
130 135 140

Tyr Ala Tyr Gly Arg Thr Ser Thr Leu Ala Val Val Ala Ser Ala Ile
145 150 155 160

Thr Val Gly Ile Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe
165 170 175

Gly His His Gln Cys Phe Glu Asp Arg Thr Trp Asn Asp Val Leu Val
180 185 190

Val Phe Leu Gly Asn Phe Cys Gln Gly Phe Ser Leu Ser Trp Trp Lys
195 200 205

Asn Lys His Asn Thr His His Ala Ser Thr Asn Val His Gly Gln Asp
210 215 220

Pro Asp Ile Asp Thr Ala Pro Val Leu Leu Trp Asp Glu Tyr Ala Ser
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Tyr Ala Ser Leu Asp Gln Glu Pro Thr Met Val Ser Arg
245 250 255

Phe Leu Ala Glu Gln Val Leu Pro His Gln Thr Arg Tyr Phe Phe Phe
260 265 270

Ile Leu Ala Phe Ala Arg Leu Ser Trp Ala Leu Gln Ser Leu Ser Tyr
275 280 285

Ser Phe Lys Lys Glu Ser Ile Asn Lys Ser Arg Gln Leu Asn Leu Phe
290 295 300

Glu Arg Val Cys Ile Val Gly His Trp Ala Leu Phe Ala Phe Cys Ile

305		310		315		320
Tyr Ser Trp Cys Ser Asn Val Tyr His Met Val Leu Phe Phe Leu Val	325		330		335	
Ser Gln Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Leu Ala Leu Val Phe Ala Leu Asn	340		345		350	
His Asn Gly Met Pro Val Ile Thr Glu Glu Lys Ala Glu Ser Met Glu	355		360		365	
Phe Phe Glu Ile Gln Val Ile Thr Gly Arg Asp Val Thr Leu Ser Pro	370		375		380	
Leu Gly Asp Trp Phe Met Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His	385		390		395	400
Val Phe Pro Asn Met Pro Arg His Asn Leu Pro Thr Val Lys Pro Met	405		410		415	
Val Lys Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Asp Ile Asn Tyr His Asp Thr Gly	420		425		430	
Phe Leu Lys Gly Thr Leu Glu Val Leu Gln Thr Leu Asp Ile Thr Ser	435		440		445	
Lys Leu Ser Leu Gln Leu Ser Lys Lys Ser Phe	450		455			

<210> 52
 <211> 695
 <212> ADN
 <213> *Pavlova lutheri*

5

<400> 52

agggccaagg gtgccaacca ccttccacgt gagactacac accgtaggcc gatgggcaag	60
ggtggagacg gcggcgcgca ggcgggtgagc gggaccgacg cgtctctcgc tgaggtgagc	120
tccgtcgata gcaagagcgt gcacgtcgtg ctctacggca agcgcgtgga tgtcacaaag	180
ttccagggct acgacgtggc ctggtggcgc gcgcgccata acacgcacca cgtgtgcacc	240
aacgaggatg gttcggaccc ggacatcaag acggcgcccc tgctcatcta cgtgcgagag	300
aaccgcgtcca ttgccaagcg gctcaacttc ttccagcgct ggcagcagta ctactatgtg	360
ccgaccatgg ccatacctcga cctctactgg cgcctggagt ccatacgcgta cgtggctgtg	420
cgctgccta agatgtggat gcaggccgcc gctcttgccg ctactacgc gctcctgtgc	480

tgggtcttcg cagcgcatct caacctcacc cctctcatga tggttgcacg cggcttcgcg 540
acgggcatcg ttgtctttgc aaccactat ggtgaggaca tcctcgaccg cgagcacgtc 600
gagggcatga cgctcgtcga gcagaccgcc aagacctccc gtaacatcac gggcggtg 660
ctagtgaacg tgctcacggg cttcatctcc ctgca 695

<210> 53

<211> 1106

<212> ADN

5 <213> *Pavlova lutheri*

<400> 53

agggccaagg gtgccaacca ccttcacgt gagactacac accgtaggcc gatgggcaag 60
ggtggagacg gcggcgcgca ggcggtgagc gggaccgacg cgtctctcgc tgagggtgagc 120
tcctcgata gcaagagcgt gcacgtcgtg ctctacggca agcgcggtga tgacacaaag 180
ttccagggct acgacgtggc ctggtggcgc gcgcgccata acacgcacca cgtgtgcacc 240
aacgaggatg gttcggaccc ggacatcaag acggcgcccc tgctcatcta cgtgcgagag 300
aaccctcca ttgccaagcg gctcaacttc ttccagcgt ggcagcagta ctactatgtg 360
ccgaccatgg ccctcctcga cctctactgg cgcctggagt ccctcgcgta cgtggctgtg 420
cgctcgcta agatgtggat gcaggccgcc gctcttgccg ctactacgc gctcctgtgc 480
tgggtcttcg cagcgcatct caacctcacc cctctcatga tggttgcacg cggcttcgcg 540
acgggcatcg ttgtctttgc aaccactat ggtgaggaca tcctcgaccg cgagcacgtc 600
gagggcatga cgctcgtcga gcagaccgcc aagacctccc gtaacatcac gggcggtg 660
ctagtgaacg tgctcacggg cttcatctcc ctgcaagacc agcatcacct cttcccatg 720
atgcccaccg gcaacctaat gactatccag cccgaggtac gcgacttctt caagaagcat 780
ggcctcgagt accgcgaggg caacctcttc cagtgcgtgc accagaacat caaggctctc 840
gccttcgagc acctcctcca ctgagcgtca ccactcaagc gtcctaagtg cacagggtact 900
gtcttctgac cgatggccgc gcggctccct cggctggcag tggggccaac gagtggcctc 960
gcgggatcgg gcacgatcgg gcctccatga aacttcagtg ttcagagaca agccgacaac 1020
ctccgcatcg tgagaaatct tttaaagcag tatgttccat cagccgctt ttgcagtcaa 1080
taacattacc caaaaaaaaaa aaaaaa 1106

<210> 54

<211> 287

<212> PRT

10 <213> *Pavlova lutheri*

<400> 54

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

					245					250							255
	Phe	Lys	Lys	His	Gly	Leu	Glu	Tyr	Arg	Glu	Gly	Asn	Leu	Phe	Gln	Cys	
				260					265					270			
	Val	His	Gln	Asn	Ile	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Leu	His		
			275					280					285				
	<210> 55 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador SeqE <400> 55 cgacacactc caatctttcc 20																
5	<210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador SeqW <400> 56 ggtggctgga gtagacatc 20																
10	<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador AP1 <400> 57																
15	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador GSP PvDES <400> 58 ctgcgaagac ccagcacagg 20																
20	<210> 59 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador M13-28Rev <400> 59																
25	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador GSP PvDES <400> 58																
30	<210> 59 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador M13-28Rev <400> 59																
35	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador GSP PvDES <400> 58																
40	<210> 59 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador M13-28Rev <400> 59																

gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador PavDes seq

<400> 60

ttgtggcgct caatcatctc c 21

10 <210> 61
 <211> 1294
 <212> ADN
 <213> *Pavlova lutheri*

<400> 61

ctttgcgagc gcggcgcgaga cgattgcggc ccgtagtgat cgcgggtgcgc attgctgtgt 60

ttctagtttt gctgacgccc ggcccagataa tgacaccttc tcccgtttga aataactaata 120

agtaactata ttataatatt caaagggtggc gactatggat ctccctttct aaagttcagc 180

ggaattggga atcggagaaa ttctgagata tgtcataatc acgtgctcta tctcgaatga 240

aaccgcggccg gtgagcgatt actcgggaag ccaattccta ttaacgagtc aggggggagc 300

tttgagggtga gtcggccacg cagagagagc aaggaatcat cctcatccgc cgttctcgag 360

aaagagccaa ggggtgccaa caccctccac gtgagactac acaccgtagg ccgatgggca 420

aggggtggaga cggcggcgcg caggcgggca gcgggaccga cgcctctctc gctgagggtga 480

gctccgtcga tagcaagagc gtgcgcgctc tgctctacgg caagcgcgtg gatgtcacia 540

agttccagag ggcacacccg ggcgggagca aggtgttccg catcttccag ggcgcgcgac 600

cgacggagca gttcgagtct taccactcgc ccaaggccat caagatgatg gagggcatgc 660

tcaagaagtc ggaggatgcg cccgcttccg tgccctgcc ctcgcggtcc accatgggca 720

cggagttcaa ggagatgatt gagcgccaca agaggggtgg tctctacgac ccttgcccgt 780

tggacgagct gttcaagctc accatcgtcc ttgcgcccac cttcgtgggc gcctatctcg 840

tgcggagcgg cgtctcgccc ctcgcgggag cgtctccat gggttttggc ttctacctcg 900

acggctggct tgctcacrac tacctgcac acgcagtctt caagggctcg gtcaacacgc 960

tcgtcaaggc gaacaacgcc atgggatacg cctcggctt cctccagggc tacgacgtgg 1020

15

cctggtggcg cgcgcgccat aacacgcacc acgtgtgcac caacgaggat ggttcggacc 1080
 cggacatcaa gacggcgccc ctgctcatct acgtgcgaga gaaccggtcc attgccaagc 1140
 ggctcaactt cttccagcgc tggcagcagt actactatgt gccgaccatg gccatcctcg 1200
 acctctactg gcgcctggag tccatcgcg acgtggctgt gcgcctgcct aagatgtgga 1260
 tgcaggccgc cgctcttgcc gctcactacg cgct 1294

<210> 62

<211> 1927

<212> ADN

5 <213> *Pavlova lutheri*

<400> 62

ctttgcgagc gcggcgacaga cgattgcggc ccgtagtgat cgcggtgcgc attgctgtgt 60
 ttctagtttt gctgacgccc ggcccgataa tgacaccttc tcccgtttga aatactaata 120
 agtaactata ttataatatt caaagggtggc gactatggat ctccctttct aaagttcagc 180
 ggaattggga atcgagagaa tttcgagata tgtcataatc acgtgctcta tctcgaatga 240
 accgcggccg gtgagcgatt actcgggaag ccaattccta ttaacgagtc aggggggatc 300
 tttgaggtga gtcggccacg cagagagagc aaggaatcat cctcatccgc cgttctcgag 360
 aaagagccaa ggggtgccaa caccttccac gtgagactac acaccgtagg ccgatgggca 420
 aggggtggaga cggcgcgcg caggcgggtga gcgggaccga cgcgtctctc gctgaggtga 480
 gctccgtcga tagcaagagc gtgcacgtcg tgctctacgg caagcgcgtg gatgtcacia 540
 agttccagaa ggcacacccg ggcgggagca aggtgttccg catcttccag gacgcgcacg 600
 cgacggagca gttcgagtct taccactcgc ccaaggccat caagatgatg gagggcatgc 660
 tcaagaagtc ggaggatgcg cccgcttccg tgcccctgcc ctgcggtcc accatgggca 720
 cggagttcaa ggagatgatt gagcgccaca agagggctgg tctctacgac ccttgcccgt 780
 tggacgagct gttcaagctc accatcgtcc ttgcgcccac cttcgtgggc gcctatctcg 840
 tgcggagcgg cgtctcgccc ctgcggggcg cgctctccat gggttttggc ttctacctcg 900
 acggctggct tgctcacgac tacctgcac acgcagtcct caagggctcg gtcaacacgc 960
 tcgtcaaggc gaacaacgcc atgggatacg cctcggctt cctccagggc tacgacgtgg 1020
 cctggtggcg cgcgcgccat aacacgcacc acgtgtgcac caacgaggat ggttcggacc 1080
 cggacatcaa gacggcgccc ctgctcatct acgtgcgaga gaaccggtcc attgccaagc 1140
 ggctcaactt cttccagcgc tggcagcagt actactatgt gccgaccatg gccatcctcg 1200
 acctctactg gcgcctggag tccatcgcg acgtggctgt gcgcctgcct aagatgtgga 1260
 tgcaggccgc cgctcttgcc gctcactacg cgctcctgtg ctgggtcttc gcagcgcac 1320

```

tcaacctcat ccctctcatg atggttgac gcggttcgc gacgggcatc gttgtctttg 1380
caaccacta tggtaggac atcctcgacc gcgagcacgt cgagggcatg acgctcgtcg 1440
agcagaccgc caagacctcc cgtaacatca cgggcggctg gctagtgaac gtgctcacgg 1500
gcttcatctc cctgcagacc gagcatcacc tcttccccat gatgcccacc ggcaacctaa 1560
tgactatcca gcccgaggta cgcgacttct tcaagaagca tggcctcgag taccgagagg 1620
gcaacctctt ccagtgcgtg caccagaaca tcaaggctct cgccttcgag cacctcctcc 1680
actgagcgtc accactcaag cgtcctaagt gcacaggtac tgtcttctga ccgatggccg 1740
cgcggtctcc tcggctggca gtggggccaa cgagtggcct cgcgggatcg ggcacgatcg 1800
ggcctccatg aaacttcagt gttcagagac aagccgacaa cctccgcatc gtgagaaatc 1860
ttttaagca gtatgttcca tcacgccgct tttgcagtca ataacattac ccaaaaaaaa 1920
aaaaaaa 1927

```

<210> 63

<211> 459

<212> PRT

5 <213> *Rhizopus stolonifer* (n.º de registro de GenBank ABB96724)

<400> 63

```

Met Ser Thr Leu Asp Arg Gln Ser Ile Phe Thr Ile Lys Glu Leu Glu
1          5          10          15

Ser Ile Ser Gln Arg Ile His Asp Gly Asp Glu Glu Ala Met Lys Phe
20          25          30

Ile Ile Ile Asp Lys Lys Val Tyr Asp Val Thr Glu Phe Ile Glu Asp
35          40          45

His Pro Gly Gly Ala Gln Val Leu Leu Thr His Val Gly Lys Asp Ala
50          55          60

Ser Asp Val Phe His Ala Met His Pro Glu Ser Ala Tyr Glu Val Leu
65          70          75          80

Asn Asn Tyr Phe Val Gly Asp Val Gln Glu Thr Val Val Thr Glu Lys
85          90          95

Ser Ser Ser Ala Gln Phe Ala Val Glu Met Arg Gln Leu Arg Asp Gln
100         105         110

Leu Lys Lys Glu Gly Tyr Phe His Ser Ser Lys Leu Phe Tyr Ala Tyr
115         120         125

```

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

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

Leu Gly Asp Trp Phe Met Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His
385 390 395 400

Val Phe Pro Asn Met Pro Arg His Asn Leu Pro Thr Val Lys Pro Met
405 410 415

Val Lys Ser Leu Cys Gln Lys Tyr Asp Ile Asn Tyr His Asp Thr Gly
420 425 430

Phe Leu Lys Gly Thr Leu Glu Val Leu Gln Thr Leu Asp Ile Thr Ser
435 440 445

Lys Leu Ser Leu Gln Leu Ser Lys Lys Ser Phe
450 455

<210> 64

<211> 427

<212> PRT

5 <213> Pavlova salina

<300>

<302> SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA POR CÉLULAS RECOMBINANTES

<310> documento WO 2005/103253

10 <311> 22-04-2005

<312> 03-11-2005

<313> (1) .. (427)

<400> 64

Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu
1 5 10 15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys
20 25 30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe
35 40 45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
50 55 60

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
65 70 75 80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp

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

Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu
340 345 350

Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly
355 360 365

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr
370 375 380

Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys
385 390 395 400

His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln
405 410 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu
420 425

<210> 65

<211> 37

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador AP

<400> 65

ggccacgcgt cgactagtag tttttttt tttttt 37

10 <210> 66

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador oligonucleotídico Smart IV

<400> 66

aagcagtggg atcaacgcag agtggccatt acggccggg 39

<210> 67

<211> 1338

20 <212> ADN

<213> *Mortierella alpina*

<400> 67

atgggaacgg accaaggaaa aaccttcacc tgggaagagc tggcggccca taacaccaag 60

gacgacctac tcttggccat ccgcggcagg gtgtacgatg tcacaaagtt cttgagccgc 120

catcctggtg gaggggacac tctcctgctc ggagctggcc gagatgttac tccggtcttt 180

gagatgtatc acgcgtttgg ggctgcagat gccattatga agaagtacta tgtcggtaca 240
ctggtctega atgagctgcc catcttcccg gagccaacgg tgttccacaa aaccatcaag 300
acgagagtcg agggctactt tacggatcgg aacattgatc ccaagaatag accagagatc 360
tggggacgat acgctcttat ctttgatcc ttgatcgctt cctactacgc gcagctcttt 420
gtgcctttcg ttgtcgaacg cacatggctt caggtggtgt ttgcaatcat catgggattt 480
gcgtgcgcac aagtcggact caaccctctt catgatgcgt ctcacttttc agtgaccac 540
aaccctactg tctggaagat tctgggagcc acgcacgact ttttcaacgg agcatcgtac 600
ctggtgtgga tgtaccaaca tatgctcggc catcaacctt acaccaacat tgctggagca 660
gatcccgacg tgtcgacgtc tgagcccgat gttcgtcgta tcaagcccaa ccaaaagtgg 720
tttgtcaacc acatcaacca gcacatgttt gttcctttcc tgtacggact gctggcgttc 780
aaggtgcgca ttcaggacat caacattttg tactttgtca agaccaatga cgctattcgt 840
gtcaatccca tctcgacatg gcacactgtg atgttctggg gcggcaagge tttctttgtc 900
tggtatcgcc tgattgttcc cctgcagtat ctgcccctgg gcaaggtgct gctcttgttc 960
acggtcgcgg acatggtgtc gtcttactgg ctggcgctga ccttccaggc gaaccacgtt 1020
gttgaggaag ttcagtggcc gttgcctgac gagaacggga tcatccaaaa ggactgggca 1080
gctatgcagg tcgagactac gcaggattac gcacacgatt cgcacctctg gaccagcatc 1140
actggcagct tgaactacca ggctgtgcac catctgttcc ccaacgtgtc gcagcaccat 1200
tatcccgata ttctggccat catcaagaac acctgcagcg agtacaaggt tccatacctt 1260
gtcaaggata cgttttgga agcatttgct tcacatttgg agcacttgcg tgttcttggga 1320
ctccgtccca aggaagag 1338

<210> 68

<211> 446

<212> PRT

5 <213> *Mortierella alpina*

<400> 68

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala
1 5 10 15

His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr
20 25 30

Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu
35 40 45

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

290	295	300
Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe 305 310 315 320		
Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln 325 330 335		
Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn 340 345 350		
Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln 355 360 365		
Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu 370 375 380		
Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His 385 390 395 400		
Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys 405 410 415		
Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His 420 425 430		
Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu 435 440 445		

<210> 69
 <211> 6473
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pY5-22

<400> 69

ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat	60
ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacgtacgag	120
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaattgagt gagctaactc acattaattg	180
cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa	240
tgggccaacg cgcggggaga ggcgggttgc gtattgggcg ctcttcgct tctcgtctca	300
ctgactcgtt gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg	360
taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	420

agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc	480
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	540
tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc	600
tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	660
gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	720
acgaaccccc cggttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	780
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	840
cgagggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta	900
gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	960
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	1020
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacgggggt	1080
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtattt ggtcatgaga ttatcaaaaa	1140
ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	1200
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	1260
tctgtctatt tcgttcaccc atagtgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	1320
gggagggctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	1380
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg	1440
caactttatc cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtattt	1500
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct	1560
cgtcgtttgg tatggttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat	1620
ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta	1680
agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca	1740
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	1800
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac	1860
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa	1920
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt	1980
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	2040
caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	2100
attattgaag catctatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt	2160
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgcgc	2220

cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 2280
 ttgccagcgc cctagcgcgc gtccttttcg ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg 2340
 ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatacggg ggctcccttt aggggttcga tttagtgtt 2400
 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc 2460
 cctgatagac gggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 2520
 tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataaggga 2580
 ttttgccgat ttccggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 2640
 attttaacaa aatattaacg cttacaattt ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 2700
 ggaagggcga tcgggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag ggggatgtgc 2760
 tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac 2820
 ggccagtga tttgaataacg actcactata gggcgaaattg ggtaccgggc ccccccctga 2880
 ggtcgatggt gtcgataagc ttgatatcga attcatgtca cacaaaccga tcttcgcctc 2940
 aaggaaacct aattctacat ccgagagact gccgagatcc agtctacact gattaatttt 3000
 cgggccaaata atttaaaaaa atcgtgttat ataataattat atgtattata tatatacatc 3060
 atgatgatac tgacagtcac gtcccattgc taaatagaca gactccatct gccgcctcca 3120
 actgatgttc tcaatattta aggggtcatc tcgcattgtt taataataaa cagactccat 3180
 ctaccgcctc caaatgatgt tctcaaaata tattgtatga acttattttt attacttagt 3240
 attattagac aacttacttg ctttatgaaa aacacttcct atttaggaaa caatttataa 3300
 tggcagttcg ttcatttaac aatttatgta gaataaatgt tataaatgcg tatgggaaat 3360
 cttaaatatg gatagcataa atgatatctg cattgcctaa ttcgaaatca acagcaacga 3420
 aaaaaatccc ttgtacaaca taaatagtca tcgagaaata tcaactatca aagaacagct 3480
 attcacacgt tactattgag attattattg gacgagaatc acacactcaa ctgtctttct 3540
 ctcttctaga aatacaggta caagtatgta ctattctcat tgttcatact tctagtcatt 3600
 tcatcccaca tattccttgg atttctctcc aatgaatgac attctatctt gcaaattcaa 3660
 caattataat aagatatacc aaagtagcgg tatagtggca atcaaaaagc ttctctggtg 3720
 tgcttctcgt atttattttt attctaataga tccattaaag gtatatattt atttcttggt 3780
 atataatcct tttgtttatt acatgggctg gatacataaa ggtattttga ttttaattttt 3840
 tgcttaaatt caatcccccc tcgttcagtg tcaactgtaa tggtaggaaa ttaccatact 3900
 tttgaagaag caaaaaaaat gaaagaaaaa aaaaatcgta tttccagggt agacgttcg 3960
 cagaatctag aatgcggtat gcggtacatt gttcttcgaa cgtaaaagtt gcgctccctg 4020
 agatattgta catttttgct tttacaagta caagtacatc gtacaactat gtactactgt 4080

tgatgcatcc	acaacagttt	gttttgtttt	tttttgtttt	ttttttttct	aatgattcat	4140
taccgctatg	tatacctact	tgtacttgta	gtaagccggg	ttattggcgt	tcaattaatc	4200
atagacttat	gaatctgcac	ggtgtgcgct	gcgagttact	tttagcttat	gcatgctact	4260
tgggtgtaat	attgggatct	gttcggaaat	caacggatgc	tcaaccgatt	tcgacagtaa	4320
ttaattaagt	catacacaa	tcagctttct	tcgagcctca	tataagtata	agtagttcaa	4380
cgtattagca	ctgtacccag	catctccgta	tcgagaaaca	caacaacatg	ccccattgga	4440
cagatcatgc	ggatacacag	gttgtgcagt	atcatacata	ctcgatcaga	caggctcgtct	4500
gaccatcata	caagctgaac	aagcgcctca	tacttgacgc	ctctctatat	acacagttaa	4560
attacatatc	catagtctaa	cctctaacag	ttaatcttct	ggtaagcctc	ccagccagcc	4620
ttctggatc	gcttggcctc	ctcaatagga	tctcggttct	ggccgtacag	acctcggccg	4680
acaattatga	tatccgttcc	ggtagacatg	acatcctcaa	cagttcggta	ctgctgtccg	4740
agagcgtctc	ccttgctcgc	aagaccacc	ccgggggtca	gaataagcca	gtcctcagag	4800
tcgcccttag	gtcggttctg	ggcaatgaag	ccaaccacaa	actcggggtc	ggatcgggca	4860
agctcaatgg	tctgcttgga	gtactcgcca	gtggccagag	agcccttgca	agacagctcg	4920
gccagcatga	gcagacctct	ggccagcttc	tcgttgggag	aggggactag	gaactccttg	4980
tactgggagt	tctcgtagtc	agagacgtcc	tccttcttct	gttcagagac	agtttcctcg	5040
gcaccagctc	gcaggccagc	aatgattccg	gttcggggta	caccgtgggc	gttggtgata	5100
tcggaccact	cggcgattcg	gtgacaccgg	tactggtgct	tgacagtgtt	gccaatatct	5160
gcgaactttc	tgtcctcgaa	caggaagaaa	ccgtgcttaa	gagcaagttc	cttgaggggg	5220
agcacagtgc	cggcgtaggt	gaagtcgtca	atgatgtcga	tatgggtttt	gatcatgcac	5280
acataaggtc	cgaccttata	ggcaagctca	atgagctcct	tgggtggtggt	aacatccaga	5340
gaagcacaca	ggttggtttt	cttggctgcc	acgagcttga	gcactcgagc	ggcaaaggcg	5400
gacttggtga	cgtagctcg	agcttcgtag	gagggcattt	tgggtggtgaa	gaggagactg	5460
aaataaattt	agtctgcaga	actttttata	ggaaccttat	ctggggcagt	gaagtatatg	5520
ttatggtaat	agttacgagt	tagttgaact	tatagataga	ctggactata	cggctatcgg	5580
tccaaattag	aaagaacgtc	aatggctctc	tgggcgtcgc	ctttgccgac	aaaaatgtga	5640
tcatgatgaa	agccagcaat	gacgttgacg	ctgatattgt	tgtcgcccaa	ccgcgccgaa	5700
aacgcagctg	tcagaccac	agcctccaac	gaagaatgta	tcgtcaaagt	gatccaagca	5760
cactcatagt	tggagtcgta	ctccaaaggc	ggcaatgacg	agtcagacag	atactcgtcg	5820
actcaggcga	cgacggaatt	cctgcagccc	atctgcagaa	ttcaggagag	accgggttgg	5880

cggcgtatatt gtgtcccaaa aaacagcccc aattgcccga attgacccca aattgaccca 5940
 gtageggggc caaccccggc gagagcccc ttcacccac atatcaaacc tcccccggtt 6000
 cccacacttg ccgttaaggc cgtagggtac tgcagtctgg aatctacgt tgttcagact 6060
 ttgtactagt ttctttgtct ggccatccgg gtaacccatg ccggacgcaa aatagactac 6120
 tgaaaatttt tttgctttgt ggttgggact ttagccaagg gtataaaaga ccaccgtccc 6180
 cgaattacct ttctcttct tttctctctc tccttgtcaa ctcacaccgc aaatcggtta 6240
 gcatttcctt ctgagtataa gaatcattca ccatggatcc actagttcta gagcgggcgc 6300
 caccgcggcc cgagattccg gcctcttcgg ccgccaagcg acccggttg acgtctagag 6360
 gtacctagca attaacagat agtttgccgg tgataattct cttaacctcc cacactcctt 6420
 tgacataacg atttatgtaa cgaaactgaa atttgaccag atattgtgtc cgc 6473

<210> 70

<211> 6970

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pY5-22GPD

<400> 70

tcgacgcagt aggatgtcct gcacgggtct ttttgtgggg tgtggagaaa ggggtgcttg 60
 gagatggaag ccggtagaac cgggtgctt gtgcttgag atggaagccg gtagaacggg 120
 gctgcttggg gggatttggg gccgctgggc tccaaagagg ggtaggcatt tcgttggggg 180
 tacgtaattg cggcatttgg gtcttgccgc catgtcccat tggtcagaat tagtccggat 240
 aggagactta tcagccaatc acagcgccgg atccacctgt aggttgggtt ggggtgggagc 300
 acccctccac agagtagagt caaacagcag cagcaacatg atagttgggg gtgtgctgt 360
 taaaggaaaa aaaagaagct tgggttatat tcccgctcta tttagagggt gcgggataga 420
 cgccgacgga gggcaatggc gccatggaac cttgcggata tcgatacgcc gcggcgact 480
 gcgtccgaac cagctccagc agcgtttttt ccgggccatt gagccgactg cgaccccgcc 540
 aacgtgtctt ggccacgca ctcatgtcat gttggtgttg ggaggccact ttttaagtag 600
 cacaaggcac ctgctcgca gcaagggtgc cgaaccaaag aagcggctgc agtgggtgaa 660
 acggggcgga aacggcgga aaaagccacg ggggcacgaa ttgaggcacg ccctcgaatt 720
 tgagacgagt cagggcccca ttcgcccgcg caatggctcg ccaacgcccg gtcttttgca 780
 ccacatcagg ttaccccaag ccaaaccttt gtgttaaaaa gcttaacata ttataccgaa 840
 cgtaggtttg ggcgggcttg ctccgtctgt ccaaggcaac atttatataa gggctctgat 900
 cgccggctca attgaatctt tttctctctt ctcttctcta tattcattct tgaattaaac 960

acacatcaat	ccgcggccgc	caccgcggcc	cgagattccg	gcctcttcgg	ccgccaaagcg	1020
acccgggtgg	acgtctagag	gtacctagca	attaacagat	agtttgccgg	tgataattct	1080
cttaacctcc	cacactcctt	tgacataacg	atttatgtaa	cgaaactgaa	atttgaccag	1140
atattgtgtc	cgcggtggag	ctccagcttt	tggtcccttt	agtgagggtt	aatttcgagc	1200
ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	1260
cacaacgtac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaattg	agtgagctaa	1320
ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	1380
ctgcattaat	gaatcggcc	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgatttgg	gcgctcttcc	1440
gcttcctcgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcgcgagc	ggtatcagct	1500
cactcaaagg	cggtaatagc	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	1560
tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaaag	ccgcgttgct	ggcgtttttc	1620
cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	1680
aaccgcagag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	1740
cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgctg	1800
gcgctttctc	atagctcacg	ctgtagggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	1860
ctgggctgtg	tgacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttata	cggtaaactat	1920
cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	1980
aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	2040
tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggg	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	2100
ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	2160
tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	2220
ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	2280
agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	2340
atctaaagta	tatatgagta	aacttggtct	gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	2400
cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	cgtcgtgtag	2460
ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	2520
ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	2580
agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	2640
agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	2700
gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	2760

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg tcctccgac	2820
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat	2880
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag	2940
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctcct gcccggcgtc aatacgggat	3000
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg	3060
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca	3120
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga	3180
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc	3240
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata	3300
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3360
ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc	3420
gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg ccgctcctt tcgctttctt cccttccttt	3480
ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc	3540
cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt	3600
agtgggccat cgccctgata gacgggtttt cgccctttga cgttgagtc cacgttcttt	3660
aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggc ctattctttt	3720
gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa	3780
aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgcttaca tttccattcg ccattcaggc	3840
tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggac gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	3900
aaggggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3960
gttgtaaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg	4020
ggccccccct cgaggtcgat ggtgtcgata agcttgatat cgaattcatg tcacacaaac	4080
cgatcttcgc ctcaaggaaa cctaattcta catccgagag actgccgaga tccagtctac	4140
actgattaat tttcgggcca ataatttaaa aaaatcgtgt tatataatat tatatgtatt	4200
atatatatac atcatgatga tactgacagt catgtcccat tgctaaatag acagactcca	4260
tctgccgcct ccaactgatg ttctcaatat ttaaggggtc atctcgcatt gtttaataat	4320
aaacagactc catctaccgc ctccaaatga tgttctcaaa atatattgta tgaacttatt	4380
tttattactt agtattatta gacaacttac ttgctttatg aaaaacactt cctatttagg	4440
aaacaattta taatggcagt tcgttcattt aacaatttat gtagaataaa tgttataaat	4500
gcgtatggga aatcttaaat atggatagca taaatgatat ctgcattgcc taattcgaaa	4560
tcaacagcaa cgaaaaaaat cccttgtaac acataaatag tcatcgagaa atatcaacta	4620

tcaaagaaca gctattcaca cgttactatt gagattatta ttggacgaga atcacacact	4680
caactgtctt tctctcttct agaaatacag gtacaagtat gtactattct cattgttcat	4740
acttctagtc atttcatccc acatattcct tggatttctc tccaatgaat gacattctat	4800
cttgcaaatt caacaattat aataagatat accaaagtag cggatatagt gcaatcaaaa	4860
agcttctctg gtgtgcttct cgtatttatt tttattctaa tgatccatta aagggtatata	4920
tttatttctt gttatataat ccttttggtt attacatggg ctggatacat aaagggtattt	4980
tgatttaatt ttttgcttaa attcaatccc cctcgttca gtgtcaactg taatggtagg	5040
aaattaccat acttttgaag aagcaaaaaa aatgaaagaa aaaaaaatc gtatttccag	5100
gttagacgtt ccgcagaatc tagaatgcgg tatgcggtac attgttcttc gaacgtaaaa	5160
gttgcgctcc ctgagatatt gtacattttt gcttttacia gtacaagtac atcgtacaa	5220
tatgtactac tgttgatgca tccacaacag tttgttttgt ttttttttgt ttttttttt	5280
tctaagtatt cattaccgct atgtatacct acttgtactt gtagtaagcc gggttattgg	5340
cgttcaatta atcatagact tatgaatctg cagcgtgtgc gctgcgagtt acttttagct	5400
tatgcatgct acttgggtgt aatattggga tctgttcgga aatcaacgga tgetcaaccg	5460
atttcgacag taattaatta agtcatacac aagtcagctt tcttcgagcc tcatataagt	5520
ataagtagtt caacgtatta gcaactgtacc cagcatctcc gtatcgagaa acacaacaac	5580
atgccccatt ggacagatca tgcggataca caggttgtgc agtatcatac atactcgatc	5640
agacaggtcg tctgaccatc atacaagctg aacaagcgt ccataactgc acgctctcta	5700
tatacacagt taaattacat atccatagtc taacctctaa cagttaatct tctggtaagc	5760
ctcccagcca gccttctggt atcgcttggc ctctcaata ggatctcggg tctggccgta	5820
cagacctcgg ccgacaatta tgatatccgt tccggtagac atgacatcct caacagttcg	5880
gtactgctgt ccgagagcgt ctccctgtc gtcaagaccc accccggggg tcagaataag	5940
ccagtcctca gagtcgccct taggtcgggt ctgggcaatg aagccaacca caaactcggg	6000
gtcggatcgg gcaagctcaa tgggtctgctt ggagtactcg ccagtggcca gagagccctt	6060
gcaagacagc tcggccagca tgagcagacc tctggccagc ttctcgttgg gagaggggac	6120
taggaactcc ttgtactggg agttctcgta gtcagagacg tcctccttct tctgttcaga	6180
gacagtttcc tcggcaccag ctgcgaggcc agcaatgatt ccggttcggg gtacaccgtg	6240
ggcgttggtg atatcggacc actcggcgat tcggtgacac cggtagtggg gcttgacagt	6300
gttgccaata tctgcgaact ttctgtcttc gaacaggaag aaaccgtgct taagagcaag	6360
ttccttgagg gggagcacag tgccggcgta ggtgaagtcg tcaatgatgt cgatatgggt	6420

tttgatcatg cacacataag gtccgacctt atcggcaagc tcaatgagct ccttgggtgg 6480
 ggtaacatcc agagaagcac acagggttgg tttcttggct gccacgagct tgagcactcg 6540
 agcggcaaaag gcggacttgt ggacgttagc tcgagcttcg taggagggca ttttgggtgg 6600
 gaagaggaga ctgaaataaa tttagtctgc agaacttttt atcgggaacct tatctggggc 6660
 agtgaagtat atgttatggg aatagttacg agttagttag acttatagat agactggact 6720
 atacggctat cgggtccaaat tagaaagaac gtcaatggct ctctgggctg cgcctttgcc 6780
 gacaaaaatg tgatcatgat gaaagccagc aatgacgttg cagctgatat tgttgcggc 6840
 caaccgcgcc gaaaacgcag ctgtcagacc cacagcctcc aacgaagaat gtatcgtcaa 6900
 agtgatccaa gcacactcat agttggagtc gtactccaaa ggcggcaatg acgagtcaga 6960
 cagatactcg 6970

<210> 71

<211> 968

<212> ADN

5 <213> *Yarrowia lipolytica*

<300>

<302> PROMOTORES DE GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA Y FOSFOGLICERATO MUTASA PARA LA EXPRESIÓN DE GENES EN LEVADURAS OLEAGINOSAS

<310> documento US-2005-0014270-AI

10 <311> 16-06-2004

<312> 20-01-2005

<313> (1) .. (968)

<400> 71

tcgacgcagt aggatgtcct gcacgggtct ttttgtgggg tgtggagaaa ggggtgcttg 60
 gagatggaag ccggtagaac cgggctgctt gtgcttgag atggaagccg gtagaaccgg 120
 gctgcttggg gggatttggg gccgctgggc tccaaagagg ggtaggcatt tcgttggggg 180
 tacgtaattg cggcatttgg gtccctgcgcg catgtcccat tggtcagaat tagtccggat 240
 aggagactta tcagccaatc acagcgccgg atccacctgt aggttgggtt ggggtgggagc 300
 acccctccac agagtagagt caaacagcag cagcaacatg atagttgggg gtgtgcgtgt 360
 taaaggaaaa aaaagaagct tgggttatat tcccgctcta tttagagggt gcgggataga 420
 cgccgacgga gggcaatggc gccatggaac cttgcggata tcgatacgcc gcggcggact 480
 gcgtccgaac cagctccagc agcgtttttt ccgggccatt gagccgactg cgaccccgcc 540
 aacgtgtctt ggcccacgca ctcatgtcat gttggtgttg ggaggccact ttttaagtag 600
 cacaaggcac ctagctcgca gcaaggtgtc cgaaccaaag aagcggctgc agtggtgcaa 660
 acggggcgga aacggcggga aaaagccacg ggggcacgaa ttgaggcacg ccctcgaatt 720
 tgagacgagt cacggcccca ttgcggcgcg caatggctcg ccaacgcccg gtcttttgca 780

ccacatcagg ttaccccaag ccaaaccctt gtgttaaaaa gcttaacata ttataccgaa 840
 cgtaggtttg ggcgggcttg ctccgtctgt ccaaggcaac atttatataa gggctctgcat 900
 cgccggctca attgaatctt ttttcttctt ctcttctcta tattcattct tgaattaaac 960
 acacatca 968

<210> 72

<211> 8630

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pYZDE2-S

<400> 72

ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat 60
 ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacgtacgag 120
 ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaagtgtg gagctaactc acattaattg 180
 cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa 240
 tcggccaacg cgcgggggaga ggcggtttgc gtattgggag ctcttccgct tctcgcgtca 300
 ctgactcgct gcgctcggtc gttcggtgtc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg 360
 taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 420
 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggcgg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc 480
 cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 540
 tataaagata ccaggcggtt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc 600
 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg cttctcata 660
 gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc 720
 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 780
 acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 840
 cgagggtatgt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta 900
 gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 960
 gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc 1020
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt 1080
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 1140
 ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 1200
 atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 1260
 tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 1320

gggagggcctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 1380
 ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg 1440
 caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt 1500
 cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct 1560
 cgtcgttttg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 1620
 ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 1680
 agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca 1740
 tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 1800
 agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 1860
 atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 1920
 ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt 1980
 cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 2040
 caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 2100
 attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 2160
 agaaaaataa acaaataagg gttccgcgca catttcccg aaaagtgcc cctgacgcgc 2220
 cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 2280
 ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg 2340
 ccggctttcc cgtcaagct ctaaatcggg ggctccctt agggttccga tttagtgtt 2400
 tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt agggtagtg ttcacgtagt gggccatcgc 2460
 cctgatagac ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 2520
 tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggctca ttcttttgat ttataaggga 2580
 ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 2640
 attttaacaa aatattaacg cttaaatctt ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 2700
 ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc 2760
 tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaaacgac 2820
 ggccagtga tttgtaatac actcactata gggcgaattg ggtaccgggc cccccctcga 2880
 ggtcgatggt gtcgataagc ttgatatcga attcatgtca cacaaaccga tcttcgcctc 2940
 aaggaaacct aattctacat ccgagagact gccgagatcc agtctacact gattaatttt 3000
 cgggccaata atttaaaaaa atcgtgttat ataattatt atgtattata tatatacatc 3060
 atgatgatac tgacagtcac gtcccattgc taaatagaca gactccatct gccgcctcca 3120

actgatgttc tcaatattta aggggtcatc tcgcattgtt taataataaa cagactccat	3180
ctaccgcctc caaatgatgt tctcaaaata tattgtatga acttattttt attacttagt	3240
attattagac aacttacttg ctttatgaaa aacacttcct atttaggaaa caatttataa	3300
tggcagttcg ttcatttaac aatttatgta gaataaatgt tataaatgcy tatgggaaat	3360
cttaaatatg gatagcataa atgatatctg cattgcctaa ttcgaaatca acagcaacga	3420
aaaaaatccc ttgtacaaca taaatagtca tcgagaaata tcaactatca aagaacagct	3480
attcacacgt tactattgag attattattg gacgagaatc acacactcaa ctgtctttct	3540
ctcttctaga aatacaggta caagtatgta ctattctcat tgttcatact tctagtcatt	3600
tcaccccaca tttccttgg atttctctcc aatgaatgac attctatctt gcaaattcaa	3660
caattataat aagatatacc aaagtagcgg tatagtggca atcaaaaagc ttctctggtg	3720
tgcttctcgt atttattttt attctaataga tccattaaag gtatatattt atttcttggt	3780
atataatcct tttgtttatt acatgggctg gatacataaa ggtattttga ttttaattttt	3840
tgcttaaatt caatcccccc tcgttcagtg tcaactgtaa tggtaggaaa ttaccatact	3900
tttgaagaag caaaaaaat gaaagaaaaa aaaaatcgta tttccagggt agacgttccg	3960
cagaatctag aatgcggtat gcggtacatt gttcttcgaa cgtaaaagtt gcgctccctg	4020
agatatgtga catTTTTgct tttacaagta caagtacatc gtacaactat gtactactgt	4080
tgatgcatcc acaacagttt gttttgtttt tttttgtttt ttttttttct aatgattcat	4140
taccgctatg tatacctact tgtacttgta gtaagccggg ttattggcgt tcaattaatc	4200
atagacttat gaatctgcac ggtgtgcgct gcgagttact tttagcttat gcatgctact	4260
tgggtgtaat attgggatct gttcggaaat caacggatgc tcaaccgatt tcgacagtaa	4320
taatttgaat cgaatcggag cctaaaatga acccgagtat atctcataaa attctcgggtg	4380
agaggctctgt gactgtcagt acaagggtcc ttcattatgc cctcaacctt accatacctc	4440
actgaatgta gtgtacctct aaaaatgaaa tacagtgcca aaagccaagg cactgagctc	4500
gtctaacgga cttgatatac aaccaattaa aacaaatgaa aagaaatata gttctttgta	4560
tcatttgtaa caattaccct gtacaaacta aggtattgaa atcccacaat attcccaaag	4620
tccacccctt tccaaattgt catgcctaca actcatatac caagcactaa cctaccaaac	4680
accactaaaa cccacacaaa tatatcttac cgaatatata gtaacaagct accaccacac	4740
tcgttgggtg cagtcgccag cttaaagata tctatccaca tcagccacaa ctcccttcct	4800
ttaataaacc gactacaccc ttggctattg aggttatgag tgaatatact gtagacaaga	4860
cactttcaag aagactgttt caaaaacgta ccactgtcct ccactacaaa cacaccaat	4920
ctgcttcttc tagtcaaggt tgctacaccg gtaaattata aatcatcatt tcattagcag	4980

ggcagggccc	ttttataga	gtcttataca	ctagcggacc	ctgccggtag	accaaccgcg	5040
aggcgcgta	gtttgctcct	tccatcaatg	cgtcgtagaa	acgacttact	ccttcttgag	5100
cagctccttg	accttggttg	caacaagtct	ccgacctcgg	aggtggagga	agagcctccg	5160
atatcggcg	tagtgatacc	agcctcgacg	gactccttga	cggcagcctc	aacagcgta	5220
ccggcgggct	tcatgttaag	agagaacttg	agcatcatgg	cggcagacag	aatggtggca	5280
atgggggtga	ccttctgctt	gccgagatcg	ggggcagatc	cgtgacaggg	ctcgtacaga	5340
ccgaacgcct	cgttggtgtc	gggcagagaa	gccagagagg	cggaaggcag	cagaccaga	5400
gaaccgggga	tgacggaggc	ctcgtcggag	atgatatcgc	caaacatggt	ggtggtgatg	5460
atgataccat	tcatcttgga	gggctgcttg	atgaggatca	tggcggccga	gtcgatcagc	5520
tgggtggtga	gctcgagctg	ggggaattcg	tccttgagga	ctcgagtga	agtctttcgc	5580
caaagtcgag	aggaggccag	cacgttgggc	ttgtcaagag	accacacggg	aagagggggg	5640
ttgtgctgaa	gggccaggaa	ggcggccatt	cgggcaattc	gctcaacctc	aggaacggag	5700
taggtctcgg	tgctggaagc	gacgccagat	ccgtcatcct	cctttcgcgc	tccaaagtag	5760
atacctccga	cgagctctcg	gacaatgatg	aagtcggtgc	cctcaacggt	tcggatgggg	5820
gagagatcgg	cgagcttggt	cgacagcagc	tggcagggtc	gcaggttggc	gtacaggttc	5880
aggctccttc	gcagcttgag	gagaccctgc	tcgggtcgca	cgtcggttcg	tccgtcggga	5940
gtggtccata	cggtgttggt	agcgctccg	acagcaccga	gcataataga	gtcagccttt	6000
cggcagatgt	cgagagtagc	gtcgggtgatg	ggctcgccct	ccttctcaat	ggcagctcct	6060
ccaatgagtc	ggctcctcaa	cacaaactcg	gtgccggagg	cctcagcaac	agacttgagc	6120
accttgacgg	cctcggcaat	cacctcgggg	ccacagaagt	cgccgccgag	aagaacaatc	6180
ttcttgaggt	cagtcttggt	cttcttagtt	tcgggttcca	ttgtggatgt	gtgtggttgt	6240
atgtgtgatg	tgggtgtgtg	agtgaaaatc	tgtggctggc	aaacgctctt	gtatatatac	6300
gcacttttgc	ccgtgctatg	tggaaagacta	aacctccgaa	gattgtgact	caggtagtgc	6360
ggtatcggct	agggacccaa	accttgctga	tgccgatagc	gctatcgaac	gtaccccagc	6420
cggccgggag	tatgtcggag	gggacatacg	agatcgtaaa	gggtttgtgg	ccaactggta	6480
aatttaaata	atgtcgacgc	agtaggatgt	cctgcacggg	tctttttgtg	gggtgtggag	6540
aaaggggtgc	ttggagatgg	aagccggtag	aaccgggctg	cttgtgcttg	gagatggaag	6600
ccggtagaac	cggtgctt	ggggggattt	ggggccgctg	ggctccaaag	aggggtaggc	6660
atttcgttgg	ggttacgtaa	ttgcggcatt	tgggtcctgc	gcgcagtgtc	cattgggtcag	6720
aattagtcg	gataggagac	ttatcagcca	atcacagcgc	cggatccacc	tgtaggttgg	6780

gttgggtggg agcaccctc cacagagtag agtcaaacag cagcagcaac atgatagttg	6840
ggggtgtgcg tgttaaagga aaaaaaagaa gcttgggtta tattcccgt ctatttagag	6900
gttgcgggat agacgccgac ggagggcaat ggcgccatgg aaccttgcg atatcgatac	6960
gccgcggcgg actgctccg aaccagctcc agcagcgttt tttccgggcc attgagccga	7020
ctgcgacccc gccaacgtgt cttggcccac gcactcatgt catgttggtg ttgggaggcc	7080
actttttaag tagcacaagg cacctagctc gcagcaaggt gtccgaacca aagaagcggc	7140
tgcagtgtg caaacggggc ggaaacggcg ggaaaaagcc acgggggcac gaattgaggc	7200
acgcctcga atttgagacg agtcacggcc ccattcgccc gcgcaatggc tcgccaacgc	7260
ccggtctttt gcaccatc aggttaccac aagccaaacc tttgtgttaa aaagcttaac	7320
atattatacc gaacgtaggt ttgggcgggc ttgctccgtc tgtccaaggc aacatttata	7380
taagggtctg catcgccggc tcaattgaat cttttttctt cttctcttct ctatattcat	7440
tcttgaatta aacacacatc aatccatggc aaacagcagc gtgtgggatg atgtggtggg	7500
ccgcgtggag accggcgtgg accagtggat ggatggcgcc aagccgtacg cactcaccga	7560
tgggctcccg atgatggacg tgtccacat gctggcattc gaggtgggat acatggccat	7620
gctgctcttc ggcacccga tcatgaagca gatggagaag ccttttgagc tcaagaccat	7680
caagctcttg cacaacttgt ttctcttcgg actttccttg tacatgtgcg tggagaccat	7740
ccgccaggct atcctcgag gctacaaagt gtttggaac gacatggaga agggcaacga	7800
gtctcatgct caggcatgt ctgcacgt gtacgtgttc tacgtgtcca aggcatacga	7860
gttcttgat accgccatca tgatccttg caagaagttc aaccaggttt ccttcttgca	7920
tgtgtaccac catgccactc atttttgcca tctgggtggc tatccgcaa gtacgtcca	7980
ggaggtgat cgtactttt cagtgatcct caactcttgc gtgcacaccg tcatgtacgg	8040
catactactt cttctctcc caagggttcg ggttcgtgaa gccaatcaag ccgtacatca	8100
ccacccttca gatgaccag ttcatggcaa tgcttgtgca gtccttgtac gactacctct	8160
tcccatgca ctaccacag gctcttgtgc agctccttg agtgtacatg atcaccttgc	8220
ttgcctctt cggcaacttt tttgtgcaga gctatcttaa aaagccaaa aagagcaaga	8280
ccaactaaaa ctgcctgcat gatatgccg tcgccggcgt tcgaattgac tcagaaagcg	8340
agttaaggcg acacgcaaac tctatatatt ttcaaactgt ttgccgtcac tcattcgcca	8400
tctgtttact acgtgtctgt tcaatgagca tgttcttgaa tctaaagaat ctcgaatgtt	8460
ttttaaaaa agaattcgat atcaagctta cgcgtcgacc cgggtggacg tctagaggta	8520
cctagcaatt aacagatagt ttgccggtga taattctctt aacctccac actccttga	8580
cataacgatt tatgtaacga aactgaaatt tgaccagata ttgtgtccgc	8630

<210> 73

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador GPDsense
 <400> 73
 atacgagatc gtcaaggg 18
 <210> 74
 5 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador GPDantisense
 10 <400> 74
 gcggccgcgg attgatgtgt gtttaa 26
 <210> 75
 <211> 6339
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Plásmido pKR136
 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (4078) .. (4078)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 75
 ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aaatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
 taaataaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
 ttctttctcg ttatcttttg ccactttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
 ttgttttacgg ctcatatat cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 240
 aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 300
 tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 360
 taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt 420
 aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttcct 480
 cgctcactga ctgctgccc tcggtcggtc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa 540
 aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 600

aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcggtt ttccatagge	660
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgga	720
caggactata aagataaccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc	780
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt	840
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct	900
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg	960
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	1020
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct	1080
acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa	1140
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt	1200
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta	1260
cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat	1320
caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa	1380
gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct	1440
cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgtcgtg tagataacta	1500
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct	1560
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg	1620
gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa	1680
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt	1740
cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta	1800
catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtea	1860
gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta	1920
ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct	1980
gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg	2040
cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac	2100
tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact	2160
gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa	2220
atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt	2280
ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat	2340
gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg	2400
acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc	2460

cctttcgtct cgcgcggttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg	2520
agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcggt	2580
cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac	2640
tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca	2700
tcaggcgcca ttcgccattc aggtgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct	2760
cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa	2820
cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattc gagctcggta	2880
cccggggatc ctctagacgt acgtcctcga agagaagggt taataacaca ttttttaaca	2940
tttttaacac aaattttagt tatttaaaaa ttattaaaaa aatttaaaat aagaagagga	3000
actctttaa taaatctaac ttacaaaatt tatgattttt aataagtttt caccaataaa	3060
aaatgtcata aaaatatgtt aaaaagtata ttatcaatat tctctttatg ataaataaaa	3120
agaaaaaaaa aataaaaagt aagtgaaaat gagattgaag tgactttagg tgtgtataaa	3180
tatatcaacc ccgccaacaa ttattttaat ccaaataatat tgaagtatat tattccatag	3240
cctttattta ttatatatt tattatataa aagctttatt tgttctagggt tgttcatgaa	3300
atattttttt ggttttatct ccgttgtaaag aaaatcatgt gctttgtgtc gccactcact	3360
attgcagctt tttcatgcat tggtcagatt gacggttgat tgtatttttg ttttttatgg	3420
ttttgtgtta tgacttaagt cttcatctct ttatctcttc atcagggttg atggttacct	3480
aatatgggcc atgggtacat gcatgggtta attaggtggc caactttggt gtgaacgata	3540
gaattttttt tatattaagt aaactatttt tatattatga aataataata aaaaaaatat	3600
tttatcatta ttaacaaaat catattagtt aatttggtta ctctataata aaagaaatac	3660
tgtaacattc acattacatg gtaacatctt tccacccttt catttgtttt ttgtttgatg	3720
actttttttc ttgtttaaat ttatttcctt tcttttaaat ttggaataca ttatcatcat	3780
atataaacta aaataactaaa aacaggatta cacaaatgat aaataataac acaaataatt	3840
ataaatctag ctgcaatata tttaaactag ctatatcgat attgtaaaat aaaactagct	3900
gcattgatac tgataaaaaa atatcatgtg ctttctggac tgatgatgca gtatactttt	3960
gacattgcct ttattttatt tttcagaaaa gctttcttag ttctgggttc ttcattattt	4020
gtttcccatc tccattgtga attgaatcat ttgcttcgtg tcacaaatac aatttagnta	4080
ggtacatgca ttggtcagat tcacggttta ttatgtcatg acttaagttc atggtagtac	4140
attacctgcc acgcatgcat tatattgggt agatttgata ggcaaatttg gttgtcaaca	4200
atataaatat aaataatggt ttatatattac gaaataacag tgatcaaaac aaacagtttt	4260

atctttatta	acaagatfff	gtttttgttt	gatgacgttt	tttaatgttt	acgctttccc	4320
ccttcttttg	aatttagaac	actttatcat	cataaaatca	aatactaaaa	aaattacata	4380
tttcataaat	aataacacaa	atatttttaa	aaaatctgaa	ataataatga	acaatattac	4440
atattatcac	gaaaattcat	taataaaaaat	attatataaa	taaaatgtaa	tagtagttat	4500
atgtaggaaa	aaagtactgc	acgcataata	tatacaaaaa	gattaaaatg	aactattata	4560
aataataaca	ctaaattaat	ggtgaatcat	atcaaaaata	tgaaaaagta	aataaaaattt	4620
gtaattaact	tctatatgta	ttacacacac	aaataataaa	taatagtaaa	aaaaattatg	4680
ataaatatft	accatctcat	aagatattta	aaataatgat	aaaaatatag	attatttttt	4740
atgcaactag	ctagccaaaa	agagaacacg	ggtatatata	aaaagagtac	ctttaaattc	4800
tactgtactt	cctttattcc	tgacgttttt	atatcaagtg	gacatacgtg	aagattttta	4860
ttatcagtct	aaatatttca	ttagcactta	atacttttct	gttttattcc	tatcctataa	4920
gtagtccgga	ttctcccaac	attgcttatt	cacacaacta	actaagaaag	tcttccatag	4980
ccccccaagc	ggcgcgatgg	gaacggacca	aggaaaaacc	ttcacctggg	aagagctggc	5040
ggcccataac	accaaggacg	acctactctt	ggccatccgc	ggcagggtgt	acgatgtcac	5100
aaagtctctg	agccgccatc	ctgggtggagt	ggacactctc	ctgctcggag	ctggccgaga	5160
tgttactccg	gtctttgaga	tgtatcacgc	gtttggggct	gcagatgcca	ttatgaagaa	5220
gtactatgtc	ggtacactgg	tctcgaatga	gctgcccatc	ttcccggagc	caacgggtgtt	5280
ccacaaaacc	atcaagacga	gagtcgaggg	ctactttacg	gatcggaaca	ttgatcccaa	5340
gaatagacca	gagatctggg	gacgatacgc	tcttatcttt	ggatccttga	tcgcttccta	5400
ctacgcgcag	ctctttgtgc	ctttcgttgt	cgaacgcaca	tggtttcagg	tggtgtttgc	5460
aatcatcatg	ggatttgctg	gcgcacaagt	cggactcaac	cctcttcatg	atgcgtctca	5520
cttttcagtg	accacaaacc	ccactgtctg	gaagattctg	ggagccacgc	acgacttttt	5580
caacggagca	tcgtacctgg	tgtggatgta	ccaacatatg	ctcggccatc	accctacac	5640
caacattgct	ggagcagatc	ccgacgtgtc	gacgtctgag	cccgatgttc	gtcgtatcaa	5700
gcccaccaa	aagtggtttg	tcaaccacat	caaccagcac	atgtttgttc	ctttcctgta	5760
cggactgctg	gcgttcaagg	tgcgatttca	ggacatcaac	atgttgact	ttgtcaagac	5820
caatgacgct	attcgtgtca	atcccatctc	gacatggcac	actgtgatgt	tctggggcgg	5880
caaggctttc	tttgtctggt	atcgctgat	tgttcccttg	cagtatctgc	ccctgggcaa	5940
ggtgctgctc	ttgttcacgg	tcgcgacat	ggtgtcgtct	tactggctgg	cgctgacctt	6000
ccaggcgaac	cacgttggtg	aggaagttca	gtggccgttg	cctgacgaga	acgggatcat	6060
ccaaaaggac	tgggcagcta	tgagggtcga	gactacgcag	gattacgcac	acgattcgca	6120

cctctggacc agcatcactg gcagcttgaa ctaccaggct gtgcaccatc tgttccccaa 6180
 cgtgtcgcag caccattatc ccgatattct ggccatcatc aagaacacct gcagcgagta 6240
 caaggttcca taccttgtca aggatacgtt ttggcaagca tttgcttcac atttgagca 6300
 cttgcgtggt cttggactcc gtccaagga agagtaggc 6339

<210> 76

<211> 8319

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pY98

<400> 76

ggcgcgcacc ggcgcccag attccggcct cttcgccgc caagcgaccc ggggtggacgt 60
 ctagaggtac ctagcaatta acagatagtt tgccggtgat aattctctta acctcccaca 120
 ctcttttgac ataacgattt atgtaacgaa actgaaattt gaccagatat tgtgtccgcg 180
 gtggagctcc agcttttgtt cccttttagtg aggggttaatt tcgagcttgg cgtaatcatg 240
 gtcatactg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acgtacgagc 300
 cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc 360
 gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaataaat 420
 cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgctcac 480
 tgactcgctg cgctcggtcg ttcgggtgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt 540
 aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 600
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggcgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 660
 ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 720
 ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcggt cgctctcctg ttccgaccct 780
 gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 840
 ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 900
 cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 960
 cccggttaaga cagcacttat cgcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 1020
 gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 1080
 aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 1140
 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg gggttttttg tttgcaagca 1200
 gcagattacg cgcagaaaaa aagatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc 1260

tgacgctcag	tggaacgaaa	actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	tatcaaaaag	1320
gatcttcacc	tagatccttt	taaattaaaa	atgaagtttt	aatcaatct	aaagtatata	1380
tgagtaaact	tggctcgaca	gttaccaatg	cttaatcagt	gaggcaccta	tctcagcgat	1440
ctgtctatatt	cgttcaccca	tagttgctg	actccccgtc	gtgtagataa	ctacgatacg	1500
ggagggctta	ccatctggcc	ccagtgtctg	aatgataccg	cgagaccac	gctcaccggc	1560
tccagattta	tcagcaataa	accagccagc	cggaagggcc	gagcgagaa	gtggctcctg	1620
aactttatcc	gcctccatcc	agtctattaa	ttgttgccgg	gaagctagag	taagtagttc	1680
gccagttaat	agtttgcgca	acgttggtgc	cattgctaca	ggcatcgtg	tgtcacgctc	1740
gtcgtttggt	atggcttcat	tcagctccgg	ttcccaacga	tcaaggcgag	ttacatgac	1800
ccccatgttg	tgcaaaaaag	cggttagctc	cttcggctct	ccgatcgttg	tcagaagtaa	1860
gttgggcgca	gtgttatcac	tcattggtat	ggcagcactg	cataattctc	ttactgtcat	1920
gccatccgta	agatgctttt	ctgtgactgg	tgagtactca	accaagtcac	tctgagaata	1980
gtgtatgcgg	cgaccgagtt	gctcttgccc	ggcgtcaata	cgggataata	ccgcgccaca	2040
tagcagaact	ttaaaagtgc	tcatcattgg	aaaacgttct	tcggggcgaa	aactctcaag	2100
gatcttaccg	ctgttgagat	ccagttcgat	gtaaccact	cgtgcacca	actgatcttc	2160
agcatctttt	actttcacca	gcgtttctgg	gtgagcaaaa	acaggaaggc	aaaatgccgc	2220
aaaaaagga	ataagggcga	cacggaaatg	ttgaatactc	atactcttcc	tttttcaata	2280
ttattgaagc	atttatcagg	gttattgtct	catgagcgga	tacatatttg	aatgtattta	2340
gaaaaataaa	caaatagggg	ttccgcgcac	atttccccga	aaagtgccac	ctgacgcgcc	2400
ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcgggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	ccgctacact	2460
tgccagcgcc	ctagcgcctg	ctcctttcgc	tttcttccct	tcctttctcg	ccacgttcgc	2520
cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gtccctttta	gggttccgat	ttagtgcttt	2580
acggcacctc	gaccccaaaa	aacttgatta	gggtgatggt	tcacgtagtg	ggccatcgcc	2640
ctgatagacg	gtttttcgcc	ctttgacgtt	ggagtccacg	ttctttaata	gtggactctt	2700
gttccaaact	ggaacaacac	tcaaccctat	ctcggctctat	tcttttgatt	tataagggat	2760
tttgccgatt	tcggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	taacaaaaat	ttaacgcgaa	2820
ttttaacaaa	atattaacgc	ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttg	2880
gaagggcgat	cggctcgggc	ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	2940
gcaaggggat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	3000
gccagtgaat	tgtaatacga	ctcactatag	ggcgaattgg	gtaccgggcc	ccccctcgag	3060
gtcgatgggt	tcgataagct	tgatatcgaa	ttcatgtcac	acaaaccgat	cttcgcctca	3120

aggaaaccta attctacatc cgagagactg ccgagatcca gtctacactg attaatTTTT	3180
gggccaataa tttaaaaaaa tcgtgttata taatattata tgtattatat atatacatca	3240
tgatgatact gacagtcatg tcccattgct aaatagacag actccatctg ccgcctccaa	3300
ctgatgttct caatatttaa ggggtcatct cgcattgttt aataataaac agactccatc	3360
taccgcctcc aaatgatgtt ctcaaaatat attgtatgaa cttattttta ttacttagta	3420
ttattagaca acttacttgc tttatgaaaa acacttctta tttaggaaac aatttataat	3480
ggcagttcgt tcatttaaca atttatgtag aataaatgtt ataaatgcgt atgggaaatc	3540
ttaaatatgg atagcataaa tgatatctgc attgcctaata tcgaaatcaa cagcaacgaa	3600
aaaaatccct tgtacaacat aaatagtcac cgagaaatat caactatcaa agaacagcta	3660
ttcacacgtt actattgaga ttattattgg acgagaatca cacactcaac tgtctttctc	3720
tcttctagaa atacaggtac aagtatgtac tattctcatt gttcatactt ctagtcattt	3780
cateccacat attccttggg tttctctcca atgaatgaca ttctatcttg caaattcaac	3840
aattataata agatatacca aagtagcggg atagtggcaa tcaaaaagct tctctgggtg	3900
gcttctcgta tttattttta ttctaataat ccattaaagg tatatattta tttcttggtta	3960
tataatcctt ttgtttatta catgggctgg atacataaag gtattttgat ttaatttttt	4020
gcttaaattc aatccccctt cgttcagtggt caactgtaat ggtaggaaat taccatactt	4080
ttgaagaagc aaaaaaaatg aaagaaaaaa aaaatcgat ttccagggtta gacgttccgc	4140
agaatctaga atgcgggtat cggtacattg ttcttcgaac gtaaaagttg cgctccctga	4200
gatattgtac atttttgctt ttacaagtac aagtacatcg tacaactatg tactactgtt	4260
gatgcatcca caacagtttg ttttgTTTT ttttgTTTT tttttttcta atgattcatt	4320
accgctatgt atacctactt gtacttgtag taagccgggt tattggcggt caattaatca	4380
tagacttatg aatctgcacg gtgtgcgctg cgagttactt ttagcttatg catgctactt	4440
gggtgtaata ttgggatctg ttcggaaatc aacggatgct caaccgattt cgacagtaat	4500
taattaagtc atacacaagt cagctttctt cgagcctcat ataagtataa gtagttcaac	4560
gtattagcac tgtaccagc atctccgtat cgagaaacac aacaacatgc cccattggac	4620
agatcatgcg gatacacagg ttgtgcagta tcatacatc tcgatcagac aggtcgtctg	4680
accatcatc aagctgaaca agcgtccat acttgcaagc tctctatata cacagttaaa	4740
ttacatatcc atagtctaac ctctaacagt taatcttctg gtaagcctcc cagccagcct	4800
tctggtatcg cttggcctcc tcaataggat ctcggttctg gccgtacaga cctcggccga	4860
caattatgat atccgttccg gtagacatga catcctcaac agttcggtac tgctgtccga	4920

gagcgtctcc cttgtcgtca agaccacccc cgggggtcag aataagccag tccctcagagt 4980
 cgcccttagg tcggttctgg gcaatgaagc caaccacaaa ctcgggggtcg gatcggggcaa 5040
 gctcaatggg ctgcttggag tactcgccag tggccagaga gcccttgcaa gacagctcgg 5100
 ccagcatgag cagacctctg gccagcttct cgttgggaga ggggactagg aactccttgt 5160
 actgggagtt ctcgtagtca gagacgtcct ccttcttctg ttcagagaca gtttcctcgg 5220
 caccagctcg caggccagca atgattccgg ttccgggtac accgtgggcg ttggtgatat 5280
 cggaccactc ggcgattcgg tgacaccggt actggtgctt gacagtgttg ccaatatctg 5340
 cgaactttct gtcctcgaac aggaagaaac cgtgcttaag agcaagttcc ttgaggggga 5400
 gcacagtgcc ggcgtaggtg aagtcgtcaa tgatgtcgat atgggttttg atcatgcaca 5460
 cataagggtcc gaccttatcg gcaagctcaa tgagctcctt ggtggtggta acatccagag 5520
 aagcacacag gttgggttttc ttggctgcca cgagcttgag cactcgagcg gcaaaggcgg 5580
 acttgtggac gttagctcga gcttcgtagg agggcatttt ggtggtgaag aggagactga 5640
 aataaattta gtctgcagaa ctttttatcg gaaccttacc tggggcagtg aagtatatgt 5700
 tatggtaata gttacgagtt agttgaactt atagatagac tggactatac ggctatcggg 5760
 ccaaattaga aagaacgtca atggctctct gggcgtcgcc ttgcccagaca aaaatgtgat 5820
 catgatgaaa gccagcaatg acgttgtagc tgatattggt gtcggccaac cgcgccgaaa 5880
 acgcagctgt cagaccaca gcctccaacg aagaatgtat cgtcaaagtg atccaagcac 5940
 actcatagtt ggagtcgtac tccaaaggcg gcaatgacga gtcagacaga tactcgtcga 6000
 cgcagtagga tgtcctgcac gggctctttt gtgggggtgtg gagaaagggg tgcttggaga 6060
 tggaagccgg tagaacggg ctgcttgtgc ttggagatgg aagccggtag aaccgggctg 6120
 cttgggggga tttggggccg ctgggctcca aagaggggta ggcatttcgt tggggttacg 6180
 taattgcggc atttgggtcc tgcgcgcatg tcccattggt cagaattagt ccggatagga 6240
 gacttatcag ccaatcacag cgccggatcc acctgtaggt tgggttgggt gggagcaccc 6300
 ctccacagag tagagtcaaa cagcagcagc aacatgatag ttgggggtgt gcgtgttaaa 6360
 ggaaaaaaa gaagcttggg ttatatccc gctctattta gaggttgagg gatagacgcc 6420
 gacggagggc aatggcgcca tggaaccttg cgatatcga tacgccggcg cggactgcgt 6480
 ccgaaccagc tccagcagcg tttttccgg gccattgagc cgactgcgac cccgccaacg 6540
 tgtcttggcc cacgcactca tgtcatgttg gtgttgggag gccacttttt aagtagcaca 6600
 aggcacctag ctgcgagcaa ggtgtccgaa ccaaagaagc ggctgcagtg gtgcaaacgg 6660
 ggcggaaacg gcgggaaaaa gccacggggg cacgaattga ggcacgccct cgaatttgag 6720
 acgagtcacg gcccattcg cccgcgcaat ggctcgcaa cggccggtct tttgcaccac 6780

atcagggttac cccaagccaa acctttgtgt taaaaagctt aacatattat accgaacgta 6840
 ggtttgggog ggcttgctcc gtctgtccaa ggcaacattt atataagggg ctgcatcgcc 6900
 ggctcaattg aatctttttt cttcttctct tctctatatt cattcttgaa ttaaacacac 6960
 atcaatccgc ggccgcatgg gaacggacca aggaaaaacc ttcacctggg aagagctggc 7020
 ggcccataac accaaggacg acctactctt ggccatccgc ggagggtgt acgatgtcac 7080
 aaagttcttg agccgccatc ctggtggagt ggacactctc ctgctcgag ctggccgaga 7140
 tgttactccg gtctttgaga tgtatcacgc gtttggggct gcagatgcca ttatgaagaa 7200
 gtactatgtc ggtacactgg tctcgaatga gctgccatc ttccggagc caacggtgtt 7260
 ccacaaaacc atcaagacga ggtcggagg ctactttacg gatcggaaca ttgatcccaa 7320
 gaatagacca gagatctggg gacgatacgc tcttatcttt ggatccttga tcgcttccta 7380
 ctacgcgcag ctctttgtgc ctttcgttgt cgaacgcaca tggcttcagg tgggtgttgc 7440
 aatcatcatg ggatttgctg gcgcacaagt cggactcaac cctcttcatg atgcgtctca 7500
 cttttcagtg acccacaacc ccactgtctg gaagattctg ggagccacgc acgacttttt 7560
 caacggagca tcgtacctgg tgtggatgta ccaacatag ctccggcatc acccctacac 7620
 caacattgct ggagcagatc ccgacgtgtc gacgtctgag cccgatgttc gtcgtatcaa 7680
 gcccaaccaa aagtggtttg tcaaccacat caaccagcac atgtttgttc ctttcctgta 7740
 cggactgctg gcgttcaagg tgcgcattca ggacatcaac attttgtact ttgtcaagac 7800
 caatgacgct attcgtgtca atcccatctc gacatggcac actgtgatgt tctggggcgg 7860
 caaggctttc tttgtctggt atcgccctgat tgttcccctg cagtatctgc ccctgggcaa 7920
 ggtgctgctc ttgttcacgg tcgcggacat ggtgtcgtct tactggctgg cgctgacctt 7980
 ccaggcgaac cacgttggtg aggaagttca gtggccgttg cctgacgaga acgggatcat 8040
 ccaaaaggac tgggcagcta tgcaggtcga gactacgcag gattacgcac acgattcgca 8100
 cctctggacc agcatcactg gcagcttgaa ctaccaggct gtgcaccatc tgttcccaa 8160
 cgtgtcgcag caccattatc ccgatattct ggccatcatc aagaacacct gcagcgagta 8220
 caaggttcca taccttgta aggatacgtt ttggcaagca tttgcttcac atttgagca 8280
 cttgcgtgtt cttggactcc gtcccaggga agagtaggc 8319

<210> 77

<211> 774

<212> ADN

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 77

atggagggtg tgaatgaaat agtctcaatt gggcaggaag ttttacccaa agttgattat 60

gcccactct ggagtgatgc cagtcactgt gaggtgcttt acttgtccat cgcatttgtc	120
atcttgaagt tcaactcttg ccccttggt ccaaaaggtc agtctcgtat gaagtttggt	180
ttcaccaatt acaaccttct catgtccatt tttcgttg gatcattcct ctcaatggca	240
tatgccatgt acaccatcgg tgttatgtct gacaactgcg agaaggcttt tgacaacaac	300
gtcttcagga tcaccacgca gttgttctat ttgagcaagt tcctggagta tattgactcc	360
ttctatttgc cactgatggg caagcctctg acctggttgc aattcttcca tcatttgggg	420
gcaccgatgg atatgtggct gttctataat taccgaaatg aagctgtttg gatttttggtg	480
ctgttgaatg gtttcatcca ctggatcatg tacggttatt attggaccag attgatcaag	540
ctgaagttcc ccatgccaaa atccctgatt acatcaatgc agatcattca attcaatggt	600
ggtttctaca ttgtctggaa gtacaggaac attccctgtt atcgccaaga tgggatgagg	660
atgtttggct ggttcttcaa ttacttttat gttggcacag tcttgtgttt gttcttgaat	720
ttctatgtgc aaacgtatat cgtcaggaag cacaaggag ccaaaaagat tcag	774

<210> 78

<211> 1263

<212> ADN

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 78

atgaagtcaa agcgccaagc gtttccctt acaattgatg gaacaacata tgatgtgtct	60
gcctgggtca atttccacce tgggtggtgcg gaaattatag agaattacca aggaagggat	120
gccactgatg ccttcatggt tatgcactct caagaagcct tcgacaagct caagcgcgtg	180
cccaaatca atcccagttc tgagttgcca cccaggctg cagtgaatga agctcaagag	240
gatttccgga agctccgaga agagttgatc gcaactggca tgtttgatgc ctccccctc	300
tgggtactcat acaaatcag caccacactg ggccttgagg tgctgggtta tttctgatg	360
gttcagtatc agatgtattt cattggggca gtgttgcttg ggatgcaact tcaacagatg	420
ggctggcttt ctcatgacat ttgccaccac cagactttca agaaccggaa ctggaacaac	480
ctcgtgggac tggatatttg caatggctct caagggtttt ccgtgacatg gtggaaggac	540
agacacaatg cacatcattc ggcaaccaat gttcaagggc acgaccctga tattgacaac	600
ctccccctct tagcctggtc tgaggatgac gtcacacggg cgtcaccgat ttcccgaag	660
ctcattcagt tccagcagta ctatttcttg gtcactctgta tcttgttgcg gttcatttgg	720
tgtttccaga gcgtgttgac cgtgcgcagt ttgaaggaca gagataacca attctatcgc	780
tctcagtata agaaggaggc cattggcctc gccctgcaact ggaccttgaa gaccctgttc	840
catttattct ttatgccag catcctcaca tcgctgttgg tgttttctgt ttcggagctg	900

	gttggcggct tccgcattgc gatcgtggtg ttcattgaacc actaccact ggagaagatc	960
	ggggaactcag tctgggatgg ccatggattc tccgttggcc agatccatga gaccatgaac	1020
	attcggcgag ggattatcac agattgggtt ttcggaggct tgaattacca gattgagcac	1080
	catttggtggc cgaccctccc tccccacaac ctgacagcgg ttagctacca ggtggaacag	1140
	ctgtgccaga agcacaacct gccgtatcgg aaccgcgtgc cccatgaagg gttggtcatc	1200
	ctgctgcgct atctggcggt gttcgcccg atggcggaga agcaaccgc ggggaaggct	1260
	cta	1263
	<210> 79	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oEugEL1-1	
	<400> 79	
	agcggccgca ccatggaggt ggtgaatgaa	30
10	<210> 80	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador oEugEL1-2	
	<400> 80	
	tgcggccgct cactgaatct tttggctcc	30
	<210> 81	
	<211> 4311	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Plásmido pKR906	
	<400> 81	
	agcggccgca ccatggaggt ggtgaatgaa atagtctcaa ttgggcagga agttttaccc	60
	aaagttgatt atgcccaact ctggagtgat gccagtcact gtgaggtgct ttacttgtcc	120
	atcgcatttg tcatcttgaa gttcactctt ggcccccttg gtccaaaagg tcagtctcgt	180
	atgaagtttg ttttcaccaa ttacaacctt ctcatgtcca ttatttcgtt gggatcattc	240
	ctctcaatgg catatgccat gtacaccatc ggtgttatgt ctgacaactg cgagaaggct	300
25	tttgacaaca acgtcttcag gatcaccacg cagttgttct atttgagcaa gttcctggag	360

tatattgact ccttctattt gccactgatg ggcaagcctc tgacctgggt gcaattcttc	420
catcatttgg gggcaccgat ggatatgtgg ctgttctata attaccgaaa tgaagctgtt	480
tggatttttg tgctgttgaa tggtttcata cactggatca tgtacgggta ttattggacc	540
agattgatca agctgaagtt ccccatgcc aatccctga ttacatcaat gcagatcatt	600
caattcaatg ttggtttcta cattgtctgg aagtacagga acattccctg ttatcgccaa	660
gatgggatga ggatgtttgg ctggttcttc aattactttt atgttggcac agtcttgtgt	720
ttgttcttga atttctatgt gcaaacgtat atcgtcagga agcacaaggg agccaaaaag	780
attcagttag cggccgcacc tgaattccag cacactggcg gccgttacta gtggatccga	840
gctcggtagc aagcttgatg catagcttga gtattctaac gcgtcaccta aatagcttgg	900
cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca	960
acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca	1020
cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc	1080
attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgtt	1140
cctcgtcac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggtgcg gcgagcggta tcagctcact	1200
caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag	1260
caaaaggcca gcaaaagccc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata	1320
ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc	1380
cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg	1440
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcg	1500
tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg	1560
gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc	1620
ttgagtccaa cccggtgaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga	1680
ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg	1740
gctacactag aaggacagta tttggatatc gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa	1800
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggttttttg	1860
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt	1920
ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat	1980
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt agcacgtgtc	2040
agtcctgctc ctcgccacg aagtgcacgc agttgccggc cgggtcgcgc agggcgaaact	2100
cccgcccca cggtgctcg ccgatctcgg tcatggccgg ccgggaggcg tcccggaagt	2160
tcgtggacac gacctcgac cactcggcgt acagctcgtc caggccgcgc acccacaccc	2220

aggccagggg	gttgteccggc	accacctggg	cctggaccgc	gctgatgaac	agggtcacgt	2280
cgtcccggac	cacaccggcg	aagtcgtcct	ccacgaagtc	ccgggagaac	ccgagccggg	2340
cgggtccagaa	ctcgaccgct	ccggcgacgt	cgcgcgcggg	gagcaccgga	acggcactgg	2400
tcaacttggc	catggtggcc	ctcctcacgt	gctattattg	aagcatttat	cagggttatt	2460
gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	2520
gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgtat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	2580
gagaaaatac	cgcatacagga	aattgtaagc	gttaataatt	cagaagaact	cgtcaagaag	2640
gcgatagaag	gcgatgcgct	gcgaatcggg	agcggcgata	ccgtaaagca	cgaggaagcg	2700
gtcagcccat	tcgccgccaa	gctcttcagc	aatatcacgg	gtagccaacg	ctatgtcctg	2760
atagcgggtcc	gccacaccca	gccggccaca	gtcgatgaat	ccagaaaagc	ggccattttc	2820
caccatgata	ttcggcaagc	aggcatcgcc	atgggtcacg	acgagatcct	cgccgtcggg	2880
catgctcgcc	ttgagcctgg	cgaacagttc	ggctggcgcg	agcccctgat	gctcttcgtc	2940
cagatcatcc	tgatcgacaa	gaccggcttc	catccgagta	cgtgctcgct	cgatgcgatg	3000
tttcgcttgg	tggtcgaatg	ggcaggtagc	cggatcaagc	gtatgcagcc	gccgcattgc	3060
atcagccatg	atggatactt	tctcggcagg	agcaagggtga	gatgacagga	gatcctgccc	3120
cggcacttcg	cccaatagca	gccagtcctt	tcccgcctca	gtgacaacgt	cgagcacagc	3180
tgcgcaagga	acgcccgtcg	tggccagcca	cgatagccgc	gctgcctcgt	cttgcagttc	3240
attcagggca	ccggacaggt	cggctcttgac	aaaaagaacc	gggcgcccct	gcgctgacag	3300
ccggaacacg	gcggcatcag	agcagccgat	tgtctgttgt	gccagtcac	agccgaatag	3360
cctctccacc	caagcggccg	gagaacctgc	gtgcaatcca	tcttggtcaa	tcatgcgaaa	3420
cgatcctcat	cctgtctctt	gatcagagct	tgatcccctg	cgccatcaga	tccttggcgg	3480
cgagaaagcc	atccagttta	ctttgcaggg	cttcccaacc	ttaccagagg	gcgccccagc	3540
tggcaattcc	ggttcgcttg	ctgtccataa	aaccgcccag	tctagctatc	gcatgtaag	3600
cccactgcaa	gctacctgct	ttctctttgc	gcttgcgttt	tcccttgctc	agatagccca	3660
gtagctgaca	ttcatccggg	gtcagcaccg	tttctgcgga	ctggctttct	acgtgaaaag	3720
gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgcctgac	atttatattc	cccagaacat	3780
caggttaatg	gcgtttttga	tgtcattttc	gcggtggctg	agatcagcca	cttcttcccc	3840
gataacggag	accggcacac	tggccatata	ggtggtcatc	atgcgccagc	tttcatcccc	3900
gatatgcacc	accgggtaaa	gttcacggga	gactttatct	gacagcagac	gtgcactggc	3960
caggggggatc	accatccgtc	gccccggcgt	gtcaataata	tcaactctgt	catccacaaa	4020

cagacgataa cggctctctc ttttataggt gtaaaccctta aactgccgta cgtataggct 4080
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 4140
aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 4200
ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaaat tgggccctct 4260
agatgcatgc tcgagcggcc gccagtgtga tggatatctg cagaattcag g 4311

<210> 82

<211> 7085

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR72

<400> 82

gtacggatcc gtcgacggcg .cgcccgatca tccggatata gttcctcctt tcagcaaaaa 60
acccctcaag acccgtttag aggccccaag gggttatgct agttattgct cagcgggtggc 120
agcagccaac tcagcttcct ttcgggcttt gttagcagcc ggatcgatcc aagctgtacc 180
tcactattcc tttgccctcg gacgagtgtt ggggcgtcgg ttccactat cggcgagtac 240
ttctacacag ccacgggtcc agacggcgc gcttctgcgg gcgatttggt tacgcccgc 300
agtcceggct ccggatcgga cgattgcgtc gcacgaccc tgcgccaag ctgcacatc 360
gaaattgccg tcaaccaagc tctgatagag ttggtcaaga ccaatgcgga gcatatacgc 420
ccggagccgc ggcgatcctg caagctccgg atgcctccgc tcgaagtagc gcgtctgctg 480
ctccatacaa gccaacacg gcctccagaa gaagatgttg gcgacctcgt attgggaatc 540
cccgaacatc gcctcgctcc agtcaatgac cgctgttatg cggccattgt ccgtcaggac 600
attgttgagg ccgaaatccg cgtgcacgag gtgccggact tcggggcagt cctcgcccca 660
aagcatcagc tcacgagag cctgcgcgac ggacgactg acggtgtcgt ccacacagt 720
ttgccagtga tacacatggg gatcagcaat cgcgcatatg aatcacgcc atgtagtgt 780
ttgaccgatt ccttgcggtc cgaatgggccc gaaccgcgtc gtctggctaa gatcgccgc 840
agcgatcgca tccatagcct ccgcgaccgg ctgcagaaca gcgggcagtt cggtttcagg 900
caggtcttgc aacgtgacac cctgtgcacg gcgggagatg caataggta ggctctcgct 960
gaattcccca atgtcaagca cttccggaat cgggagcgcg gccgatgcaa agtgccgata 1020
aacataacga tctttgtaga aaccatcggc gcagctattt acccgagga catatccacg 1080
ccctctaca tcgaagctga aagcacgaga ttcttcgccc tccgagagct gcacaggtc 1140
ggagacgctg tcgaactttt cgatcagaaa cttctcgaca gacgtcgcgg tgagttcagg 1200
cttttccatg ggtatatctc cttcttaaag ttaaacaaaa ttatttctag agggaaaccg 1260

ttgtggtctc cctatagtga gtcgtattaa tttcgcggga tcgagatcga tccaattcca	1320
atccccacaaa aatctgagct taacagcaca gttgctcctc tcagagcaga atcgggtatt	1380
caacaccctc atatcaacta ctacgttgtg tataacggtc cacatgccgg tatatacgat	1440
gactgggggtt gtacaaaggc ggcaacaaac ggcgttcccg gagttgcaca caagaaattt	1500
gccactatta cagaggcaag agcagcagct gacgcgtaca caacaagtca gcaaacagac	1560
aggttgaact tcatcccaa aggagaagct caactcaagc ccaagagctt tgctaaggcc	1620
ctaacaagcc caccaaagca aaaagccac tggctcacgc taggaaccaa aaggcccagc	1680
agtgatccag ccccaaaaga gatctccttt gccccggaga ttacaatgga cgatttcctc	1740
tatcttttacg atctaggaag gaagttcgaa ggtgaagggtg acgacactat gttcaccact	1800
gataatgaga aggttagcct cttcaatttc agaaagaatg ctgaccacaca gatgggttaga	1860
gaggcctacg cagcaggtct catcaagacg atctaccga gtaacaatct ccaggagatc	1920
aaataccttc ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa ttgcatcaag	1980
aacacagaga aagacatatt tctcaagatc agaagtacta ttccagtatg gacgattcaa	2040
ggcttgcttc ataaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaaaaa ggtagttcct	2100
actgaatcta aggccatgca tggagtctaa gattcaaadc gaggatctaa cagaactcgc	2160
cgtgaagact ggcgaacagt tcatacagag tcttttacga ctcaatgaca agaagaaaat	2220
cttcgtcaac atggtggagc acgacactct ggtctactcc aaaaatgtca aagatacagt	2280
ctcagaagac caaagggtta ttgagacttt tcaacaaagg ataatttcgg gaaacctcct	2340
cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaagggtgg	2400
ctcctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc attcaagatg cctctgccga	2460
cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc	2520
aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgacatctcc actgacgtaa gggatgacgc	2580
acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga	2640
gaggacacgc tcgagctcat ttctctatta cttcagccat aacaaaagaa ctcttttctc	2700
ttcttattaa accatgaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agtttctgat	2760
cgaaaagttc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc	2820
tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgtcctgcgg gtaaatagct gcgccgatgg	2880
tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca ctttgcatcg gccgcgtcc cgattccgga	2940
agtgcttgac attggggaat tcagcgagag cctgacctat tgcatctccc gccgtgcaca	3000
gggtgtcacg ttgcaagacc tgctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggctgc	3060

ggaggccatg gatgcgatcg ctgcggccga tcttagccag acgagcgggt tcggcccatt	3120
cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga	3180
tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca	3240
ggctctcgat gagctgatgc tttggggccga ggactgcccc gaagtcgggc acctcgtgca	3300
cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga	3360
ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag	3420
gccgtggttg gcttgtagtg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc atccggagct	3480
tgcaggatcg ccgcggctcc gggcgtatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca	3540
gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttgggcg cagggtcgat gcgacgcaat	3600
cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg tacacaaatc gcccgcagaa gcgcggccgt	3660
ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtggg aaccgacgcc ccagcactcg	3720
tccgagggca aaggaatagt gaggtaccta aagaaggagt gcgtcgaagc agatcgttca	3780
aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc	3840
atataatttc tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta	3900
tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa	3960
aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta	4020
gatcgatgtc gaatcgatca acctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg	4080
tttgcgattt gggcgctctt ccgcttcttc gctcactgac tcgctgcgct cggtcggttcg	4140
gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg	4200
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa	4260
ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg	4320
acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc	4380
tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc	4440
ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc	4500
ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccggtc agcccgaccg	4560
ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc	4620
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga	4680
gttcttgaag tgggtggcta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc	4740
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac	4800
caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg	4860
atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc	4920

acgttaagg	attttggtca	tgacattaac	ctataaaaat	aggcgtatca	cgaggccctt	4980
tcgtctcgcg	cgtttcggtg	atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	5040
ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	5100
gggtgttggc	gggtgtcggg	gctggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	5160
agtgcaccat	atggacatat	tgtcgttaga	acgcggctac	aattaatata	taaccttatg	5220
tatcatatac	atacgattta	ggtgacacta	tagaacggcg	cgccaagctt	gttgaaacat	5280
ccctgaagtg	tctcatttta	ttttatttat	tctttgctga	taaaaaaata	aaataaaaga	5340
agetaagcac	acggtcaacc	attgctctac	tgctaaaagg	gttatgtgta	gtgttttact	5400
gcataaatta	tgacgcaaac	aagacaactc	aaattaaaaa	atttcctttg	cttgtttttt	5460
tgttgctctc	gacttgactt	tcttgtggaa	gttggttgta	taaggattgg	gacaccattg	5520
tccttcttaa	tttaatttta	ttctttgctg	ataaaaaaaaa	aaatttcata	tagtgttaaa	5580
taataatttg	ttaaataaac	aaaaagtcaa	atatgtttac	tctcgtttaa	ataattgaga	5640
ttcgtccagc	aaggctaaac	gattgtatag	atttatgaca	atatttactt	ttttatagat	5700
aaatgttata	ttataataaa	tttatataca	tatattatat	gttatttatt	attattttta	5760
atccttcaat	attttatcaa	accaactcat	aatttttttt	ttatctgtaa	gaagcaataa	5820
aattaaatag	accacttta	aggatgatcc	aacctttata	cagagtaaga	gagttcaaat	5880
agtacccttt	catatacata	tcaactaaaa	tattagaaat	atcatggatc	aaaccttata	5940
aagacattaa	ataagtggat	aagtataata	tataaatggg	tagtatataa	tatataaatg	6000
gatacaaact	tctctcttta	taattgttat	gtctccttaa	catcctaata	taatacataa	6060
gtgggtaata	tataatatat	aaatggagac	aaacttcttc	cattataatt	gttatgtctt	6120
cttaacactt	atgtctcggt	cacaatgcta	aggttagaat	tgtttagaaa	gtcttatagt	6180
acacatttgt	ttttgtacta	tttgaagcat	tccataagcc	gtcacgattc	agatgattta	6240
taataataag	aggaaattta	tcatagaaca	ataaggtgca	tagatagagt	gttaatatat	6300
cataacatcc	tttgtttatt	catagaagaa	gtgagatgga	gctcagttat	tatactgtta	6360
catggtcggg	tacaatatcc	catgctctcc	atgagctctt	acacctacat	gcattttagt	6420
tcatacttgc	ggccgcagta	tatcttaaat	tctttaatac	ggtgtactag	gatattgaac	6480
tggttcttga	tgatgaaaac	ctgggccgag	attgcagcta	tttatagtca	taggtcttgt	6540
taacatgcat	ggacatttgg	ccacgggggtg	gcatgcagtt	tgacgggtgt	tgaaataaac	6600
aaaaatgagg	tggcggaaga	gaatacgagt	ttgaggttgg	gttagaaaca	acaaatgtga	6660
gggctcatga	tgggttgagt	tgggtgaatgt	tttgggctgc	tcgattgaca	cctttgtgag	6720

tacgtgttgt tgtgcatggc ttttggggtc cagttttttt ttcttgacgc ggcgatcctg 6780
atcagctagt ggataagtga tgtccactgt gtgtgattgc gtttttgttt gaattttatg 6840
aacttagaca ttgctatgca aaggatactc tcattgtgtt ttgtcttctt ttgttccttg 6900
gctttttctt atgatccaag agactagtca gtgttgtggc attcgagact accaagatta 6960
attatgatgg gggaaggata agtaactgat tagtacggac tgttaccaaa ttaattaata 7020
agcggcaaat gaagggcatg gatcaaaagc ttggatctcc tgcaggatct ggccggccgg 7080
atctc 7085

<210> 83

<211> 2540

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKS102

<400> 83

cgatcatccg gatatagttc ctcttttcag caaaaaaccc ctcaagaccc gtttagaggc 60
cccaaggggt tatgctagtt attgctcagc ggtggcagca gccaaactcag ctctctttcg 120
ggctttgtta gcagccgat cgatccaagc tgtacctcac tattcctttg ccctcggacg 180
agtgtgtggg cgtcgggttc cactatcggc gagtacttct acacagccat cggtcagac 240
ggccgcgctt ctgcgggcga ttgtgtacg cccgacagtc ccggctccgg atcggacgat 300
tgcgtcgc atcgacctgc cccaagctgc atcatcgaaa ttgctgtcaa ccaagctctg 360
atagagttgg tcaagaccaa tgcggagcat atacgcccgg agccgcggcg atcctgcaag 420
ctccggatgc ctccgctcga agtagcgcgt ctgctgtctc atacaagcca accacggcct 480
ccagaagaag atgttggcga cctcgtattg ggaatccccg aacatcgcct cgctccagtc 540
aatgaccgct gttatgcggc cattgtccgt caggacattg ttggagccga aatccgcgtg 600
cacgaggtgc cggacttcgg ggcagtcctc ggcccaaagc atcagctcat cgagagcctg 660
cgcgacggac gcaactgacg tgcgtccat cacagtgtgc cagtataca catggggatc 720
agcaatcgcg catatgaaat cacgccatgt agtgtattga ccgattcctt gcggctccga 780
tgggccgaac ccgctcgtct ggctaagatc ggccgcagcg atcgcatcca tagcctccgc 840
gaccggctgc agaacagcgg gcagttcggg ttcaggcagg tcttgcaacg tgacaccctg 900
tgcacggcgg gagatgcaat aggtcaggct ctgctgaat tcccaaatgt caagcacttc 960
cggaatcggg agcgcggccg atgcaaagtg ccgataaaca taacgatctt tgtagaaacc 1020
atcggcgcag ctattttacc gcaggacata tccacgccct cctacatcga agctgaaagc 1080
acgagattct tcgccctccg agagctgcat caggctcggg acgctgtcga acttttcgat 1140

cagaaacttc tgcacagacg tcgcggtgag ttcaggcttt tccatgggta tatctccttc 1200
 ttaaagttaa acaaaattat ttctagaggg aaaccgttgt ggtctcccta tagtgagtcg 1260
 tattaatttc gcgggatcga gatctgatca acctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 1320
 ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct 1380
 cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca 1440
 cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga 1500
 accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcggttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc 1560
 acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataaccagg 1620
 cgtttccccc tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc gacctgccg cttaccggat 1680
 acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgtgttaggt 1740
 atctcagttc ggtgtaggtc gtctgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc 1800
 agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgctctga gtccaaccg gtaagacacg 1860
 acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg 1920
 gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg 1980
 gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg 2040
 gcaaacaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca 2100
 gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga 2160
 acgaaaactc acgttaaggg attttgggtc tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca 2220
 cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcgggtg atgacgggtg aaacctctga cacatgcagc 2280
 tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg 2340
 gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga 2400
 ttgtactgag agtgcaccat atggacatat tgtcggttaga acgcggctac aattaatata 2460
 taaccttatg tatcatacac atacgattta ggtgacacta tagaacggcg cgccaagctt 2520
 ggatccgtcg acggcgcgcc 2540

<210> 84

<211> 4359

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR197

<400> 84

cgcgcccgat catccggata tagttcctcc tttagcaaa aaaccctca agaccggtt 60

agaggcccca aggggttatg ctagttattg ctacagcggg gcagcagcca actcagcttc 120
 ctttcgggct ttgttagcag ccgcatcgat ccaagctgta cctcactatt cctttgccct 180
 cggacgagtg ctggggcgtc gggttccact atcggcgagt acttctacac agccatcggt 240
 ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg tgtacgcccg acagtcccgg ctccggatcg 300
 gacgattgag tcgcatcgac cctgcgcccc agctgcatac tcgaaattgc cgtcaaccaa 360
 gctctgatag agttgggtcaa gaccaatgcg gagcatatac gcccgagagcc gcggcgatcc 420
 tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta gcgcgtctgc tgctccatac aagccaacca 480
 cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc gtattgggaa tccccgaaca tcgcctcgct 540
 ccagtcaatg accgctgtta tgcgccatt gtccgtcagg acattgttgg agccgaaatc 600
 cgcgtagcag aggtgccgga cttcggggca gtccctggcc caaagcatca gctcatcgag 660
 agcctgcgag acggacgcac tgacgggtgc gtccatcaca gtttgccagt gatacacatg 720
 gggatcagca atcgcgcata tgaaatcacg ccatgtagtg tattgaccga ttccctgcgg 780
 tccgaatggg ccgaaccgcg tcgtctggct aagatcggcc gcagcgatcg catccatagc 840
 ctccgcgacc ggctgcagaa cagcgggcag ttcggtttca ggcaggtctt gcaacgtgac 900
 accctgtgca cggcgggaga tgcaataggt caggctctcg ctgaattccc caatgtcaag 960
 cacttccgga atcgggagcg cggccgatgc aaagtgccga taaacataac gatctttgta 1020
 gaaaccatcg gcgcagctat ttaccgcgag gacatatcca cgcctccta catcgaagct 1080
 gaaagcacga gattcttcgc cctccgagag ctgcatacagg tcggagacgc tgtcgaactt 1140
 ttcatcaga aacttctcga cagacgtcgc ggtgagttca ggcttttcca tgggtatatc 1200
 tccttcttaa agttaaacaa aattatttct agagggaaac cgttgtggtc tccttatagt 1260
 gagtcgtatt aatttcgcgg gatcgagatc tgatcaacct gcattaatga atcggccaac 1320
 gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgc ttccctcgctc actgactcgc 1380
 tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg 1440
 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 1500
 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 1560
 agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 1620
 accaggcggt tccccctgga agtccctcg tgcgtctcc tgttcgacc ctgccgctta 1680
 ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct 1740
 gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 1800
 ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa 1860
 gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 1920

taggcggtgc	tacagagttc	ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	1980
tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	2040
gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	gtgggttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	2100
cgcgagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	2160
agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgac	attaacctat	aaaaataggc	2220
gtatcacgag	gccctttcgt	ctcgcgcgtt	tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	2280
tgcaagctccc	ggagacggtc	acagcttgtc	tgtaagcggg	tgccgggagc	agacaagccc	2340
gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	gtcggggctg	gcttaactat	gcggcatcag	2400
agcagattgt	actgagagtg	caccatatgg	acatatgttc	gttagaacgc	ggctacaatt	2460
aatacataac	cttatgtatc	atacacatac	gatttaggtg	acactataga	acggcgcgcc	2520
aagcttggtg	aaacatccct	gaagtgtctc	attttatttt	atttattctt	tgctgataaa	2580
aaaataaaat	aaaagaagct	aagcacacgg	tcaaccattg	ctctactgct	aaaagggtta	2640
tgtgtagtgt	tttactgcat	aaattatgca	gcaaacaaga	caactcaa	taaaaaattt	2700
cctttgcttg	tttttttggt	gtctctgact	tgactttctt	gtggaagttg	gttggtataag	2760
gattgggaca	ccattgtcct	tcttaattta	attttattct	ttgctgataa	aaaaaaaaat	2820
ttcatatagt	gttaataaat	aatttggtta	ataacaaaaa	agtcaa	aatatgttctc	2880
gtttaaataa	ttgagattcg	tccagcaagg	ctaaacgatt	gtatagattt	atgacaatat	2940
ttactttttt	atagataaat	gttatattat	aataaattta	tatacatata	ttatatgtta	3000
tttattatta	ttttaaatcc	ttcaatattt	tatcaaacca	actcataatt	ttttttttat	3060
ctgtaagaag	caataaaatt	aaatagaccc	actttaagga	tgatccaacc	tttatacaga	3120
gtaagagagt	tcaaatagta	ccctttcata	tacatatcaa	ctaaaatatt	agaaatatca	3180
tggtatcaaac	cttataaaga	cattaaataa	gtggataagt	ataatatata	aatgggtagt	3240
atataatata	taaatggata	caaacttctc	tctttataat	tgttatgtct	ccttaacatc	3300
ctaataataat	acataagtgg	gtaatatata	atatataaat	ggagacaaac	ttcttccatt	3360
ataattgtta	tgtcttctta	acacttatgt	ctcggtcaca	atgctaaggt	tagaattggt	3420
tagaaaagtct	tatagtacac	atttgttttt	gtactatttg	aagcattcca	taagccgtca	3480
cgattcagat	gattttataat	aataagagga	aatttatcat	agaacaataa	ggtgcataga	3540
tagagtgtta	atatatcata	acatcctttg	tttattcata	gaagaagtga	gatggagctc	3600
agttattata	ctgttacatg	gtcggataca	atattccatg	ctctccatga	gctcttacac	3660
ctacatgcat	tttagttcat	acttgcgccc	gcagtatata	ttaaattctt	taatacgggtg	3720

tactaggata ttgaactggt tcttgatgat gaaaacctgg gccgagattg cagctattta	3780
tagtcatagg tcttgtaac atgcatggac atttggccac ggggtggcat gcagtttgac	3840
gggtggtgaa ataaacaaaa atgaggtggc ggaagagaat acgagtttga ggttgggtta	3900
gaaacaacaa atgtgagggc tcatgatggg ttgagttggt gaatgttttg ggctgctcga	3960
ttgacacctt tgtgagtacg tgttggttg catggctttt ggggtccagt ttttttttct	4020
tgacgcgcg atcctgatca gctagtggat aagtgatgtc cactgtgtgt gattgcgttt	4080
ttgtttgaat tttatgaact tagacattgc tatgcaaagg atactctcat tgtgttttgt	4140
cttcttttgt tccttggctt tttcttatga tccaagagac tagtcagtgt tgtggcattc	4200
gagactacca agattaatta tgatggggga aggataagta actgattagt acggactgtt	4260
accaaattaa ttaataagcg gcaaatgaag ggcatggatc aaaagcttgg atctcctgca	4320
ggatctggcc ggccggatct cgtacggatc cgtcgacgg	4359

<210> 85

<211> 5147

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR911

<400> 85

ggccgcaagt atgaactaaa atgcatgtag gtgtaagagc tcatggagag catggaatat	60
tgtatccgac catgtaacag tataataact gagctccatc tcacttcttc tatgaataaa	120
caaaggatgt tatgatatat taacactcta tctatgcacc ttattgttct atgataaatt	180
tcctcttatt attataaatc atctgaatcg tgacggctta tggaatgctt caaatagtac	240
aaaaacaaat gtgtactata agactttcta aacaattcta accttagcat tgtgaacgag	300
acataagtgt taagaagaca taacaattat aatggaagaa gtttgtctcc atttatatat	360
tatatattac ccacttatgt attatattag gatgttaagg agacataaca attataaaga	420
gagaagtttg tatccattta tatattatat actaccatt tatatattat acttatccac	480
ttattttaatg tctttataag gtttgatcca tgatatttct aatatttttag ttgatatgta	540
tatgaaaggg tactatttga actctcttac tctgtataaa ggttggatca tccttaaagt	600
gggtctattt aattttattg cttcttacag ataaaaaaaa aattatgagt tggtttgata	660
aaatattgaa ggatttaaaa taataataaa taacatataa tatatgtata taaatttatt	720
ataatataac atttatctat aaaaaagtaa atattgtcat aaatctatac aatcgtttag	780
ccttgctgga cgaatctcaa ttatttaaac gagagtaaac atatttgact ttttggttat	840
ttaacaaatt attatttaac actatatgaa attttttttt ttatcagcaa agaataaaat	900

taaattaaga	aggacaatgg	tgtcccaatc	cttatacaac	caacttccac	aagaaagtca	960
agtcagagac	aacaaaaaaaa	caagcaaagg	aaatttttta	atttgagttg	tcttgtttgc	1020
tgcataattt	atgcagtaaa	acactacaca	taaccctttt	agcagtagag	caatgggtga	1080
ccgtgtgctt	agcttctttt	attttatttt	tttatcagca	aagaataaat	aaaataaaat	1140
gagacacttc	agggatgttt	caacaagctt	ggcgcgccgt	tctatagtgt	cacctaaatc	1200
gtatgtgtat	gatacataag	gttatgtatt	aattgtagcc	gcgttctaac	gacaatatgt	1260
ccatatggtg	cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaagc	cagccccgac	1320
acccgccaac	acccgctgac	gcgccctgac	gggcttgtct	gctcccggca	tccgcttaca	1380
gacaagctgt	gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttcaccg	tcatacccca	1440
aacgcgcgag	acgaaagggc	ctcgtgatac	gcctattttt	ataggttaat	gtcatgacca	1500
aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	1560
gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	aaaaaaccac	1620
cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	1680
ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	1740
accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaata	ctgttaccag	1800
tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccggggt	ggactcaaga	cgatagttac	1860
cggataaggc	gcagcggtcg	ggctgaacgg	gggggttcgtg	cacacagccc	agcttgagac	1920
gaacgaccta	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	gccacgcttc	1980
ccgaagggag	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	ggagagcgca	2040
cgaagggagc	tccaggggga	aacgcctggt	atcttttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	2100
tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	2160
ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	2220
ttcctgcgtt	atccccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcctttgag	tgagctgata	2280
ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	2340
gcccataacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	tcattaatgc	aggttgatca	2400
gatctcgatc	ccgcgaaatt	aatacgactc	actataggga	gaccacaacg	gtttccctct	2460
agaaataatt	ttgtttaact	ttaagaagga	gatataccca	tggaaaagcc	tgaactcacc	2520
gcgacgtctg	tcgagaagtt	tctgatcgaa	aagttcgaca	gcgtctccga	cctgatgcag	2580
ctctcggagg	gcgaagaatc	tcgtgctttc	agcttcgatg	taggagggcg	tggatatgtc	2640
ctgcgggtaa	atagctgcgc	cgatggtttc	tacaaagatc	gttatgttta	tcggcacttt	2700

gcacgcggccg	cgctcccgat	tccggaagtg	cttgacattg	gggaattcag	cgagagcctg	2760
acctattgca	tctcccgcg	tgcacaggg	gtcacgttgc	aagacctgcc	tgaaaccgaa	2820
ctgcccgcgtg	ttctgcagcc	ggtcgcggag	gctatggatg	cgatcgctgc	ggccgatctt	2880
agccagacga	gcgggttcg	cccattcgg	ccgcaaggaa	tgggtcaata	cactacatgg	2940
cgtgatttca	tatgcgcgat	tgtgatccc	catgtgtatc	actggcaaac	tgtgatggac	3000
gacaccgtca	gtgcgtccgt	cgcgacagg	ctcgatgagc	tgatgctttg	ggccgaggac	3060
tgccccgaag	tccggcacct	cgtgcacgcg	gatttcggct	ccaacaatgt	cctgacggac	3120
aatggccgca	taacagcgg	cattgactgg	agcgaggcga	tgttcgggga	ttcccaatac	3180
gaggtcgcca	acatcttctt	ctggaggccg	tggttggctt	gtatggagca	gcagacgcgc	3240
tacttcgagc	ggaggcatcc	ggagcttgca	ggatcgccgc	ggctccgggc	gtatatgctc	3300
cgcattggtc	ttgaccaact	ctatcagagc	ttggttgacg	gcaatttcga	tgatgcagct	3360
tgggcgcagg	gtcgatgcga	cgcaatcgtc	cgatccggag	ccgggactgt	cgggcgta	3420
caaatcgccc	gcagaagcgc	ggccgtctgg	accgatggct	gtgtagaagt	actcgccgat	3480
agtggaaacc	gacgccccag	cactcgtccg	agggcaaagg	aatagtgagg	tacagcttgg	3540
atcgatccgg	ctgctaacaa	agccccgaa	gaagctgagt	tggctgctgc	caccgctgag	3600
caataactag	cataaccctt	tggggcctct	aaacgggtct	tgaggggttt	tttgctgaaa	3660
ggaggaacta	tatccggatg	atcgggcgcg	ccgtcgacgg	atccgtacga	gatccggccg	3720
gccagatcct	gcaggagatc	caagcttttg	atccatgcc	ttcatttgcc	gcttattaat	3780
taatttggtg	acagtccgta	ctaatacagt	acttatcctt	ccccatcat	aattaatctt	3840
ggtagtctcg	aatgccacaa	cactgactag	tctcttggtg	cataagaaaa	agccaaggaa	3900
caaaagaaga	caaaacacaa	tgagagtatc	ctttgcatag	caatgtctaa	gttcataaaa	3960
ttcaaacaaa	aacgcaatca	cacacagtgg	acatcactta	tccactagct	gatcaggatc	4020
gccgcgtcaa	gaaaaaaaa	ctggacccca	aaagccatgc	acaacaacac	gtactacaaa	4080
aggtgtcaat	cgagcagccc	aaaacattca	ccaactcaac	ccatcatgag	ccctcacatt	4140
tgttgtttct	aacccaacct	caaactcgta	ttctcttcg	ccacctcatt	tttgtttatt	4200
tcaacacccg	tcaaactgca	tgccaccccg	tggccaaatg	tccatgcatg	ttaacaagac	4260
ctatgactat	aaatagctgc	aatctcggcc	caggttttca	tcatcaagaa	ccagttcaat	4320
atcctagtac	accgtattaa	agaatttaag	atatactgcg	gccgcaccat	ggaggtggtg	4380
aatgaaatag	tctcaattgg	gcaggaagtt	ttacccaaag	ttgattatgc	ccaactctgg	4440
agtgatgcca	gtcactgtga	ggtgctttac	ttgtccatcg	catttgatc	cttgaagttc	4500
actcttggcc	cccttggtcc	aaaaggctcag	tctcgtatga	agtttgtttt	caccaattac	4560

```

aaccttctca tgtccattta ttcgttggga tcattcctct caatggcata tgccatgtac 4620
accatcgggtg ttatgtctga caactgcgag aaggcttttg acaacaacgt cttcaggatc 4680
accacgcagt tgttctatth gagcaagttc ctggagtata ttgactcctt ctatttgcca 4740
ctgatgggca agcctctgac ctggttgcaa ttcttccatc atttgggggc accgatggat 4800
atgtggctgt tctataatta ccgaaatgaa gctgtttgga tttttgtgct gttgaatggt 4860
ttcatccact ggatcatgta cggttattat tggaccagat tgatcaagct gaagttcccc 4920
atgccaaaat ccctgattac atcaatgcag atcattcaat tcaatgttgg tttctacatt 4980
gtctggaagt acaggaacat tccctgttat cgccaagatg ggatgaggat gtttggtctg 5040
ttcttcaatt acttttatgt tggcacagtc ttgtgtttgt tcttgaattt ctatgtgcaa 5100
acgtatatcg tcaggaagca caaggagacc aaaaagattc agtgagc 5147

```

<210> 86

<211> 6559

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR680

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (4340) .. (4340)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 86

```

ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aaatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
taaataaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
ttctttctcg ttatcttttg ccacttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
ttgtttacgg ctcatatat ccggtctaga ggatccaagg ccgcgaagtt aaaagcaatg 240
ttgtcacttg tcgtactaac acatgatgtg atagtttatg ctagctagct ataacataag 300
ctgtctctga gtgtgttgta tattaataaa gatcatcact ggtgaatggt gatcgtgtac 360
gtaccctact tagtaggcaa tggaagcact tagagtgtgc tttgtgcatg gccttgccctc 420
tgttttgaga cttttgtaat gttttcgagt ttaaactctt gcctttgcgt acgtgggcgg 480
atccccggg ctgcaggaat tcaactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 540
ctggcggttac ccaacttaat cgccttgca ccatccccc ttccgccagc tggcgtaata 600
gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc 660
gcctgatgcy gtattttctc cttacgcac tcgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca 720

```

ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac	780
ccgctgacgc gccctgacgg gcttgctctgc tcccggcacc cgcttacaga caagctgtga	840
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt ttccaccgtc atcacccgaaa cgcgcgagac	900
gaaagggcct cgtgatacgc ctatTTTTat aggttaatgt catgataata atggtttctt	960
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct	1020
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat	1080
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt ccctTTTTtg	1140
cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg	1200
aagatcagtt gggcgacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc	1260
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat	1320
gtggcgcggt attatcccggt attgacgcgc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact	1380
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca	1440
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact	1500
tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg	1560
atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg	1620
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaacta ttaactggcg	1680
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg	1740
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag	1800
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc	1860
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga	1920
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc atttgtaact gtcagaccaa gtttactcat	1980
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc	2040
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag	2100
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct	2160
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggttg tttgccggat caagagctac	2220
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc	2280
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg	2340
ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt	2400
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt	2460
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc	2520
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca	2580

gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata	2640
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg	2700
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct	2760
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga ttctgtggat aaccgtatta	2820
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag	2880
tgagcgagga agcgggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga	2940
ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg	3000
caattaatgt gagttagctc actcattagg caccocaggc tttacacttt atgcttccgg	3060
ctcgtatgtt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc	3120
atgattacgc caagcttgca tgcctgcagg tcgactcgac gtacgtcctc gaagagaagg	3180
gttaataaca cattttttaa catttttaac acaaatttta gttatttaa aatttattaa	3240
aaaattttaa ataagaagag gaactcttta aataaatcta acttacaataa tttatgattt	3300
ttaataagtt ttcaccaata aaaaatgtca taaaaatatg ttaaaaagta tattatcaat	3360
attctcttta tgataaataa aaagaaaaaa aaaataaaaag ttaagtgaat atgagattga	3420
agtgacttta ggtgtgtata aatatatcaa ccccgccaac aatttattta atccaaatat	3480
attgaagtat attattccat agcctttatt ttttatataa tttattatat aaaagcttta	3540
tttgttctag gttgttcatg aaatatTTTT ttggttttat ctccgttgta agaaaatcat	3600
gtgctttgtg tcgccactca ctattgcagc tttttcatgc attggtcaga ttgacggttg	3660
attgtatttt tgttttttat ggttttgtgt tatgacttaa gtcttcatct ctttatctct	3720
tcatcagggt tgatggttac ctaatatggt ccatgggtac atgcatggtt aaattagggtg	3780
gccaaacttg ttgtgaacga tagaattttt tttatattaa gtaaactatt tttatattat	3840
gaaataataa taaaaaaaaat attttatcat tattaacaaa atcatattag ttaatttggt	3900
aactctataa taaaagaaat actgtaacat tcacattaca tggtaacatc tttccaccct	3960
ttcatttggt ttttgtttga tgactttttt tcttgtttaa atttatttcc cttcttttaa	4020
atttggaata cattatcatc atatataaac taaaatacta aaaacaggat tacacaaatg	4080
ataaataata acacaaatat ttataaatct agctgcaata tatttaaact agctatatcg	4140
atattgtaaa ataaaactag ctgcattgat actgataaaa aaatatcatg tgctttctgg	4200
actgatgatg cagtatactt ttgacattgc ctttatttta tttttcagaa aagctttctt	4260
agttctgggt tcttcattat ttgtttccca tctccattgt gaattgaatc atttgcttcg	4320
tgtcacaaat acaatttagn taggtacatg cattgggtcag attcacggtt tattatgtca	4380

tgacttaagt	tcatggtagt	acattacctg	ccacgcatgc	atttatattgg	ttagatttga	4440
taggcaaatt	tggttgtcaa	caatataaat	ataaataatg	tttttatatt	acgaaataac	4500
agtgatcaaa	acaaacagtt	ttatctttat	taacaagatt	ttgtttttgt	ttgatgacgt	4560
tttttaatgt	ttacgctttc	ccccttcttt	tgaattttaga	acactttatc	atcataaaat	4620
caaatactaa	aaaaattaca	tatttcataa	ataataacac	aaatattttt	aaaaaatctg	4680
aaataataat	gaacaatatt	acatattatc	acgaaaattc	attaataaaa	atattatata	4740
aataaaatgt	aatagtagtt	atatgtagga	aaaaagtact	gcacgcataa	tatatacaaa	4800
aagattaata	tgaactatta	taaataataa	cactaaatta	atggtgaatc	atatcaaaat	4860
aatgaaaaag	taaataaaat	ttgtaattaa	cttctatatg	tattacacac	acaaataata	4920
aataatagta	aaaaaaatta	tgataaatat	ttaccatctc	ataagatatt	taaaataatg	4980
ataaaaaatat	agattatttt	ttatgcaact	agctagccaa	aaagagaaca	cgggtatata	5040
taaaaagagt	acctttaaat	tctactgtac	ttcctttatt	cctgacgttt	ttatatcaag	5100
tggacatacg	tgaagatttt	aattatcagt	ctaaatat	cattagcact	taatactttt	5160
ctgttttatt	cctatcctat	aagtagtccc	gattctccca	acattgctta	ttcacacaac	5220
taactaagaa	agtcttccat	agccccccaa	gcggccgcgg	gaattcgatt	gaaatgaagt	5280
caaagcgcca	agcgcttccc	cttacaattg	atggaacaac	atatgatgtg	tctgcctggg	5340
tcaatttcca	ccctggtggt	gcggaaatta	tagagaatta	ccaaggaagg	gatgccactg	5400
atgccttcat	ggttatgcac	tctcaagaag	ccttcgacaa	gctcaagcgc	atgccccaaa	5460
tcaatcccag	ttctgagttg	ccaccccagg	ctgcagtga	tgaagctcaa	gaggatttcc	5520
ggaagctccg	agaagagttg	atcgcaactg	gcatgtttga	tgccctcccc	ctctgggtact	5580
catacaaaat	cagcaccaca	ctgggccttg	gagtgtctggg	ttatttcctg	atggttcagt	5640
atcagatgta	tttcattggg	gcagtgttgc	ttgggatgca	ctatcaacag	atgggctggc	5700
tttctcatga	catttgccac	caccagactt	tcaagaaccg	gaactggaac	aacctcgtgg	5760
gactggtatt	tggcaatggt	ctgcaagggt	tttccgtgac	atggtggaag	gacagacaca	5820
atgcacatca	ttcggaacc	aatgttcaag	ggcagacccc	tgatattgac	aacctcccc	5880
tcttagcctg	gtctgaggat	gacgtcacac	gggcgtcacc	gatttcccgc	aagctcattc	5940
agttccagca	gtactatttc	ttggtcatct	gtatcttggt	gcggttcatt	tgggtgttcc	6000
agagcgtggt	gaccgtgcgc	agtttgaagg	acagagataa	ccaattctat	cgctctcagt	6060
ataagaagga	ggccattggc	ctcgccctgc	actggacctt	gaagaccctg	ttccacttat	6120
tctttatgcc	cagcatcctc	acatcgctgt	tgggtgtttt	cgtttcggag	ctggttggcg	6180
gcttcggcat	tgcgatcgtg	gtgttcatga	accactaccc	actggagaag	atcggggact	6240

cagtctggga tggccatgga ttctcgggtg gccagatcca tgagaccatg aacattcggc 6300
gagggattat cacagattgg tttttcggag gcttgaatta ccagattgag caccatttgt 6360
ggccgaccct ccctcgccac aacctgacag cggttagcta ccagggtgga cagctgtgcc 6420
agaagcaciaa cctgccgtat cggaacccgc tgcccatga agggttggtc atcctgctgc 6480
gctatctggc ggtgttcgcc cggatggcgg agaagcaacc cgcggggaag gctctataag 6540
gaatcactag tgaattcgc 6559

<210> 87

<211> 9014

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR913

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (7839) .. (7839)

<223> n e s a, c, g, o t

<400> 87

gtacgagatc cggccggcca gatcctgcag gagatccaag cttttgatcc atgcccttca 60
tttgccgctt attaattaat ttggaacag tccgtactaa tcagttactt atccttcccc 120
catcataatt aatcttggtg gtctcgaatg ccacaacact gactagtctc ttggatcata 180
agaaaaagcc aaggaacaaa agaagacaaa acacaatgag agtatccttt gcatagcaat 240
gtctaagttc ataaaattca aacaaaaacg caatcacaca cagtggacat cacttatcca 300
ctagtgtatc aggatcgccg cgtcaagaaa aaaaaactgg accccaaaag ccatgcacaa 360
caacacgtac tcacaaaggt gtcaatcgag cagcccaaaa cattcaccia ctcaacccat 420
catgagccct cacatttggt gtttctaacc caacctcaaa ctggtattct cttccgccac 480
ctcatttttg tttatttcaa caccgtcaa actgcatgcc accccgtggc caaatgtcca 540
tgcatgttaa caagacctat gactataaat agctgcaatc tcggcccagg ttttcatcat 600
caagaaccag ttcaatatcc tagtacaccg tattaagaa ttaagatat actgcggccg 660
caccatggag gtggtgaatg aaatagtctc aattgggcag gaagttttac ccaaagttga 720
ttatgcccac ctctggagtg atgccagtca ctgtgaggtg ctttacttgt ccatcgcat 780
tgtcatcttg aagttcaact ttggccccct tgggtccaaa ggtcagtctc gtatgaagtt 840
tgttttcacc aattacaacc ttctcatgtc cttttattcg ttgggatcat tcctctcaat 900
ggcatatgcc atgtacacca tcggtgttat gtctgacaac tgcgagaagg cttttgacaa 960

caacgtcttc	aggatcacca	cgcagttggt	ctatttgagc	aagttcctgg	agtatattga	1020
ctccttctat	ttgccactga	tgggcaagcc	tctgacctgg	ttgcaattct	tccatcattt	1080
gggggcaccg	atggatatgt	ggctgttcta	taattaccga	aatgaagctg	tttggtttt	1140
tgtgctgttg	aatggtttca	tccactggat	catgtacggt	tattattgga	ccagattgat	1200
caagctgaag	ttcccatgc	caaaatccct	gattacatca	atgcagatca	ttcaattcaa	1260
tggtggtttc	tacattgtct	ggaagtacag	gaacattccc	tgttatcgcc	aagatgggat	1320
gaggatgttt	ggctgggtct	tcaattactt	ttatgttggc	acagtcttgt	gtttgttctt	1380
gaatttctat	gtgcaaactg	atatcgtcag	gaagcacaag	ggagccaaaa	agattcagtg	1440
agcggccgca	agtatgaact	aaaatgcatg	taggtgtaag	agctcatgga	gagcatggaa	1500
tattgtatcc	gaccatgtaa	cagtataata	actgagctcc	atctcacttc	ttctatgaat	1560
aaacaaagga	tgttatgata	tattaacact	ctatctatgc	accttattgt	tctatgataa	1620
atttcctctt	attattataa	atcatctgaa	tcgtgacggc	ttatggaatg	cttcaaatag	1680
tacaaaaaca	aatgtgtact	ataagacttt	ctaaacaatt	ctaaccttag	cattgtgaac	1740
gagacataag	tgtaagaag	acataacaat	tataatggaa	gaagtttgtc	tccatttata	1800
tattatatat	taccactta	tgtattatat	taggatgtta	aggagacata	acaattataa	1860
agagagaagt	ttgtatccat	ttatatatta	tatactaccc	atttatatat	tatacttatac	1920
cacttattta	atgtctttat	aaggtttgat	ccatgatatt	tctaataatt	tagttgatat	1980
gtatatgaaa	gggtactatt	tgaactctct	tactctgtat	aaaggttggg	tcatccttaa	2040
agtgggtcta	tttaatttta	ttgcttctta	cagataaaaa	aaaaattatg	agttggtttg	2100
ataaaatatt	gaaggattta	aaataataat	aaataacata	taatatatgt	atataaattt	2160
attataatat	aacatttatc	tataaaaaag	taaatattgt	cataaatcta	tacaatcggt	2220
tagccttgct	ggacgaatct	caattattta	aacgagagta	aacatatttg	actttttggt	2280
tatttaacaa	attattattt	aacactatat	gaaatttttt	tttttatcag	caaagaataa	2340
aattaaatta	agaaggacaa	tggtgtccca	atccttatac	aaccaacttc	cacaagaaag	2400
tcaagtcaga	gacaacaaaa	aaacaagcaa	aggaaatttt	ttaatttgag	ttgtcttggt	2460
tgctgcataa	tttatgcagt	aaaacactac	acataaccct	tttagcagta	gagcaatggt	2520
tgaccgtgtg	cttagcttct	tttattttat	ttttttatca	gcaaagaata	aataaaataa	2580
aatgagacac	ttcagggatg	tttcaacaag	cttggcgcgc	cgttctatag	tgtcacctaa	2640
atcgtatgtg	tatgatacat	aaggttatgt	attaattgta	gccgcgttct	aacgacaata	2700
tgcccatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	cgcatagtta	agccagcccc	2760
gacaccgcgc	aacaccgcgt	gacgcgcctt	gacgggcttg	tctgctcccg	gcataccgctt	2820

acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcattgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	2880
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggtt aatgtcatga	2940
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca	3000
aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac	3060
caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg	3120
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag	3180
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac	3240
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	3300
taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttgg	3360
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa agcgccacgc	3420
ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc	3480
gcacgaggga gcttccaggg gaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc	3540
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa	3600
acgccagcaa cggggccttt ttacgggttc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt	3660
tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg	3720
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag	3780
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgccc gattcattaa tgcagggtga	3840
tcagatctcg atcccgcgaa attaatcga ctactatag ggagaccaca acggtttccc	3900
tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac ccatggaaaa gcctgaactc	3960
accgcgacgt ctgtcgagaa gtttctgatc gaaaagttcg acagcgtctc cgacctgatg	4020
cagctctcgg agggcgaaga atctcgtgct ttcagcttcg atgtaggagg gcgtggatat	4080
gtcctgcggg taaatagctg cgcgatggg ttctacaaag atcggttatgt ttatcggcac	4140
tttgcacgg ccgcgctccc gattccggaa gtgcttgaca ttggggaatt cagcgagagc	4200
ctgacctatt gcattctccc ccgtgcacag ggtgtcacgt tgcaagacct gcctgaaacc	4260
gaactgcccg ctgttctgca gccggtcgcg gaggctatgg atgcgatcgc tcgggccgat	4320
cttagccaga cgagcgggtt cggcccatte ggaccgcaag gaatcgggtca atacactaca	4380
tggcgtgatt tcatatgcgc gattgctgat ccccatgtgt atcactggca aactgtgatg	4440
gacgacaccg tcagtgcgtc cgtcgcgcag gctctcgatg agctgatgct ttgggccgag	4500
gactgccccg aagtcgggca cctcgtgcac gcggatttcg gctccaacaa tgtcctgacg	4560
gacaatggcc gcataacagc ggtcattgac tggagcgagg cgatgttcgg ggattcccaa	4620

tacgaggtcg ccaacatctt cttctggagg ccgtggttg cttgtatgga gcagcagacg	4680
cgctacttcg agcggaggca tccggagctt gcaggatcgc cgcggctccg ggcgtatatg	4740
ctccgcattg gtcttgacca actctatcag agcttggttg acggcaattt cgatgatgca	4800
gcttggggcg agggtcgatg cgacgcaatc gtccgatccg gagccgggac tgtcgggcgt	4860
acacaaatcg cccgcagaag cgcggccgtc tggaccgatg gctgtgtaga agtactcgcc	4920
gatagtggaa accgacgccc cagcactcgt ccgagggcaa aggaatagtg aggtacagct	4980
tggatcgatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct	5040
gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttgctg	5100
aaaggaggaa ctatatccgg atgatcgggc gcgcgcgcga cggatccgta cgcaaaggca	5160
aagatttaaa ctcgaaaaca ttacaaaagt ctcaaaacag aggcaaggcc atgcacaaag	5220
cacactctaa gtgcttccat tgcctactaa gtagggtacg tacacgatca ccattcacca	5280
gtgatgatct ttattaatat acaacacact cagagacagc ttatgttata gctagctagc	5340
ataaactatc acatcatgtg ttagtacgac aagtgacaac attgctttta acttcgcggc	5400
cttgatcct ctgaccgga tataatgagc cgtaaacaaa gatgattaag tagtaattaa	5460
tacgtactag taaaagtggc aaaagataac gagaaagaac caatttcttt gcattcggcc	5520
ttagcggaag gcatatataa gctttgatta ttttathtag tgtaatgatt tcgtacaacc	5580
aaagcattta tttagtactc tcacacttgt gtcgcggccg cgaattcact agtgattcct	5640
tatagagcct tccccgcggg ttgcttctcc gccatccggg cgaacaccgc cagatagcgc	5700
agcaggatga ccaacccttc atggggcagc gggttccgat acggcaggtt gtgcttctgg	5760
cacagctgtt ccacctggtg gctaaccgct gtcaggttgt ggcgagggag ggtcggccac	5820
aaatgggtgct caatctggtg attcaagcct ccgaaaaacc aatctgtgat aatccctcgc	5880
cgaatgttca tgggtctcatg gatctggcca accgagaatc catggccatc ccagactgag	5940
tccccgatct tctccagtgg gtagtggttc atgaacacca cgatcgcaat gccgaagccg	6000
ccaaccagct ccgaaacgaa aaacaccaac agcgatgtga ggatgctggg cataaagaat	6060
aagtggaaca gggctctcaa ggtccagtgc agggcgaggc caatggcctc cttcttatac	6120
tgagagcgat agaattggtt atctctgtcc ttcaaactgc gcacggtcaa cacgctctgg	6180
aaacaccaaa tgaaccgcaa caagatacag atgaccaaga aatagtactg ctggaactga	6240
atgagcttgc gggaaatcgg tgacgccgt gtgacgtcat cctcagacca ggctaagagg	6300
gggaggttgt caatatcagg gtcgtgccct tgaacattgg ttgccgaatg atgtgcattg	6360
tgtctgtcct tccaccatgt cacggaaaaa ccttgacagc cattgccaaa taccagtccc	6420
acgaggttgt tccagttccg gttcttgaaa gtctggtggt ggcaaatgtc atgagaaagc	6480

cagcccatct gttgatagtg catcccaagc aacactgccc caatgaaata catctgatac	6540
tgaaccatca ggaaataaacc cagcactcca aggccagtg tgggtgctgat tttgtatgag	6600
taccagaggg gggaggcatc aaacatgcc a gttgcatca actcttctcg gagcttccgg	6660
aaatcctctt gagcttcatt cactgcagcc tgggggtggca actcagaact gggattgatt	6720
ttgggcatgc gcttgagctt gtcgaaggct tcttgagagt gcataacat gaaggcatca	6780
gtggcatccc ttccttggt a ttctctata atttccgcac caccagggtg gaaattgacc	6840
caggcagaca catcatatgt tgttccatca attgtaaggg gaagcgcttg gcgctttgac	6900
ttcatttcaa tcgaattccc gcggccgctt ggggggctat ggaagacttt cttagttagt	6960
tgtgtgaata agcaatgttg ggagaatcg gactacttat aggataggaa taaaacagaa	7020
aagtattaag tgctaataa atatttagac tgataattaa aatcttcacg tatgtccact	7080
tgatataaaa acgtcaggaa taaaggaagt acagtagaat ttaaaggtag tctttttata	7140
tatacccggtg ttctcttttt ggctagctag ttgcataaaa aataatctat atttttatca	7200
ttatttttaa tatcttatga gatggtaa atttatcata atttttttta ctattattta	7260
ttatttgtgt gtgtaataca tatagaagtt aattacaaat tttatttact ttttcattat	7320
tttgatagga ttcaccatta atttagtgtt attatttata atagttcatt ttaatctttt	7380
tgtatatatt atgcgtgcag tacttttttc ctacatataa ctactattac attttattta	7440
tataaatatt ttattaatga attttcgtga taatatgtaa tattgttcat tattatttca	7500
gattttttta aaatatttgt gttattattt atgaaatatg taattttttt agtatttgat	7560
tttatgatga taaagtgttc taaattcaaa agaaggggga aagcgtaaac attaaaaaac	7620
gtcatcaaac aaaaacaaaa tcttggtaat aaagataaaa ctgtttgttt tgatcactgt	7680
tatttcgtaa tataaaaaca ttatttatat ttatattggt gacaacaaa tttgcctatc	7740
aaatctaacc aatataatgc atgcgtggca ggtaatgtac taccatgaac ttaagtcatg	7800
acataataaa ccgtgaatct gaccaatgca tgtacctanc taaattgtat ttgtgacacg	7860
aagcaaatga ttcaattcac aatggagatg ggaaacaaat aatgaagaac ccagaactaa	7920
gaaagctttt ctgaaaaata aaataaaggc aatgtcaaaa gtatactgca tcatcagtc	7980
agaaagcaca tgatatTTTT ttatcagtat caatgcagct agttttattt tacaatatcg	8040
atatagctag tttaaataa ttgcagctag atttataaat atttgtgtta ttatttatca	8100
tttgtgtaat cctgttttta gtattttagt ttatatatga tgataatgta ttccaaattt	8160
aaaagaaggg aaataaattt aaacaagaaa aaaagtcac aaacaaaaaa caaatgaaag	8220
ggtggaaaga tgttaccatg taatgtgaat gttacagtat ttcttttatt atagagttaa	8280

```

caaattaact aatatgattt tgttaataat gataaaatat tttttttatt attatttcat 8340
aatataaaaa tagtttactt aatataaaaa aaattctatc gttcacaaca aagttggcca 8400
cctaatttaa ccatgcatgt acccatggac catattaggt aaccatcaaa cctgatgaag 8460
agataaagag atgaagactt aagtcataac acaaaacat aaaaaacaaa aatacaatca 8520
accgtcaatc tgaccaatgc atgaaaaagc tgcaatagtg agtggcgaca caaagcacat 8580
gatttttcta caacggagat aaaacaaaaa aaatatttca tgaacaacct agaacaata 8640
aagcttttat ataataaata tataaataaa taaaggctat ggaataatat acttcaatat 8700
atttgatta aataaattgt tggcggggtt gatatattta tacacacct aagtcacttc 8760
aatctcattt tcacttaact tttatttttt ttttcttttt atttatcata aagagaatat 8820
tgataatata ctttttaaca tatttttatg acatttttta ttggtgaaaa cttattaata 8880
atcataaatt ttgtaagtta gattttatta aagagttcct cttcttattt taaatttttt 8940
aataaatttt taaataacta aaatttgtgt taaaaatgtt aaaaaatgtg ttattaaccc 9000
ttctcttcga ggac 9014

```

<210> 88

<211> 5561

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR767

<400> 88

```

catggtcaat caatgagacg ccaacttctt aatctattga gacctgcagg tctagaaggg 60
cggatccccg ggtaccgagc tgaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg 120
aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc 180
gtaatagcga agaggcccg cccgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 240
aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcattctgt cggattttca caccgcatat 300
ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagccc cgacacccgc 360
caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgtccc ggcatccgct tacagacaag 420
ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg 480
cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg 540
tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat 600
ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc 660
aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct 720
tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctacccaga aacgctggtg aaagtaaaag 780

```

atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc aacagcggta	840
agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagtgc	900
tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgcccggca agagcaactc ggtcgccgca	960
tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg	1020
atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg	1080
ccaacttact tctgacaacg atcggaggag cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca	1140
tgggggatca tgtaactcgc cttgatcggt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa	1200
acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcg aaactattaa	1260
ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata	1320
aagttgcagg accacttctg cgctcgcccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat	1380
ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggtt tcattgcagc actggggcca gatggtaagc	1440
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata	1500
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt	1560
actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTTA atttaaaagg atctaggtga	1620
agatcctttt tgataatctc atgacccaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag	1680
cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa	1740
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag	1800
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg	1860
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat	1920
acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta	1980
ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg	2040
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc	2100
gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaa ggcggacagg tatccggtaa	2160
gcggcagggc cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc	2220
tttatagtcc tgcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt	2280
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttgccct	2340
tttgctggcc ttttgctcac atgttcttcc ctgcgttacc ccctgattct gtggataacc	2400
gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc ctgcgccgag ccgaacgacc gagcgagcg	2460
agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt	2520
ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccg ctggaaagcg ggcagtgagc	2580

gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc	2640
ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagct	2700
atgaccatga ttacgccaag cttgcatgcc tgcaggctag cctaagtacg tactcaaaat	2760
gccaacaaat aaaaaaaaaag ttgctttaat aatgccaaaa caaattaata aaacacttac	2820
aacaccggat tttttttaat taaaatgtgc catttaggat aaatagttaa tttttttaat	2880
aattatttaa aaagccgtat ctactaaaat gatttttatt tggttgaaaa tattaatatg	2940
tttaaatcaa cacaatctat caaaattaaa ctaaaaaaaa aataagtgtg cgtgggtaac	3000
attagtacag taatataaga ggaaaatgag aaattaagaa attgaaagcg agtctaattt	3060
ttaaattatg aacctgcata tataaaagga aagaaagaat ccaggaagaa aagaaatgaa	3120
accatgcatg gtccctcgt catcacgagt ttctgccatt tgcaatagaa aactgaaac	3180
acctttctct ttgtcactta attgagatgc cgaagccacc tcacaccatg aacttcatga	3240
ggtgtagcac ccaaggcttc catagccatg catactgaag aatgtctcaa gctcagcacc	3300
ctacttctgt gacgtgtccc tcattcacct tcctctcttc cctataaata accacgcctc	3360
aggttctccg cttcacaact caaacattct ctccattggg ccttaaacac tcatcagtca	3420
tcaccgcggc cgcattggga cggaccaagg aaaaaccttc acctgggaag agctggcggc	3480
ccataacacc aaggacgacc tactcttggc catccgcggc aggggtgtacg atgtcacaaa	3540
gttcttgagc cgccatcctg gtggagtgga cactctcctg ctcggagctg gccgagatgt	3600
tactccggtc tttgagatgt atcacgcgtt tggggctgca gatgccatta tgaagaagta	3660
ctatgtcggg aactcggctc cgaatgagct gccatcttc ccggagccaa cgggtgtcca	3720
caaaaccatc aagacgagag tcgagggcta ctttacggat cggaacattg atcccaagaa	3780
tagaccagag atctggggac gatacgtct tatctttgga tccttgatcg ctccctacta	3840
cgcgcagctc tttgtgcctt tcgttgctga acgcacatgg cttcaggtgg tgtttgcaat	3900
catcatggga tttgcgtgcg cacaagtcgg actcaaccct cttcatgatg cgtctcactt	3960
ttcagtgacc cacaaccca ctgtctggaa gattctggga gccacgcacg actttttcaa	4020
cggagcatcg tacctgggtg ggatgtacca acatatgctc ggccatcacc cctacaccaa	4080
cattgctgga gcagatccc acgtgtcgac gtctgagccc gatgttcgtc gtatcaagcc	4140
caacaaaaag tggtttgta accacatcaa ccagcacatg tttgttcctt tcctgtacgg	4200
actgctggcg ttcaaggtgc gcattcagga catcaacatt ttgtactttg tcaagaccaa	4260
tgacgctatt cgtgtcaatc ccatctcgac atggcacact gtgatgttct ggggcggcaa	4320
ggctttcttt gtctggatc gcctgattgt tccctgcag tatctgcccc tgggcaaggt	4380
gctgctcttg ttcacggctg cggacatggg gtcgtcttac tggctggcgc tgacctcca	4440

```

ggcgaaccac gttgttgagg aagttcagtg gccgttgccct gacgagaacg ggatcatcca 4500
aaaggactgg gcagctatgc aggtcgagac tacgcaggat tacgcacacg attcgcacct 4560
ctggaccagc atcactggca gcttgaacta ccaggctgtg caccatctgt tccccaacgt 4620
gtcgcagcac cattatcccg atattctggc catcatcaag aacacctgca gcgagtacaa 4680
ggttccatac cttgtcaagg atacgttttg gcaagcattt gcttcacatt tggagcactt 4740
gcgtgttctt ggactccgtc ccaaggaaga gtaggcggcc gcatttcgca ccaaataaat 4800
gaaagtaata atgaaaagtc tgaataagaa tacttaggct tagatgcctt tgttacttgt 4860
gtaaaataac ttgagtcatg tacctttggc ggaaacagaa taaataaaag gtgaaattcc 4920
aatgctctat gtataagtta gtaataacta atgtgttcta cggttgtttc aatatcatca 4980
aactctaatt gaaacttttag aaccacaaat ctcaatcttt tcttaatgaa atgaaaaatc 5040
ttaattgtac catgtttatg ttaaacacct tacaattggg tggagaggag gaccaaccga 5100
tgggacaaca ttgggagaaa gagattcaat ggagatttgg ataggagaac aacattcttt 5160
ttcacttcaa tacaagatga gtgcaacact aaggatatgt atgagacttt cagaagctac 5220
gacaacatag atgagtgagg tggtgattcc tagcaagaaa gacattagag gaagccaaaa 5280
tcgaacaagg aagacatcaa gggcaagaga caggaccatc catctcagga aaaggagctt 5340
tgggatagtc cgagaagttg tacaagaaat tttttggagg gtgagtgatg cattgctggg 5400
gactttaact caatcaaaat tgagaaagaa agaaaaggga gggggctcac atgtgaatag 5460
aagggaaacg ggagaatatt acagttttga tctaattggc atcccagcta gtggtaacat 5520
attcaccatg tttaaccttc acgtacgtct agaggatccc c 5561

```

<210> 89
 <211> 11889
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido pKR916

<220>
 10 <221> característica_misc
 <222> (7810)..(7810)
 <223> n es a, c, g, o t

```

<400> 89
ggagatccaa gcttttgatc catgcccttc atttgccgct tattaattaa tttggtaaca 60
gtccgtacta atcagttact tacccttccc ccatcataat taatcttggg agtctcgaat 120
gccacaacac tgactagtct cttggatcat aagaaaaagc caaggaacaa aagaagacaa 180

```

aacacaatga gagtatcctt tgcatagcaa tgtctaagtt cataaaaattc aaacaaaaaac	240
gcaatcacac acagtggaca tcacttatcc actagctgat caggatcgcc gcgtcaagaa	300
aaaaaaactg gacccccaaa gccatgcaca acaacacgta ctcaaaaagg tgtcaatcga	360
gcagcccaaa acattcacca actcaaccca tcatgagccc tcacatttgt tgtttctaac	420
ccaacctcaa actcgtattc tcttcgccca cctcattttt gtttatttca acacccgta	480
aactgcatgc caccctgtgg ccaaattgtcc atgcatgtta acaagaccta tgactataaa	540
tagctgcaat ctcgccccag gttttcatca tcaagaacca gttcaatata ctagtacacc	600
gtattaaaga atttaagata tactgcggcc gcacccatgga ggtggtgaat gaaatagtct	660
caattgggca ggaagtttta cccaaagttg attatgccca actctggagt gatgccagtc	720
actgtgaggt gctttacttg tccatcgcat ttgtcatctt gaagttcact ctggccccc	780
ttggtccaaa aggtcagtct cgtatgaagt ttgttttcac caattacaac cttctcatgt	840
ccatttattc gttgggatca ttctctcaa tggcatatgc catgtacacc atcggtgtta	900
tgtctgacaa ctgcgagaag gcttttgaca acaacgtctt caggatcacc acgcagttgt	960
tctatttgag caagttcctg gagtatattg actccttcta ttgccactg atgggcaagc	1020
ctctgacctg gttgcaattc ttccatcatt tgggggcacc gatggatatg tggctgttct	1080
ataattaccg aaatgaagct gtttgattt ttgtgctgtt gaatggtttc atccactgga	1140
tcattgacgg ttattattgg accagattga tcaagctgaa gttcccatg ccaaaatccc	1200
tgattacatc aatgcagatc attcaattca atgttggttt ctacattgtc tggaagtaca	1260
ggaacattcc ctgttatcgc caagatggga tgaggatgtt tggctggttc ttcaattact	1320
tttatgttgg cacagtcttg tgtttgttct tgaatttcta tgtgcaaacg tatatcgta	1380
ggaagcaciaa gggagccaaa aagattcagt gagcgccgc aagtatgaac taaaatgcat	1440
gtaggtgtaa gagctcatgg agagcatgga atattgtatc cgacccatgta acagtataat	1500
aactgagctc catctcactt cttctatgaa taaacaaagg atgttatgat atattaacac	1560
tctatctatg caccttattg ttctatgata aatttcctct tattattata aatcatctga	1620
atcgtgacgg cttatggaat gttcaaata gtacaaaaac aaatgtgtac tataagactt	1680
tctaaacaat tctaacctta gcattgtgaa cgagacataa gtgttaagaa gacataacaa	1740
ttataatgga agaagtttgt ctccatttat atattatata ttaccactt atgtattata	1800
ttaggatgtt aaggagacat aacaattata aagagagaag tttgtatcca ttatatatt	1860
atatactacc catttatata ttatacttat ccacttattt aatgtcttta taagggttga	1920
tccatgatat ttctaataat ttagttgata tgtatatgaa aggttactat ttgaactctc	1980
ttactctgta taaagggttg atcatcctta aagtgggtct atttaatttt attgcttctt	2040

acagataaaa	aaaaaattat	gagttgggtt	gataaaatat	tgaaggattt	aaaataataa	2100
taaataacat	ataatatatg	tatataaatt	tattataata	taacatttat	ctataaaaaa	2160
gtaaatattg	tcataaatct	atacaatcgt	ttagccttgc	tggacgaatc	tcaattattt	2220
aaacgagagt	aaacatat	gacttttttg	ttatttaaca	aattattatt	taacactata	2280
tgaaattttt	ttttttatca	gcaaagaata	aaattaaatt	aagaaggaca	atggtgtccc	2340
aatccttata	caaccaactt	ccacaagaaa	gtcaagtcag	agacaacaaa	aaaacaagca	2400
aaggaaattt	tttaatttga	gttgtcttgt	ttgctgcata	atttatgcag	taaaacacta	2460
cacataaccc	tttttagcagt	agagcaatgg	ttgaccgtgt	gcttagcttc	ttttatttta	2520
tttttttatc	agcaaagaat	aaataaaaata	aaatgagaca	cttcagggat	gtttcaacaa	2580
gcttggcgcg	ccgttctata	gtgtcaccta	aatcgtatgt	gtatgataca	taaggttatg	2640
tattaattgt	agccgcgttc	taacgacaat	atgtccatat	ggtgcactct	cagtacaatc	2700
tgctctgatg	ccgcatagtt	aagccagccc	cgacacccgc	caacacccgc	tgacgcgccc	2760
tgacgggctt	gtctgtctcc	ggcatccgct	tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	2820
tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	ccgaaacgcg	cgagacgaaa	gggcctcggtg	2880
atacgcctat	ttttataggt	taatgtcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcggttc	2940
cactgagcgt	cagaccccgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	3000
cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgccg	3060
gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	3120
aatactgtcc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	3180
cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	3240
tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	3300
acgggggggt	cgtgcacaca	gccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	3360
ctacagcgtg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	3420
ccggtaaagc	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	3480
tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	3540
tgctcgctcag	gggggaggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	3600
ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	3660
gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgaagt	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	3720
cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	3780
gcgcgttggc	cgattcatta	atgcaggttg	atcagatctc	gatcccgcca	aattaatacg	3840

actcactata	gggagaccac	aacggtttcc	ctctagaaat	aattttgttt	aactttaaga	3900
aggagatata	cccatggaaa	agcctgaact	caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	3960
cgaaaagttc	gacagcgtct	ccgacctgat	gcagctctcg	gagggcgaag	aatctcgtgc	4020
tttcagcttc	gatgtaggag	ggcgtggata	tgtcctgcgg	gtaaatagct	gcgccgatgg	4080
tttctacaaa	gatcgttatg	tttatcggca	ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	4140
agtgcctgac	attggggaat	tcagcgagag	cctgacctat	tgcctctccc	gccgtgcaca	4200
gggtgtcacg	ttgcaagacc	tgcttgaaac	cgaactgccc	gctgttctgc	agccggctgc	4260
ggaggctatg	gatgcgatcg	ctgcggccga	tcttagccag	acgagcgggt	tcggcccatt	4320
cggaccgcaa	ggaatcggtc	aatacactac	atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgctga	4380
tccccatgtg	tatcactggc	aaactgtgat	ggacgacacc	gtcagtgcgt	ccgtcgcgca	4440
ggctctcgat	gagctgatgc	tttgggccga	ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	4500
cgcggatttc	ggctccaaca	atgtcctgac	ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	4560
ctggagcgag	gcgatgttcg	gggattccca	atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	4620
gccgtggttg	gcttgtatgg	agcagcagac	gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	4680
tgcaggatcg	ccgcggctcc	gggcgtatat	gctccgcatt	ggtcttgacc	aactctatca	4740
gagcttggtt	gacggcaatt	tcgatgatgc	agcttgggcg	cagggtcgat	gcgacgcaat	4800
cgtccgatcc	ggagccggga	ctgtcggggc	tacacaaatc	gcccgcagaa	gcgcggccgt	4860
ctggaccgat	ggctgtgtag	aagtactcgc	cgatagtgga	aaccgacgcc	ccagcactcg	4920
tccgagggca	aaggaatagt	gaggtacagc	ttggatcgat	ccggctgcta	acaaagcccg	4980
aaaggaagct	gagttggctg	ctgccaccgc	tgagcaataa	ctagcataac	cccttggggc	5040
ctctaaacgg	gtcttgaggg	gttttttgct	gaaaggagga	actatatccg	gatgatcggg	5100
cgcgccgtcg	acggatccgt	acgcaaaggc	aaagatttaa	actcgaaaac	attacaaaag	5160
tctcaaaaca	gaggcaaggc	catgcacaaa	gcacactcta	agtgcttcca	ttgcctacta	5220
agtagggtag	gtacacgatc	accattcacc	agtgatgata	tttattaata	tacaacacac	5280
tcagagacag	cttatgttat	agctagctag	cataaactat	cacatcatgt	gttagtacga	5340
caagtgacaa	cattgctttt	aacttcgcgg	ccttggatcc	tctagaccgg	atataatgag	5400
ccgtaaaaca	agatgattaa	gtagtaatta	atacgtacta	gtaaaagtgg	caaaagataa	5460
cgagaaagaa	ccaatttctt	tgcatcggc	cttagcggaa	ggcatatata	agctttgatt	5520
attttattta	gtgtaatgat	ttcgtacaac	caaagcattt	atttagtact	ctcacacttg	5580
tgtcgcggcc	gcgaattcac	tagtgattcc	ttatagagcc	ttccccgcgg	gttgcttctc	5640
cgccatccgg	gcgaacaccg	ccagatagcg	cagcaggatg	accaaccctt	catggggcag	5700

cggttccga	tacggcaggt	tgtgcttctg	gcacagctgt	tccacctggt	agctaaccgc	5760
tgctcaggtg	tggcgaggga	gggtcggcca	caaagtgtgc	tcaatctggt	aattcaagcc	5820
tccgaaaaac	caatctgtga	taatccctcg	ccgaatgttc	atggtctcat	ggatctggcc	5880
aaccgagaat	ccatggccat	cccagactga	gtccccgata	ttctccagtg	ggtagtggtt	5940
catgaacacc	acgatcgcaa	tgccgaagcc	gcccaaccagc	tccgaaacga	aaaacaccaa	6000
cagcgatgtg	aggatgctgg	gcataaagaa	taagtggaa	agggtcttca	aggccagtg	6060
cagggcgagg	ccaatggcct	ccttcttata	ctgagagcga	tagaattggt	tatctctgtc	6120
cttcaaactg	cgcacggtca	acacgctctg	gaaacaccaa	atgaaccgca	acaagatata	6180
gatgaccaag	aaatagtact	gctggaactg	aatgagcttg	cgggaaatcg	gtgacgccc	6240
tgtgacgtca	tcctcagacc	aggctaagag	ggggagggtg	tcaatatcag	ggcgtgccc	6300
ttgaacattg	gttgccgaat	gatgtgcatt	gtgtctgtcc	ttccaccatg	tcacggaaaa	6360
accttgacga	ccattgccaa	ataccagtcc	cacgaggttg	ttccagttcc	ggttcttgaa	6420
agtctggtgg	tggcaaagt	catgagaaa	ccagcccata	tgttgatagt	gcataccaa	6480
caacactgcc	ccaatgaaat	acatctgata	ctgaaccata	aggaaataac	ccagcactcc	6540
aaggcccagt	gtggtgctga	tttgtatga	gtaccagagg	ggggaggcat	caaacatgcc	6600
agttgcgata	aactcttctc	ggagcttccg	gaaatcctct	tgagcttcat	tactgcagc	6660
ctgggggtgg	aactcagaac	tgggattgat	tttgggcatg	cgcttgagct	tgtcgaaggc	6720
ttcttgagag	tgcataacca	tgaaggcata	agtggcatac	cttccttggt	aattctctat	6780
aatttccgca	ccaccagggt	ggaaattgac	ccaggcagac	acatcatatg	ttgttccatc	6840
aattgtaagg	ggaagcgctt	ggcgctttga	cttcatttca	atcgaattcc	cgcggccgct	6900
tggggggcta	tgggaagactt	tcttagttag	ttgtgtgaat	aagcaatgtt	gggagaatcg	6960
ggactactta	taggatagga	ataaaacaga	aaagtattaa	gtgctaata	aatatttaga	7020
ctgataatta	aaatcttcac	gtatgtccac	ttgatataaa	aacgtcagga	ataaaggaag	7080
tacagtagaa	tttaaaggta	ctctttttat	atatacccg	gttctctttt	tggctagcta	7140
gttgcataaa	aaataatcta	tattttttat	attattttta	atatcttatg	agatggtaaa	7200
tatttatcat	aatttttttt	actattattt	attatttgtg	tgtgtaatac	atatagaagt	7260
taattacaaa	ttttatttac	tttttcatta	ttttgatatg	attcaccatt	aatttagtgt	7320
tattatttat	aatagttcat	tttaatcttt	ttgtatatat	tatgcgtgca	gtactttttt	7380
cctacatata	actactatta	cattttattt	atataatatt	tttattaatg	aattttcgtg	7440
ataatatgta	atattgttca	ttattatttc	agatttttta	aaaatatttg	tgttattatt	7500

tatgaaatat gtaatTTTT tagtatttga ttttatgatg ataaagtgtt ctaaattcaa	7560
aagaaggggg aaagcgtaaa cattaataaaa cgtcatcaaa caaaaacaaa atcttggttaa	7620
taaagataaaa actgtttgtt ttgatcactg ttatttcgta atataaaaac attattttata	7680
tttatattgt tgacaaccaa atttgcctat caaatctaac caatataatg catgcgtggc	7740
aggtaatgta ctaccatgaa cttaagtcac gacataataa accgtgaatc tgaccaatgc	7800
atgtacctan ctaaattgta tttgtgacac gaagcaaatg attcaattca caatggagat	7860
gggaaacaaa taatgaagaa cccagaacta agaaagcttt tctgaaaaat aaaataaagg	7920
caatgtcaaa agtatactgc atcatcagtc cagaaagcac atgatatttt tttatcagta	7980
tcaatgcagc tagttttatt ttacaatata gatatagcta gtttaaatat attgcagcta	8040
gatttataaa tatttgtgtt attattttatc atttgtgtaa tcttgttttt agtatttttag	8100
tttatatatg atgataatgt attccaaatt taaaagaagg gaaataaatt taaacaagaa	8160
aaaaagtcac caaacaaaaa acaaatgaaa ggggtggaaag atgttaccat gtaatgtgaa	8220
tgttacagta tttcttttat tatagagtta acaaattaac taatatgatt ttgttaataa	8280
tgataaaata ttttttttat tattatttca taatataaaa atagtttact taatataaaa	8340
aaaattctat cgttcacaac aaagttggcc acctaattta accatgcatg taccatgga	8400
ccatattagg taaccatcaa acctgatgaa gagataaaga gatgaagact taagtcataa	8460
cacaaaacca taaaaaacaa aaatacaatc aacogtcaat ctgaccaatg catgaaaaag	8520
ctgcaatagt gagtggcgac acaagcaca tgattttctt acaacggaga taaaaccaa	8580
aaaatatttc atgaacaacc tagaacaat aaagctttta tataataaat atataaataa	8640
ataaaggcta tggaataata tacttcaata tatttggatt aaataaattg ttggcgggg	8700
tgatatattt atacacacct aaagtcactt caatctcatt ttcacttaac tttattttt	8760
tttttctttt tatttatcat aaagagaata ttgataatat actttttaac atatttttat	8820
gacatttttt attggtgaaa acttattaaa aatcataaat tttgtaagtt agatttattt	8880
aaagagttcc tcttcttatt ttaaattttt taataaattt ttaaataact aaaatttgtg	8940
ttaaaaatgt taaaaaatgt gttattaacc cttctcttcg aggacgtacg agatccggcc	9000
ggccagatcc tgcaggcttc aatagattaa gaagttggcg tctcattgat tgaccatggg	9060
ggatcctcta gacgtacgtg aagggttaaac atggtgaata tgttaccact agctgggatg	9120
cccattagat caaaactgta aaattctccc gtttcccttc tattcacatg tgagccccct	9180
cccttttctt tctttctcaa ttttgattga gttaaagtca ccagcaatgc atcactcacc	9240
ctccaaaaaa tttcttgtag aacttctcgg actatcccaa agctcctttt cctgagatgg	9300
atggtcctgt ctcttgccct tgatgtcttc cttgttcgat tttggcttcc tctaattgtc	9360

ttcttgctag	gaatcaccac	ctcactcatc	tatgttgctg	tagcttctga	aagtctcata	9420
catatectta	gtgttgcaact	catcttgat	tgaagtga	aagaatgtg	ttctcctatc	9480
caaactctca	ttgaatctct	ttctcccaat	gttgctccat	cggttggtcc	tcctctccaa	9540
ccaattgtaa	ggtgtttaac	ataaacatgg	tacaattaag	atctttcatt	tcattaagaa	9600
aagattgaga	tttgtggttc	taaagtttca	attagagttt	gatgatattg	aaacaaccgt	9660
agaacacatt	aagtattact	aacttatata	tagagcattg	gaatttcacc	ttttatttat	9720
tctgtttccg	ccaaaggtag	atgactcaag	ttattttaca	caagtaacaa	aggcatctaa	9780
gcctaagtat	tcttattcag	acttttcatt	attactttca	ttgatttggg	gcgaaatgcg	9840
gcgcctact	cttccttggg	acggagtcca	agaacacgca	agtgtccaa	atgtgaagca	9900
aatgcttgcc	aaaacgtatc	cttgacaagg	tatggaacct	tgtactcgct	gcaggtgttc	9960
ttgatgatgg	ccagaatata	gggataatgg	tgctgcgaca	cggtggggaa	cagatgggtc	10020
acagcctggt	agttcaagct	gccagtgatg	ctgggtccaga	ggtgcgaatc	gtgtgcgtaa	10080
tcctgcgtag	tctcgacctg	catagctgcc	cagtcctttt	ggatgatccc	gttctcgtca	10140
ggcaacggcc	actgaacttc	ctcaacaacg	tggttcgcct	ggaaggctcag	cgccagccag	10200
taagacgaca	ccatgtccgc	gaccgtgaac	aagagcagca	ccttgcccag	gggcagatac	10260
tgcaagggaa	caatcaggcg	ataccagaca	aagaaagcct	tgccgccccca	gaacatcaca	10320
gtgtgccatg	tcgagatggg	attgacacga	atagcgtcat	tggtcttgac	aaagtacaaa	10380
atgttgatgt	cctgaatgcg	caccttgaac	gccagcagtc	cgtaacaggaa	aggaacaaac	10440
atgtgctggt	tgatgtggtt	gacaaaccac	ttttggttgg	gcttgatacg	acgaacatcg	10500
ggctcagacg	tcgacacgtc	gggatctgct	ccagcaatgt	tggtgtaggg	gtgatggccg	10560
agcatatgtt	ggtacatcca	caccaggtag	gatgctccgt	tgaaaaagtc	gtgcgtggct	10620
cccagaatct	tccagacagt	ggggttgtgg	gtcactgaaa	agtgagacgc	atcatgaaga	10680
gggttgagtc	cgacttgtgc	gcacgcaa	atgatgatga	ttgcaaacac	cacctgaagc	10740
catgtgcgtt	cgacaacgaa	aggcacaag	agctgcgcgt	agtaggaagc	gatcaaggat	10800
caaagataa	gagcgtatcg	tcccagatc	tctggtctat	tcttgggatc	aatgttccga	10860
tccgtaaagt	agccctcgac	tctcgtcttg	atgggtttgt	ggaacaccgt	tggtccggg	10920
aagatgggca	gctcattcga	gaccagtgtg	ccgacatagt	acttcttcat	aatggcatct	10980
gcagcccaa	acgcgtgata	catctcaaag	accggagtaa	catctcggcc	agctccgagc	11040
aggagagtgt	ccactccacc	aggatggcgg	ctcaagaact	ttgtgacatc	gtacaccctg	11100
ccgcggatgg	ccaagagtag	gtcgtccttg	gtgttatggg	ccgccagctc	ttcccagggtg	11160

aagggtttttc cttgggtccgt tcccatgcgg ccgcggtgat gactgatgag tgtttaagga 11220
ccaatggaga gaatgtttga gttgtgaagc ggagaacctg aggcgtgggt atttataggg 11280
aagagaggaa ggtgaatgag ggacacgtca cagaagtagg gtgctgagct tgagacattc 11340
ttcagtatgc atggctatgg aagccttggg tgctacacct catgaagttc atgggtgtgag 11400
gtggcttcgg catctcaatt aagtgacaaa gagaaaggtg tttcagtgtt tctattgcaa 11460
atggcagaaa ctctgatga cgaggggacc atgcatgggt tcatttcttt tcttcctgga 11520
ttctttcttt ccttttatat atgcaggttc ataatttaaa aattagactc gctttcaatt 11580
tcttaatttc tcattttcct cttatattac tgtactaatg ttaaccacgt acacttattt 11640
tttttttagt ttaattttga tagatttgtt tgatttaaac atattaatat tttcaaccaa 11700
ataaaaaatca ttttagtaga tacggctttt taaataatta ttaaaaaatat taactattta 11760
tcctaaatgg cacattttta ttaaaaaaaaa tccgggtgtg taagtgtttt attaatgtgt 11820
tttggcatta ttaaagcaac ttttttttta tttgttgga ttttgagtac gtacttaggc 11880
tagcctgca 11889

<210> 90

<211> 5661

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR974

<400> 90

gtacgtctag aggatcccc atggtcaatc aatgagacgc caacttctta atctattgag 60
acctgcaggt ctagaagggc ggatccccgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcggt 120
ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttacccaac ttaatcgct tgcagcacat 180
ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggccgca ccgatcgccc tcccaacag 240
ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc 300
ggtattttcac accgcatatg gtgcaactct agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta 360
agccagcccc gacaccgccc aacaccgct gacgcgcct gacgggcttg tctgctcccg 420
gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca 480
ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggccctgtga tacgcctatt tttataggtt 540
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 600
ggaaccccta tttgtttatt ttcttaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 660
taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 720
cgtgtcgccc ttattccctt ttttgccgca ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa 780

acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	840
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg	900
atgagcaactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa	960
gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	1020
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	1080
atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	1140
accgcttttt tgacacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag	1200
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca	1260
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata	1320
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gtcggccct tccggtggc	1380
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gacgtgggt ctcgcggtat cattgcagca	1440
ctggggccag atggtgaagc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca	1500
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg	1560
taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	1620
tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt	1680
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	1740
cctttttttc tgccgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcggtg	1800
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga	1860
gcgcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac	1920
tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	1980
ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgga tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag	2040
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc	2100
gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaaag	2160
gcggacaggt atccggtgaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca	2220
gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt	2280
cgatttttgt gatgctcgtc aggggggacg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc	2340
tttttacggt tcttgacctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc	2400
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc	2460
cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa	2520
ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac	2580

tggaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcactca	ttaggcaccc	2640
caggctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttggtgtg	gaattgtgag	cggataacaa	2700
tttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	ttgcatgcct	gcaggctagc	2760
ctaagtacgt	actcaaaatg	ccaacaaata	aaaaaaaaagt	tgctttaata	atgccaaaac	2820
aaattaataa	aacacttaca	acaccggatt	ttttttaatt	aaaatgtgcc	atttaggata	2880
aatagttaat	atttttaata	attatttaaa	aagccgtatc	tactaaaatg	atttttat	2940
ggttgaaaat	attaatatgt	ttaaatacaac	acaatctatc	aaaattaaac	taaaaaaaaa	3000
ataagtgtac	gtggttaaca	ttagtacagt	aatataagag	gaaaatgaga	aattaagaaa	3060
ttgaaagcga	gtctaatttt	taaattatga	acctgcatat	ataaaaggaa	agaaagaatc	3120
caggaagaaa	agaaatgaaa	ccatgcatgg	tccctcgtc	atcacgagtt	tctgccattt	3180
gcaatagaaa	cactgaaaca	cctttctctt	tgtcacttaa	ttgagatgcc	gaagccacct	3240
cacaccatga	acttcatgag	gtgtagcacc	caaggcttcc	atagccatgc	atactgaaga	3300
atgtctcaag	ctcagcaccc	tacttctgtg	acgtgtccct	cattcacctt	cctctcttcc	3360
ctataaataa	ccacgcctca	ggttctccgc	ttcacaactc	aaacattctc	tccattggtc	3420
cttaaacact	catcagtcac	caccgcggcc	gccaattcat	ggccccgcag	acggagctcc	3480
gccagcgcca	cgccgcgctc	gccgagacgc	cgggtggccgg	caagaaggcc	tttaccatggc	3540
aggaggtcgc	gcagcacaac	acggcggcct	cggcctggat	cattatccgc	ggcaagggtct	3600
acgacgtgac	cgagtgggcc	aacaagcacc	ccggcgggccg	cgagatggtg	ctgctgcacg	3660
ccggtcgcga	ggccaccgac	acgttcgact	cgtaccaccc	gttcagcgac	aaggccgagt	3720
cgatcttgaa	caagtatgag	attggcacgt	tcacggggcc	gtccgagttt	ccgaccttca	3780
agccggacac	gggcttctac	aaggagtgcc	gcaagcgcg	tggcgagtac	ttcaagaaga	3840
acaacctcca	tccgcaggac	ggcttcccgg	gcctctggcg	catgatggtc	gtgtttgctg	3900
tgcgcggcct	cgccttgtag	ggcatgcact	tttcgactat	ctttgcgctg	cagctcgcgg	3960
ccgcggcgct	ctttggcgct	tgccaggcgc	tgccgctgct	ccacgtcatg	cacgactcgt	4020
cgcacgcgct	gtacaccaac	atgccgttct	tccattacgt	cgtcggccgc	tttgccatgg	4080
actggtttgc	cggcggtctg	atggtgtcat	ggctcaacca	gcacgtcgtg	ggccaccaca	4140
tctacacgaa	cgtcgcgggc	tcggacccgg	atcttccgg	caacatggac	ggcgacatcc	4200
gccgcacgt	gaaccgccag	gtgttccagc	ccatgtacgc	attccagcac	atctaccttc	4260
cgcgcgtcta	tggcgtgctt	ggcctcaagt	tccgcaccca	ggacttcacc	gacacgttcg	4320
gctcgcacac	gaacggcccc	atccgcgtca	acccgcacgc	gctctcgacg	tggatggcca	4380
tgatcagctc	caagtcgttc	tgggccttct	accgcgtgta	ccttccgctt	gccgtgctcc	4440

```

agatgcccac caagacgtac cttgcgatct tcttcctcgc cgagtttgtc acgggctggt 4500
acctcgcgtt caacttccaa gtaagccatg tctcgaccga gtgcggctac ccatgcggcg 4560
acgaggccaa gatggcgtc caggacgagt gggcagtcgc gcaggtcaag acgtcggtcg 4620
actacgecca tggctcgtgg atgacgacgt tccttgccgg cgcgctcaac taccaggtcg 4680
tgcaccactt gttccccagc gtgtcgcagt accactaccc ggcgatcgcg cccatcatcg 4740
tcgacgtctg caaggagtac aacatcaagt acgccatctt gccggacttt acggcggcgt 4800
tcgttgccca cttgaagcac ctccgcaaca tgggccagca gggcatcgcc gccacgatcc 4860
acatgggcta actcgagctc agctagatcg cggccgcatt tcgcaccaa tcaatgaaag 4920
taataatgaa aagtctgaat aagaatactt aggccttagat gcctttgtta cttgtgtaaa 4980
ataacttgag tcatgtacct ttggcggaaa cagaataaat aaaagggtgaa attccaatgc 5040
tctatgtata agttagtaat acttaatgtg ttctacggtt gtttcaatat catcaaaactc 5100
taattgaaac tttagaacca caaatctcaa tcttttctta atgaaatgaa aaatcttaat 5160
tgtaccatgt ttatgttaaa caccttacia ttaattggtt ggagaggagg accaaccgat 5220
gggacaacat tgggagaaa agattcaatg gagatttgga taggagaaca acattctttt 5280
tcacttcaat acaagatgag tgcaacacta aggatatgta tgagactttc agaagctacg 5340
acaacataga tgagttaggt ggtgattcct agcaagaaag acattagagg aagccaaaaat 5400
cgaacaagga agacatcaag ggcaagagac aggaccatcc atctcaggaa aaggagcttt 5460
gggatagtcc gagaagttgt acaagaaatt ttttggaggg tgagtgatgc attgctggtg 5520
actttaactc aatcaaaaatt gagaaagaaa gaaaaggagg ggggctcaca tgtgaataga 5580
agggaaacgg gagaatttta cagttttgat ctaatgggca tcccagctag tggtaacata 5640
ttcaccatgt ttaaccttca c 5661

```

<210> 91

<211> 5578

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR1032

<400> 91

```

ggcgcattt cgcaccaa atcaatgaaagt aataatgaaa agtctgaata agaataactta 60
ggcttagatg cctttgttac ttgtgtaaaa taacttgagt catgtacctt tggcggaaac 120
agaataaata aaagggtgaaa ttccaatgct ctatgtataa gttagtaata cttaatgtgt 180
tctacggttg tttcaatatc atcaaaactct aattgaaact ttagaaccac aaatctcaat 240

```

cttttcttaa tgaaatgaaa aatcttaatt gtaccatgtt tatgttaaac accttacaat	300
taattgggtt gagaggagga ccaaccgatg ggacaacatt gggagaaaga gattcaatgg	360
agatttggat aggagaacaa cattcttttt cacttcaata caagatgagt gcaacactaa	420
ggatatgtat gagactttca gaagctacga caacatagat gagtgaggtg gtgattccta	480
gcaagaaaga cattagagga agccaaaatc gaacaaggaa gacatcaagg gcaagagaca	540
ggaccatcca tctcaggaaa aggagctttg ggatagtccg agaagttgta caagaaattt	600
tttgagggtt gagtgatgca ttgctggtga ctttaactca atcaaaattg agaaagaaag	660
aaaagggagg gggtcacat gtgaatagaa gggaaacggg agaattttac agttttgatc	720
taatgggcat ccagctagt ggtaacatat tcaccatgtt taaccttcac gtacgtctag	780
aggatcccc atggtcaatc aatgagacgc caacttctta atctattgag acctgcaggt	840
ctagaagggc ggatccccgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc	900
gtgactggga aaacctggc gttacccaac ttaatgcct tgcagcacat cccctttcg	960
ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc	1020
tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac	1080
accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc	1140
gacacccgcc aacaaccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	1200
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	1260
cgaaacgcgc gagacgaaag ggctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga	1320
taataatggt ttcttagacg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta	1380
tttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat	1440
aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcgc	1500
ttattccctt ttttgcgga ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga	1560
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	1620
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt	1680
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg	1740
gtcgcgcgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc	1800
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata	1860
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	1920
tgacaaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag	1980
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccgttagc aatggcaaca acgttgcgca	2040
aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg	2100

aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg	2160
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag	2220
atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg	2280
aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag	2340
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga	2400
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt	2460
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc	2520
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc	2580
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac	2640
caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac	2700
cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	2760
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct	2820
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat	2880
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt	2940
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg	3000
cctggatatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt	3060
gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt	3120
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgtttttcc tgcgttatcc cctgattctg	3180
tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg	3240
agcgcgagca gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc	3300
ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg	3360
gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac	3420
actttatgct tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag	3480
gaaacagcta tgacctgat tacgccaagc ttgcatgcct gcaggctagc ctaagtacgt	3540
actcaaaatg ccaacaaata aaaaaaagt tgctttaata atgccaaaac aaattaataa	3600
aacacttaca acaccgatt ttttttaatt aaaatgtgcc atttaggata aatagttaat	3660
atttttaata attatttaa aagccgtatc tactaaaatg atttttattt ggttgaaaat	3720
attaatatgt ttaaatcaac acaatctatc aaaattaaac taaaaaaaaa ataagtgtac	3780
gtggttaaca ttagtacagt aatataagag gaaaatgaga aattaagaaa ttgaaagcga	3840
gtctaatttt taaattatga acctgcatat ataaaaggaa agaaagaatc caggaagaaa	3900

```

agaaatgaaa ccatgcatgg tccccctcgtc atcacgagtt tctgccattt gcaatagaaa 3960
cactgaaaca cctttctctt tgtaacttaa ttgagatgcc gaagccacct cacaccatga 4020
acttcatgag gtgtagcacc caaggcttcc atagccatgc atactgaaga atgtctcaag 4080
ctcagcaccc tacttctgtg acgtgtccct cattcacctt cctctcttcc ctataaataa 4140
ccacgcctca ggttctccgc ttcacaactc aaacattctc tccattgggc cttaaact 4200
catcagtcac caccggggcc gcaaaccatg gctctcagtc ttaccacaga acagctgtta 4260
gaacgccctg atttggttgc gattgatggc atcctctacg accttgaagg gcttgccaaa 4320
gttcatccag gaggagattt gattctcgtt tctggtgcct ctgatgcctc ccctctcttt 4380
tattcaatgc atccatacgt caaaccggag aattccaaat tgcttcaaca gttcgtccga 4440
gggaagcatg accgcacctc gaaggacatt gtctacacgt atgattctcc cttcgcacaa 4500
gacgttaagc ggacaatgcg cgaggatgat aaagggagga actggtagc aaccctggc 4560
ttctggtgct gcaccgttgg gatcatcgcc gtgacggcct tttgcgagtg gcaactgggt 4620
accacgggga tgggtgctgtg gggcctgttg actggattca tgcacatgca gatcggctta 4680
tccatccagc atgatgcgtc ccacggggcc atcagcaaga agccttgggt caacgccctc 4740
ttcgcctacg gcattgaagt catcggtatg tcccggtgga tttggctgca gtcgcacatc 4800
atgcggcacc acacctacac caaccagcac ggctctgacc tggatgcgga gtcggcagag 4860
ccgttcttgg tggtccacaa ctaccccgcc gcaaaccacg cccgaaagtg gttccaccgc 4920
ttccaagctt ggtacatgta ccttgtgctg ggggcatacg gggatcgct ggtgtacaac 4980
ccgctctaca ttttccggat gcagcacaat gacaccatcc cagagtctgt cacggccatg 5040
cgggaaaatg gctttctgct gcgctaccgc acacttgcac tctgatgcg agctttcttc 5100
atcttccgga cgcattctt gccctggtac ctactggga cctcattgct gatcaccatt 5160
cctctggtgc ccaccgcaac tgggtgcctt ttgacgttct tcttcatttt gtcccacaat 5220
tttgatggct ccgaacggat ccccgacaag aactgcaagg ttaagagatc tgagaaggac 5280
gttgaggctg accaaattga ctggtatcgg gcgcagggtg agacgtcctc cacatacgg 5340
ggccccatcg ccatgttctt cactggcggc ctcaatttcc agatcgagca ccacctctt 5400
ccccggatgt cgtcttgga ctaccccttc gtccagcagg cggtcgggga gtgttgcgaa 5460
cgccatggag tgcgatatgt tttctaccct accatcgctg gcaacatcat ctccaccctg 5520
aagtacatgc ataaggtggg tgctgtccac tgcgtgaagg acgcacagga ttcctaag 5578

```

<210> 92

<211> 11907

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR1037

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (7810)..(7810)

<223> nes a, c, g, o t

<400> 92

ggagatccaa gcttttgatc catgcccttc atttgccgct tattaattaa tttggtaaca	60
gtccgtacta atcagttact tatccttccc ccatcataat taatcttggg agtctcgaat	120
gccacaacac tgactagtct cttggatcat aagaaaaagc caaggaacaa aagaagacaa	180
aacacaatga gagtatcctt tgcatagcaa tgtctaagtt cataaaattc aaacaaaaac	240
gcaatcacac acagtggaca tcacttatcc actagctgat caggatcgcc gcgtcaagaa	300
aaaaaaactg gacccccaaaa gccatgcaca acaacacgta ctcacaaagg tgtcaatcga	360
gcagcccaaa acattcacca actcaacca tcatgagccc tcacatttgt tgtttctaac	420
ccaaacctca actcgtattc tcttccgcc cctcattttt gtttatttca acaccgctca	480
aactgcatgc cccccgtgg ccaaagtgtc atgcatgtta acaagaccta tgactataaa	540
tagctgcaat ctcggccag gttttcatca tcaagaacca gttcaatata ctagtacacc	600
gtattaaaga atttaagata tactgcggcc gcacccatgga ggtggggaat gaaatagtct	660
caattgggca ggaagtttta cccaaagttg attatgccca actctggagt gatgccagtc	720
actgtgaggt gctttacttg tccatcgcat ttgtcatctt gaagttcact cttggccccc	780
ttggtccaaa aggtcagtct cgtatgaagt ttgttttcac caattacaac cttctcatgt	840
ccatttattc gttgggatca ttctctcaa tggcatatgc catgtacacc atcgggtgtta	900
tgtctgacaa ctgcgagaag gcttttgaca acaacgtctt caggatcacc acgcagttgt	960
tctatttgag caagttcctg gagtatatg actccttcta ttgcccactg atgggcaagc	1020
ctctgacctg gttgcaattc ttccatcatt tgggggcacc gatggatatg tggctgttct	1080
ataattaccg aaatgaagct gtttgattt ttgtgctgtt gaatggtttc atccactgga	1140
tcatgtacgg ttattattgg accagattga tcaagctgaa gttcccatg ccaaaatccc	1200
tgattacatc aatgcagatc attcaattca atgttggttt ctacattgtc tggaagtaca	1260
ggaacattcc ctgttatcgc caagatggga tgaggatgtt tggctggttc ttcaattact	1320
tttatgttgg cacagtcttg tgtttgttct tgaatttcta tgtgcaaagc tatatcgtca	1380
ggaagcaciaa gggagccaaa aagattcagt gagcgccgc aagtatgaac taaaatgcat	1440
gtagggtgtaa gagctcatgg agagcatgga atattgtatc cgacccatgta acagtataat	1500

aactgagctc	catctcactt	cttctatgaa	taaacaaagg	atggttatgat	atattaacac	1560
tctatctatg	caccttattg	ttctatgata	aatttcctct	tattattata	aatcatctga	1620
atcgtgacgg	cttatggaat	gcttcaaata	gtacaaaaac	aaatgtgtac	tataagactt	1680
tctaaacaat	tctaaccctta	gcattgtgaa	cgagacataa	gtgttaagaa	gacataacaa	1740
ttataatgga	agaagtttgt	ctccatttat	atattatata	ttaccactt	atgtattata	1800
ttaggatggt	aaggagacat	aacaattata	aagagagaag	tttgtatcca	tttatatatt	1860
atatactacc	catttatata	ttatacttat	ccactttatt	aatgtcttta	taaggtttga	1920
tccatgatat	ttctaataatt	ttagttgata	tgtatatgaa	agggactat	ttgaactctc	1980
ttactctgta	taaaggttgg	atcatcctta	aagtgggtct	atttaatttt	attgcttctt	2040
acagataaaa	aaaaaattat	gagttgggtt	gataaaatat	tgaaggattt	aaaataataa	2100
taaataacat	ataatatatg	tatataaatt	tattataata	taacatttat	ctataaaaaa	2160
gtaaatattg	tcataaatct	atacaatcgt	ttagccttgc	tggacgaatc	tcaattattt	2220
aaacgagagt	aaacatattt	gacttttttg	ttattttaaca	aattattatt	taacactata	2280
tgaatttttt	ttttttatca	gcaaagaata	aaattaaatt	aagaaggaca	atggtgtccc	2340
aatccttata	caaccaactt	ccacaagaaa	gtcaagtcag	agacaacaaa	aaaacaagca	2400
aaggaaattt	tttaatttga	gttgtcttgt	ttgctgcata	atttatgcag	taaaacacta	2460
cacataaacc	ttttagcagt	agagcaatgg	ttgaccgtgt	gcttagcttc	ttttatttta	2520
ttttttttatc	agcaaagaat	aaataaaaata	aaatgagaca	cttcagggat	gtttcaacaa	2580
gcttggcgcg	ccgttctata	gtgtcaccta	aatcgtatgt	gtatgataca	taaggttatg	2640
tattaattgt	agccgcgttc	taacgacaat	atgtccatat	ggtgcaactc	cagtacaatc	2700
tgtcttgatg	ccgcatagtt	aagccagccc	cgacaccgcg	caacaccgcg	tgacgcgccc	2760
tgaegggett	gtctgtctcc	ggcatccgct	tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccggggagc	2820
tgcattgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	ccgaaacgcg	cgagacgaaa	gggcctcgtg	2880
atacgcttat	ttttataggt	taatgtcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	2940
cactgagcgt	cagaccccgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	3000
cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcggtggt	ttgtttgccg	3060
gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	3120
aatactgtcc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	3180
cctacataacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	3240
tgtcttaccg	ggttggaactc	aagacgatag	ttaccggata	agggcgagcg	gtcgggctga	3300
acgggggggtt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	3360

ctacagcgtg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	3420
ccggtaaagc	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	3480
tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	3540
tgtcgtcag	gggggaggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	3600
ctggcctttt	gctggccttt	tgtcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	3660
gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataaccgtc	gccgcagccg	aacgaccgag	3720
cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	3780
gcgcgttggc	cgattcatta	atgcaggttg	atcagatctc	gatcccgcga	aattaatacg	3840
actcactata	gggagaccac	aacggtttcc	ctctagaaat	aattttgttt	aactttaaga	3900
aggagatata	cccatggaaa	agcctgaact	caccgcgacg	tctgtcgaga	agtttctgat	3960
cgaaaagttc	gacagcgtct	ccgacctgat	gcagctctcg	gagggcggaag	aatctcgtgc	4020
tttcagcttc	gatgtaggag	ggcgtggata	tgtcctgcgg	gtaaatagct	gcgcgatggg	4080
tttctacaaa	gatcgttatg	tttatcgga	ctttgcatcg	gccgcgctcc	cgattccgga	4140
agtgcctgac	attgggggaat	tcagcgagag	cctgacctat	tgcattctccc	gccgtgcaca	4200
gggtgtcacg	ttgcaagacc	tgcctgaaac	cgaactgccc	gctgttctgc	agccgggtcgc	4260
ggaggctatg	gatgcgatcg	ctgcggccga	tcttagccag	acgagcgggt	tcggcccatt	4320
cggaccgcaa	ggaatcggtc	aatacactac	atggcgtgat	ttcatatgcg	cgattgtgta	4380
tccccatgtg	tatcactggc	aaactgtgat	ggacgacacc	gtcagtgcgt	ccgtcgcgca	4440
ggctctcgat	gagctgatgc	tttgggccga	ggactgcccc	gaagtccggc	acctcgtgca	4500
cgcggatttc	ggctccaaca	atgtcctgac	ggacaatggc	cgcataacag	cggtcattga	4560
ctggagcgag	gcgatgttcg	gggattccca	atacgaggtc	gccaacatct	tcttctggag	4620
gccgtggttg	gcttgtatgg	agcagcagac	gcgctacttc	gagcggaggc	atccggagct	4680
tgcaggatcg	ccgcggctcc	gggcgtatat	gtcccgcat	ggtcttgacc	aactctatca	4740
gagcttggtt	gacggcaatt	tcgatgatgc	agcttgggcg	cagggtcgat	gcgacgcaat	4800
cgtccgatcc	ggagccggga	ctgtcgggcg	tacacaaatc	gcccgcagaa	gcgcggccgt	4860
ctggaccgat	ggctgtgtag	aagtactcgc	cgatagtggg	aaccgacgcc	ccagcactcg	4920
tccgagggca	aaggaatagt	gaggtacagc	ttggatcgat	ccggctgcta	acaaagcccg	4980
aaaggaagct	gagttggctg	ctgccaccgc	tgagcaataa	ctagcataac	cccttggggc	5040
ctctaaacgg	gtcttgaggg	gttttttgct	gaaaggagga	actatatccg	gatgatcggg	5100
cgcgcgctcg	acggatccgt	acgcaaaggc	aaagatttaa	actcgaaaac	attacaaaag	5160

tctcaaaaca	gaggcaaggc	catgcacaaa	gcacactcta	agtgttcca	ttgcctacta	5220
agtagggtag	gtacacgac	accattcacc	agtgatgatc	tttattaata	tacaacacac	5280
tcagagacag	cttatgttat	agctagctag	cataaactat	cacatcatgt	gttagtacga	5340
caagtgacaa	cattgctttt	aacttcgcgg	ccttgatcc	tctagaccgg	atataatgag	5400
ccgtaaacia	agatgattaa	gtagtaatta	atacgtacta	gtaaaagtgg	caaaagataa	5460
cgagaaagaa	ccaatttctt	tgcattcggc	cttagcggaa	ggcatatata	agctttgatt	5520
atattattta	gtgtaatgat	ttcgtacaac	caaagcattt	atttagtact	ctcacacttg	5580
tgctgcggcc	gcgaattcac	tagtgattcc	ttatagagcc	ttccccgcgg	gttgcttctc	5640
cgccatccgg	gcgaacaccg	ccagatagcg	cagcaggatg	accaaccctt	catggggcag	5700
cggttccga	tacggcaggt	tgtgcttctg	gcacagctgt	tccacctggg	agctaaccgc	5760
tgctcaggtg	tggcgaggga	gggtcggcca	caaagtgtgc	tcaatctggg	aattcaagcc	5820
tccgaaaaac	caatctgtga	taatccctcg	ccgaatgttc	atggtctcat	ggatctggcc	5880
aaccgagaat	ccatggccat	ccagactga	gtccccgate	ttctccagtg	ggtagtgggt	5940
catgaacacc	acgatcgcaa	tgccgaagcc	gccaaaccagc	tccgaaacga	aaaacaccaa	6000
cagcgatgtg	aggatgctgg	gcataaagaa	taagtggaa	aggtcttca	aggtccagtg	6060
cagggcgagg	ccaatggcct	ccttcttata	ctgagagcga	tagaattggg	tatctctgtc	6120
cttcaaaactg	cgcacggcca	acacgctctg	gaaacaccaa	atgaaccgca	acaagataca	6180
gatgaccaag	aaatagtact	gctggaactg	aatgagcttg	cgggaaatcg	gtgacgcccg	6240
tgtagcgtca	tcctcagacc	aggctaagag	ggggagggtg	tcaatatcag	ggctcgtgcc	6300
ttgaacattg	gttgccgaat	gatgtgcatt	gtgtctgtcc	ttccaccatg	tcacggaaaa	6360
accttgacga	ccattgccaa	ataccagtcc	cacgaggttg	ttccagttcc	ggttcttgaa	6420
agtctggtgg	tggcaaagt	catgagaaa	ccagcccatc	tgttgatagt	gcacccaag	6480
caacactgcc	ccaatgaaat	acatctgata	ctgaaccatc	aggaaataac	ccagcactcc	6540
aaggcccagt	gtggtgctga	ttttgtatga	gtaccagagg	ggggaggcat	caaacatgcc	6600
agttgcgate	aactcttctc	ggagcttccg	gaaatcctct	tgagcttcat	tactgcagc	6660
ctgggggtgg	aactcagaac	tgggattgat	tttgggcatg	cgcttgagct	tgctgaaggg	6720
ttcttgagag	tgcataacca	tgaaggcatc	agtggcatcc	cttcttggg	aattctctat	6780
aatttccgca	ccaccagggt	ggaaattgac	ccaggcagac	acatcatatg	ttgttccatc	6840
aattgtaagg	ggaagcgctt	ggcgctttga	cttcatttca	atcgaattcc	cgcgccgct	6900
tggggggcta	tgggaagactt	tcttagttag	ttgtgtgaat	aagcaatgtt	gggagaatcg	6960
ggactactta	taggatagga	ataaaacaga	aaagtattaa	gtgctaata	aatatttaga	7020

ctgataatta aaatcttcac gtatgtccac ttgatataaa aacgtcagga ataaaggaag	7080
tacagtagaa tttaaaggta ctctttttat atatacccggt gttctctttt tggctagcta	7140
gttgcataaa aaataatcta tattttttatc attatttttaa atatcttatg agatggtaaa	7200
tattttatcat aatttttttt actattatctt attattttgtg tgtgtaatac atatagaagt	7260
taattacaaa ttttattttac tttttcatta ttttgatatg attcaccatt aatttagtgt	7320
tattattttat aatagttcat tttaatcttt ttgtatatat tatgctgtgca gtactttttt	7380
cctacatata actactatta catttttattt atataatatt ttattaatg aatttttcgtg	7440
ataatatgta atattgttca ttattatttc agattttttta aaaatatttg tgttattatt	7500
tatgaaatat gtaatttttt tagtatttga ttttatgatg ataaagtgtt cttaaattcaa	7560
aagaaggggg aaagcgtaaa cattaaaaaa cgtcatcaaa caaaaacaaa atcttggttaa	7620
taaagataaa actgttttgt ttgatcactg ttatttcgta atataaaaac attattttata	7680
tttatattgt tgacaaccaa atttgcctat caaatctaac caatataatg catgctgtggc	7740
aggtaatgta ctacccatgaa cttaagtcac gacataataa accgtgaatc tgaccaatgc	7800
atgtacctan cttaaattgta tttgtgacac gaagcaaag attcaattca caatggagat	7860
gggaaacaaa taatgaagaa cccagaacta agaaagcttt tctgaaaaat aaaataaagg	7920
caatgtcaaa agtatactgc atcatcagtc cagaaagcac atgatatttt tttatcagta	7980
tcaatgcagc tagttttatt ttacaatac gatatagcta gtttaaataat attgcagcta	8040
gattttataaa tatttgtgtt attattttatc atttgtgtaa tctgtttttt agtatttttag	8100
tttatatatg atgataatgt attccaaatt taaaagaagg gaaataaatt taaacaagaa	8160
aaaaagtcac caaacaaaaa acaaatgaaa ggggtggaaag atgttaccat gtaatgtgaa	8220
tgttiacagta tttctttttat tatagagtta acaaatatac taatatgatt ttgttaataa	8280
tgataaaata tttttttttat tattattttca taatataaaa atagttttact taatataaaa	8340
aaaattctat cgttcacaac aaagttggcc acctaattta accatgcatg taccatgga	8400
ccatattagg taaccatcaa acctgatgaa gagataaaga gatgaagact taagtcataa	8460
cacaaaacca taaaaaacia aaatacaatc aaccgtcaat ctgaccaatg catgaaaaag	8520
ctgcaatagt gagtggcgac acaaagcaca tgattttctt acaacggaga taaaaccaa	8580
aaaatatttc atgaacaacc tagaacaat aaagctttta tataataaat atataaataa	8640
ataaaggcta tggaataata tacttcaata tatttggatt aaataaattg ttggcgggg	8700
tgatatattt atacacacct aaagtcactt caatctcatt ttcacttaac ttttattttt	8760
ttttctttt tatttatcat aaagagaata ttgataatat actttttaac atatttttat	8820

gacattttttt attggtgaaa acttattaaa aatcataaat tttgtaagtt agattttattt 8880
aaagagttcc tcttcttatt ttaaattttt taataaattt ttaaataact aaaatttgtg 8940
ttaaaaaatgt taaaaaatgt gttattaacc cttctcttcg aggacgtacg agatccggcc 9000
ggccagatcc tgcaggtctc aatagattaa gaagttggcg tctcattgat tgaccatggg 9060
ggatcctcta gacgtacgtg aagggtaaac atggtgaata tgttaccact agctgggatg 9120
cccattagat caaaactgta aaattctccc gtttcccttc tattcacatg tgagccccct 9180
cccttttctt tctttctcaa ttttgattga gttaaagtca ccagcaatgc atcactcacc 9240
ctccaaaaaa tttcttgtag aacttctcgg actatcccaa agctcctttt cctgagatgg 9300
atggtcctgt ctcttgcctt tgatgtcttc cttgttcgat tttggcttcc tctaattgtct 9360
ttcttgctag gaatcaccac ctcactcatc tatgttgtcg tagcttctga aagtctcata 9420
catatcctta gtgttgcaact catcttgat tgaagtgaag aagaatgttg ttctcctatc 9480
caaactctca ttgaatctct ttctcccaat gttgtcccat cggttggtcc tcctctccaa 9540
ccaattaatt gtaaggtgtt taacataaac atggtacaat taagattttt catttcatta 9600
agaaaagatt gagatttgtg gttctaaagt ttcaattaga gtttgatgat attgaaacaa 9660
ccgtagaaca cattaagtat tactaactta tacatagagc attggaattt caccttttat 9720
ttattctgtt tccgccaaag gtacatgact caagttattt tacacaagta acaaaggcat 9780
ctaagcctaa gtattcttat tcagactttt cattattact ttcattgatt tgggtgcgaaa 9840
tgcggccgct taggaatcct gtgcgtcctt caegcagtgg acgacacca ccttatgcat 9900
gtacttcagg gtggagatga tgttgccgac gatggtaggg tagaaaacat atcgcactcc 9960
atggcgttcg caacactccc ggaccgcctg ctggacgaag gggtagtgcc aagacgacat 10020
ccggggaaaag aggtggtgct cgatctggaa attgagaccg ccagtgaaga acatggcgat 10080
ggggccaccg tatgtggagg acgtctccac ctgcgcccga taccagtcaa tttggtcagc 10140
ctcaacgtcc ttctcagatc tcttaacctt gcagttcttg tcggggatcc gttcggagcc 10200
atcaaaattg tgggacaaaa tgaagaagaa cgtcaagaag gcaccagttg cgggtgggcac 10260
cagaggaatg gtgatcagca atgaggtccc agtgaggtac cagggcaaga atgcggtccg 10320
gaagatgaag aaagctcgca tcacgaatgc aagtgtgcgg tagcgccgca gaaagccatt 10380
ttcccgcagt gccgtgacag actctgggat ggtgtcattg tgctgcatcc ggaaaatgta 10440
gagcggggtg tacaccagcg ataccccgta tgccccagc acaaggtaca tgtaccaagc 10500
ttggaagcgg tggaaaccact ttccggcggt gtttgccggc gggtagttgt ggaacaccag 10560
gaacggctct gccgactccg catccaggtc gaggcctgc tggttggtgt aggtgtggtg 10620
ccgcatgatg tgcgactgca gccaaatcca ccgggacgat ccgatgacgt caatgccgta 10680

```

ggcgaagagg gcggtgaccc aaggcttctt gctgatggcc ccggtgggacg catcatgctg 10740
gatggataag ccgatctgca tgtgcatgaa tccagtcaac aggccccaca gcaccatccc 10800
cgtggtagcc cagtgccact cgcaaaaggc cgtcacggcg atgatcccaa cggtgcgcag 10860
ccagaagcca ggggttgcggt accagttcct ccctttcatc acctcgcgca ttgtccgctt 10920
aacgtcttgt gcgaagggag aatcatatcgt gtagacaatg tccttcgagg tgcggtcatg 10980
cttccctcgg acgaactgtt gaagcaattt ggaattctcc ggtttgacgt atggatgcat 11040
tgaataaaaag agaggggagg catcagaggc accagaagcg agaatacaat ctccctcctg 11100
atgaactttg gcaagccctt caaggtcgta gaggatgcca tcaatcgcaa ccaaatcagg 11160
gcgttctaac agctgttctg tggttaagact gagagccatg gtttgcggcc gcggtgatga 11220
ctgatgagtg ttaaggacc aatggagaga atgtttgagt tgtgaagcgg agaacctgag 11280
gcgtggttat ttataggga gagaggaagg tgaatgaggg acacgtcaca gaagtagggt 11340
gctgagcttg agacattctt cagtatgcat ggctatggaa gccttgggtg ctacacctca 11400
tgaagtcat ggtgtgaggt ggcttcggca tctcaattaa gtgacaaaga gaaagggtgtt 11460
tcagtgtttc tattgcaaat ggcagaaact cgtgatgacg aggggacat gcagtgtttc 11520
atctcttttc ttctggatt cttcttttc ttttatatat gcaggttcat aatttaaaaa 11580
ttagactcgc tttcaatttc ttaatttctc attttctct tatattactg tactaatgtt 11640
aaccacgtac acttattttt ttttagttt aattttgata gattgtgttg atttaaacat 11700
attaatatat tcaaccaa ataaatcatt ttagtagata cggtttttta aataattatt 11760
aaaaatatta actatttctc cttaatggca cattttaatt aaaaaaatc cggtgttgta 11820
agtgttttat taattgttt tggcattatt aaagcaactt tttttttatt tgttggcatt 11880
ttgagtacgt acttaggcta gcctgca 11907

```

<210> 93

<211> 8671

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pKR328

<400> 93

```

ggatctggcc ggccggatct cgtacggatc cgtcgacggc gcgcccgatc atccggatat 60
agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggttta gaggcccaa ggggttatgc 120
tagttattgc tcagcggtag cagcagccaa ctacgcttcc ttccgggctt tgtagcagc 180
cggatcgatc caagctgtac ctcaatttcc ctttgccttc ggacgagtgc tggggcgctc 240

```

gtttccacta	tcggcgagta	cttctacaca	gccatcggtc	cagacggccg	cgcttctgcg	300
ggcgatttgt	gtacgcccga	cagtcccggc	tccggatcgg	acgattgcgt	cgcatcgacc	360
ctgcgcccaa	gctgcatcat	cgaaattgcc	gtcaaccaag	ctctgataga	gttgggtcaag	420
accaatgcgg	agcatatacg	cccggagccg	cggcgatcct	gcaagctccg	gatgcctccg	480
ctcgaagtag	cgcgctctgt	gtccataca	agccaaccac	ggcctccaga	agaagatgtt	540
ggcgacctcg	tattgggaat	ccccgaacat	cgccctcgctc	cagtcaatga	ccgctgttat	600
gcggccattg	tccgtcagga	cattgtttgga	gccgaaatcc	gcgtgcacga	ggtgccggac	660
ttcggggcag	tcctcggccc	aaagcatcag	ctcatcgaga	gcctgcgcga	cggacgcact	720
gacggtgtcg	tccatcacag	tttgccagtg	atacacatgg	ggatcagcaa	tcgcgcatat	780
gaaatcacgc	catgtagtgt	attgaccgat	tccttgccgt	ccgaatgggc	cgaacccgct	840
cgtctggcta	agatcggccg	cagcgatcgc	atccatagoc	tccgcgaccg	gctgcagaac	900
agcgggcagt	tcggtttcag	gcaggctctt	caacgtgaca	ccctgtgcac	ggcgggagat	960
gcaataggtc	aggctctcgc	tgaattcccc	aatgtcaagc	acttccggaa	tcgggagcgc	1020
ggccgatgca	aagtgccgat	aaacataacg	atctttgtag	aaaccatcgg	cgcagctatt	1080
taccgcgagg	acatatccac	gcctcctac	atcgaagctg	aaagcacgag	attcttcgcc	1140
ctccgagagc	tgcatcaggt	cggagacgct	gtcgaacttt	tcgatcagaa	acttctcgac	1200
agacgtcgcg	gtgagttcag	gcttttccat	gggtatatct	ccttcttaaa	gttaaacaaa	1260
attattttcta	gagggaaacc	gttgtgtct	ccctatagtg	agtcgtatta	atttcgcggg	1320
atcgagatcg	atccaattcc	aatcccacaa	aaatctgagc	ttaacagcac	agttgctcct	1380
ctcagagcag	aatcgggtat	tcaacaccct	catatcaact	actacgttgt	gtataacggt	1440
ccacatgccg	gtatatacga	tgactggggt	tgtacaaagg	cggcaacaaa	cggcgttccc	1500
ggagttgcac	acaagaaatt	tgccactatt	acagaggcaa	gagcagcagc	tgacgcgtac	1560
acaacaagtc	agcaaacaga	caggttgaac	ttcatcccca	aaggagaagc	tcaactcaag	1620
cccaagagct	ttgctaaggc	cctaacaagc	ccaccaaaagc	aaaaagccca	ctggctcacg	1680
ctaggaacca	aaaggcccag	cagtgatcca	gccccaaaag	agatctcctt	tgccccggag	1740
attacaatgg	acgatttcct	ctatctttac	gatctaggaa	ggaagttcga	aggtgaaggt	1800
gacgacacta	tgttcaccac	tgataatgag	aagggttagcc	tcttcaattt	cagaaagaat	1860
gctgaccac	agatgggttag	agaggcctac	gcagcaggtc	tcataagac	gatctacccg	1920
agtaacaatc	tccaggagat	caaatacctt	cccaagaagg	ttaaagatgc	agtcaaaaga	1980
ttcaggacta	attgcatcaa	gaacacagag	aaagacatat	ttctcaagat	cagaagtact	2040
attccagtat	ggacgattca	aggcttgctt	cataaaccaa	ggcaagtaat	agagattgga	2100

gtctctaaaa aggtagttcc tactgaatct aaggccatgc atggagtcta agattcaaat	2160
cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga gtcttttacg	2220
actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catgggtggag cacgacactc tgggtctactc	2280
caaaaatgtc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggtc attgagactt ttcaacaaag	2340
gataattttcg ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact tcatcgaaag	2400
gacagtagaa aaggaaggtg gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat	2460
cattcaagat gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat	2520
cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgacatctc	2580
cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata	2640
aggaagttca tttcattttg agaggacacg ctcgagctca tttctctatt acttcagcca	2700
taacaaaaga actcttttct cttcttatta aaccatgaaa aagcctgaac tcaccgcgac	2760
gtctgtcgag aagttttctga tcgaaaagtt cgacagcgtc tccgacctga tgcagctctc	2820
ggagggcgaa gaatctcgtg ctttcagctt cgatgtagga gggcgtggat atgtcctgcg	2880
ggtaaatagc tgcgccgatg gtttctacaa agatcgttat gtttatcggc actttgcac	2940
ggccgcgctc ccgattccgg aagtgttgta cattggggaa ttcagcgaga gcctgacct	3000
ttgcatctcc cgccgtgcac aggggtgtcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc	3060
cgctgtttctg cagccggctc cgaggccat ggatgcgatc gctgcggccg atcttagcca	3120
gacgagcggg ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggc caatacacta catggcgtga	3180
tttcatatgc gcgattgctg atcccatgt gtatcactgg caaactgtga tggacgacac	3240
cgtcagtgcg tccgtcgcgc aggtctcga tgagctgatg ctttgggccg aggactgcc	3300
cgaagtccgg cactcgtgc acgcggattt cggtccaac aatgtcctga cggacaatgg	3360
ccgcataaca gcggtcattg actggagcga ggcgatgttc ggggattccc aatacgaggt	3420
cgccaacatc ttcttctgga ggccgtggtt ggcttgatg gagcagcaga cgcgctactt	3480
cgagcggagg catccggagc ttgcaggatc gccgcggctc cgggcgtata tgctccgcat	3540
tggctctgac caactctatc agagcttggg tgacggcaat ttcgatgatg cagcttgggc	3600
gcagggtcga tgcgacgcaa tcgtccgatc cggagccggg actgtcgggc gtacacaaat	3660
cgcccgcaga agcgcggccg tctggaccga tggctgtgta gaagtactcg ccgatagtgg	3720
aaaccgacgc cccagcactc gtccgagggc aaaggaatag tgaggtacct aaagaaggag	3780
tgcgtcgaag cagatcgttc aaacatttgg caataaagtt tottaagatt gaatcctgtt	3840
gccggctctt cgatgattat catataatct ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt	3900

aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta	3960
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcg	4020
gcggtgtcat ctatgttact agatcgatgt cgaatcgatc aacctgcatt aatgaatcgg	4080
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttctt cgctcactga	4140
ctcgctgcgc tcggtcggtc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	4200
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	4260
aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc	4320
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg cgaaaccgga caggactata	4380
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgcgcg tctcctgttc cgacctgcc	4440
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	4500
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgctcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	4560
accccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	4620
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	4680
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag	4740
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag	4800
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt tttttgttt gcaagcagca	4860
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga	4920
cgctcagtgg aacgaaaaact cacgttaagg gattttggct atgacattaa cctataaaaa	4980
taggcgtatc acgaggccct ttcgctcgc gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg	5040
acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca	5100
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc	5160
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgtag aacgcggcta	5220
caattaatac ataaccttat gtatcataca catacgattt aggtgacact atagaacggc	5280
gcgccaagct tggatctcct gcagcccggg ggatccgccc acgtacggtg ccatctgcta	5340
atattttaaa tcacatgcaa gagaggaggc atggttccat tttctacctt cacattattt	5400
gagaaaaacg aacttggtct gtgttttatt ttgcccctt acattagtac aacgtggaag	5460
actcatgggt acacagaatc atacataagt acaatgcttg tccctaagaa aacaagcact	5520
cggtgtattg aacctttacg gctcatgcgg ccgcgaattc actagtgatt gaattcgcg	5580
ccgcttagtc cgacttggcc ttggcggccg cggccgactc ttgagcggtg aagatctgcg	5640
ccgtctcggg cacagcgccg tagttgacaa agaggtgcgc ggtcttgaag aaggccgtga	5700
tgatgggctc gtcgttctg cgcacgaggt gcgggtacgc ggccgcaaag tgcttggtg	5760

cttcgttgag cttgtagtgc ggaatgatcg ggaacaagtg gtggacctgg tgcgtgccaa	5820
tgtggtggct caggttgccc acgaacgcgc cgtacgagcg gtcgacgctc gagaggttgc	5880
ccttgacgta cgtccactcc gagtcgccgt accacggcgt cgcttcgtcg ttgtggtgca	5940
agaaggtcgt aatgacgagg aacgaagcaa agacaaagag cggcgcatag tagtagaggg	6000
ccatgacggc aaagccgagc gagtatgtga ggtacgcgta cgcggcgaag aaggcggccc	6060
agacgccgag cgacacgatg acggccgacg cgcggcgaag gaggagcggg tcccacgggt	6120
caaagtggct catcgtgcgc ggggcatacc cgaccttcaa gtagacaaac cacgcaccgc	6180
cgagcgtgta gacccattgg cgcacgtcct ggaggtcctt gaccgaccgg tgcgggtaaa	6240
agatctcgtc cttatcaatg ttgcccgtgt tcttggtgtg gtggcggtgc gtcacgcgcc	6300
agctctcgaa cggcgtcaaa atcgacagat gcatgatgca gccgatgata aagttgacgc	6360
tgtggtagcg cgagaaggcc gagtgccgc agtcgtggcc gaccgtgaag aagccccaga	6420
agatgacgcc ctgcacgtag atgtaggtgg cgcaaacgag cgcgtggagc agaacgttat	6480
cggcaatgaa cggcgtcgag cgcgccgcgt agagcagcgc cgccgaggcc gacgcgttga	6540
agatcgcgcg ggccgtgtag tagagcgaga ggccgagggt cgactcaaag cacgcgttcg	6600
ggatcgagtg cttgagctcc gtgagcgtcg ggaactcgac cttcgtctta tcctcagtca	6660
tgcggccgct gaagtattgc ttcttagtta acctttcctt tctctctcag ctatgtgaat	6720
tcattttgct ttcgtcaciaa tttatatagt gaaattggat ctttgagggt aacgccttca	6780
caggattatc gtgttagaac aatgcttttt catgtttctaa ttagtagtac attacaaatg	6840
tgcactctat tcaataagca tcttttgcca cgttaataaa tcatgtgaaa aaaaaatact	6900
actatttcaa agaaagtgtt gtaaaaagaa acggaaagag agctggcctt agttgttgag	6960
acttgtttgc tagtaaaaat ggtgtgaaga gtgattcatg gtgaggtggt ttttcgtccc	7020
tttctgtttg catgaaaaac aaatggcaag agatgacgta ggattccttc ccttaacgat	7080
tatctgtttt taatttcaaa tatacatata ggaatttatg aattactaag gttgtaaaat	7140
atgctggtca tttatttatg gctaaaatat ttttttttct cgtaaatata aaaatattta	7200
aaatttatat ttatcatatt tttatcctt ataaaattat gtgtacaacc tatataaaaa	7260
aatatcatat ttaatatgga ttatatgttt aatcaatata aaaaatcatt atcatatatt	7320
tagatttatt cgaatataca tctaaacaaa aaataacata ttttaatttt atgaagaaaa	7380
aaaaatattt tctcctttat ttatttaaga ttaattaata gttatgtatt gtggaaagac	7440
ttttacacat gcaatagata tactgaatca attagatgcc aatgctgagt tggaaatcac	7500
ttgaggaggg gaggagactt gccaatgctt ttcagtttca tttaaagat ttagtgaggg	7560

agatagagta gtgataaagg catgccccaa ttttggagtg tatatatgag tggaaataag 7620
 agagggatag agagaaaaaa taaagagagt aaaaataatt aatgtgaaat gatatgataa 7680
 aaaaataaag aaagagataa agagaaaaat gaaatgagag atagatgaaa tagagagtag 7740
 atacatgttt gtttaggttt tttttaggaa ataacacatt tttttctcat cacttattac 7800
 tcactgtcaa tttcctctct ttcaatcata atgatatgat ttgtttaaca aaaatgtgaa 7860
 aaaacatata aagtaaaata tttttataaa ttgataaata aaaatttaca aaattttatt 7920
 cttattaaat tgaatagaaa atgaaagaaa agaaaagaaa aagtatatat aaaatgatat 7980
 agctttaaaa agaataaatt tttcatatca gtcttttttt aataatttag aaatatttaa 8040
 gtatatagca aaaatataat gtactttaca tatgcataaa taataatttg aaaatagaac 8100
 taatagaata gagaaaaaag taatataata attaactata tgaaaattta gaagggacaa 8160
 tatttttaat taagaatata aacaatattt cttttcatgt aatgagggac ggatgtacgg 8220
 ggccagtgtt ggagtcaaag ccaaaatagt cacggggaaa ttaatgcact gcatgactat 8280
 tcgaaaaaat tcactagcct tacttagatg ttagattaat agctaggggg tgcagataat 8340
 tttgaaaggc atgaaaaaca ttaatttgta cattgcaagc ttttgatgac aagctttgca 8400
 attgttcaca ctaccttatg ccatttataa atagagtgat tggcatatga aggaaatcat 8460
 gagagtcgaa gcgaaaaaca aagcttgaga gtgtaggaaa aatacagttt ttttggtaaa 8520
 aatacagtat ttgaatagga gcgaaaaata tcctttcaaa atgatccttt tctttttttt 8580
 tttttttctt gttgttcttg gtcagttatt caaaggaaaa gggattgaaa taaaaacttg 8640
 catgtgggat cgtacgtcga gtcgacctgc a 8671

<210> 94

<211> 1413

<212> ADN

5 <213> *Saprolegnia diclina*

<400> 94

atggccccgc agacggagct ccgccagcgc cagccgcgcg tcgccgagac gccggtggcc 60
 ggcaagaagg cctttacatg gcaggaggtc gcgcagcaca acacggcggc ctccgcctgg 120
 atcattatcc gcggcaaggt ctacgacgtg accgagtggg ccaacaagca ccccggcggc 180
 cgcgagatgg tgctgctgca cgccggtcgc gagggcaccg acacgttcga ctcgtagcac 240
 ccgttcagcg acaaggccga gtcgatcttg aacaagtatg agattggcac gttcacgggc 300
 ccgtccgagt ttccgacctt caagccggac acgggcttct acaaggagtg ccgcaagcgc 360
 gttggcgagt acttcaagaa gaacaacctc catccgcagg acggcttccc gggcctctgg 420
 cgcatgatgg tcgtgtttgc ggccgccggc ctgccttgt acggcatgca cttttcgact 480

atctttggcg tgcagctcgc ggccgcggcg ctctttggcg tctgccaggc gctgccgctg	540
ctccacgtca tgcacgactc gtgcacgcg tcgtacacca acatgccgtt cttccattac	600
gtcgtcggcc gctttgccat ggactggttt gccggcggt cgatggtgtc atggctcaac	660
cagcacgtcg tgggccacca catctacacg aacgtcgcgg gctcggaccc ggatcttcg	720
gtcaacatgg acggcgacat ccgccgcac gtgaaccgcc aggtgttcca gcccattgac	780
gcattccagc acatctacct tcgccgctc tatggcgtgc ttggcctcaa gttccgcac	840
caggacttca ccgacacgtt cggctcgac acgaaccgcc cgatccgcgt caaccgcac	900
gcgctctcga cgtggatggc catgatcagc tccaagtcgt tctgggcctt ctaccgcgtg	960
taccttcgc ttgccgtgct ccagatgcc atcaagacgt accttgcat cttcttcctc	1020
gccgagtttg tcacgggctg gtacctcgcg ttcaacttcc aagtaagcca tgtctcgacc	1080
gagtgcggct acccatgcgg cgacgaggcc aagatggcgc tccaggacga gtgggcagtc	1140
tcgcaggcca agacgtcggc cgactacgcc catggctcgt ggatgacgac gttccttgcc	1200
ggcgcgctca actaccaggt cgtgcaccac ttgttcccca gcgtgtcgca gtaccactac	1260
ccggcgatcg cggccatcat cgtcgacgtc tgcaaggagt acaacatcaa gtacgccatc	1320
ttgccggact ttacggcggc gttcgttgcc cacttgaagc acctccgcaa catggggcag	1380
cagggbatcg ccgccacgat ccacatgggc taa	1413

REIVINDICACIONES

1.- Un polinucleótido aislado, que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-5 desaturasa, en el que el polipéptido tiene al menos 90% de identidad de aminoácidos, basada en el método de alineamiento Clustal W, cuando se compara con una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad delta-5 desaturasa, en el que la secuencia de nucleótidos tiene al menos 90% de identidad de secuencia, basada en el método de alineamiento BLASTN, cuando se compara con una secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3; o

(c) un complemento de la secuencia de nucleótidos de (a) o (b), en el que el complemento y la secuencia de nucleótidos están formados por el mismo número de nucleótidos y son 100% complementarios.

2.- El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos:

(a) consiste en SEQ ID NO: o SEQ ID NO:3;

(b) codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:2; o

(c) codifica una delta-5 desaturasa, según se indica en SEQ ID NO:2, en el que dicha secuencia tiene los codones optimizados para la expresión en *Yarrowia* sp.

3.- Un polipéptido que tiene actividad delta-5 desaturasa, en el que el polipéptido tiene al menos 90% de identidad de aminoácidos, basada en el método de alineamiento Clustal W, cuando se compara con una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2.

4.- Un gen quimérico que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2, unido operablemente al menos a una secuencia reguladora.

5.- Una célula que comprende, en su genoma, el gen quimérico de la reivindicación 4.

6.- La célula de la reivindicación 5, en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en plantas y levaduras.

7.- Un método para transformar una célula, que comprende transformar una célula con el gen quimérico de la reivindicación 4, y seleccionar las células transformadas con el gen quimérico de la reivindicación 4.

8.- El método de la reivindicación 7, en el que dicha célula es una célula vegetal, y dicho método comprende además la etapa de regenerar una planta a partir de la célula vegetal transformada.

9.- El método de la reivindicación 8, en el que la planta es una planta de soja.

10.- Un método para fabricar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en una célula vegetal, que comprende:

(a) transformar una célula vegetal con el gen quimérico de la reivindicación 4;

(b) seleccionar las células transformadas que fabrican los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

11.- Un método para producir al menos un ácido graso poliinsaturado en una célula de una planta de semillas oleaginosas, que comprende:

(a) transformar una célula de una planta de semillas oleaginosas con un gen quimérico de la reivindicación 4 y al menos una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa;

(b) regenerar una planta de semillas oleaginosas a partir de la célula transformada de la etapa (a); y

(c) seleccionar las semillas obtenidas a partir de las plantas de la etapa (b) que tienen un nivel alterado de ácidos grasos poliinsaturados, cuando se compara con el nivel en semillas obtenidas a partir de una planta de semillas oleaginosas no transformada.

12.- El método de la reivindicación 11, en el que la planta de semillas oleaginosas se selecciona del grupo que consiste en soja, especies de *Brassica*, girasol, maíz, algodón, lino y cártamo.

13.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además la etapa de extraer dicho

ácido graso poliinsaturado.

14.- Una planta transgénica que comprende, en su genoma, el gen quimérico de la reivindicación 4.

15.- La planta transgénica de la reivindicación 14, que es una planta de semillas oleaginosas.

5 16.- La planta de semillas oleaginosas de la reivindicación 15, que comprende además una construcción de ADN recombinante adicional que comprende un polinucleótido aislado unido operablemente al menos a una secuencia reguladora, que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una delta-4 desaturasa, una delta-5 desaturasa, una delta-6 desaturasa, una delta-8 desaturasa, una delta-12 desaturasa, una delta-15 desaturasa, una delta-17 desaturasa, una delta-9 desaturasa, una delta-9 elongasa, una C_{14/16} elongasa, una C_{16/18} elongasa, una C_{18/20} elongasa y una C_{20/22} elongasa.

10 17.- La planta de semillas oleaginosas de la reivindicación 15 o 16, que se selecciona del grupo que consiste en soja, especies de *Brassica*, girasol, maíz, algodón, lino y cártamo.

18.- Una semilla transgénica, que:

(a) comprende, en su genoma, el gen quimérico de la reivindicación 4;

15 (b) se obtiene a partir de la planta fabricada por el método de la reivindicación 8 o 9, y comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2; o

(c) se obtiene a partir de la planta de semillas oleaginosas de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, o a partir de la planta de semillas oleaginosas obtenida a partir del método de la reivindicación 11 o 12, y comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2.

19.- Un alimento o un pienso que incorpora la semilla de la reivindicación 18.

20 20.- Un método para fabricar un alimento o un pienso, que comprende:

(a) procesar la semilla transgénica de la reivindicación 18 para obtener aceite, e incluir dicho aceite en dicho alimento o pienso; o

(b) incluir la semilla transgénica de la reivindicación 18 en dicho alimento o pienso.

25 21.- El método de la reivindicación 20, en el que dicho alimento es un análogo de la carne, un análogo del queso, un análogo de la leche, o un producto alimentario de cereales.

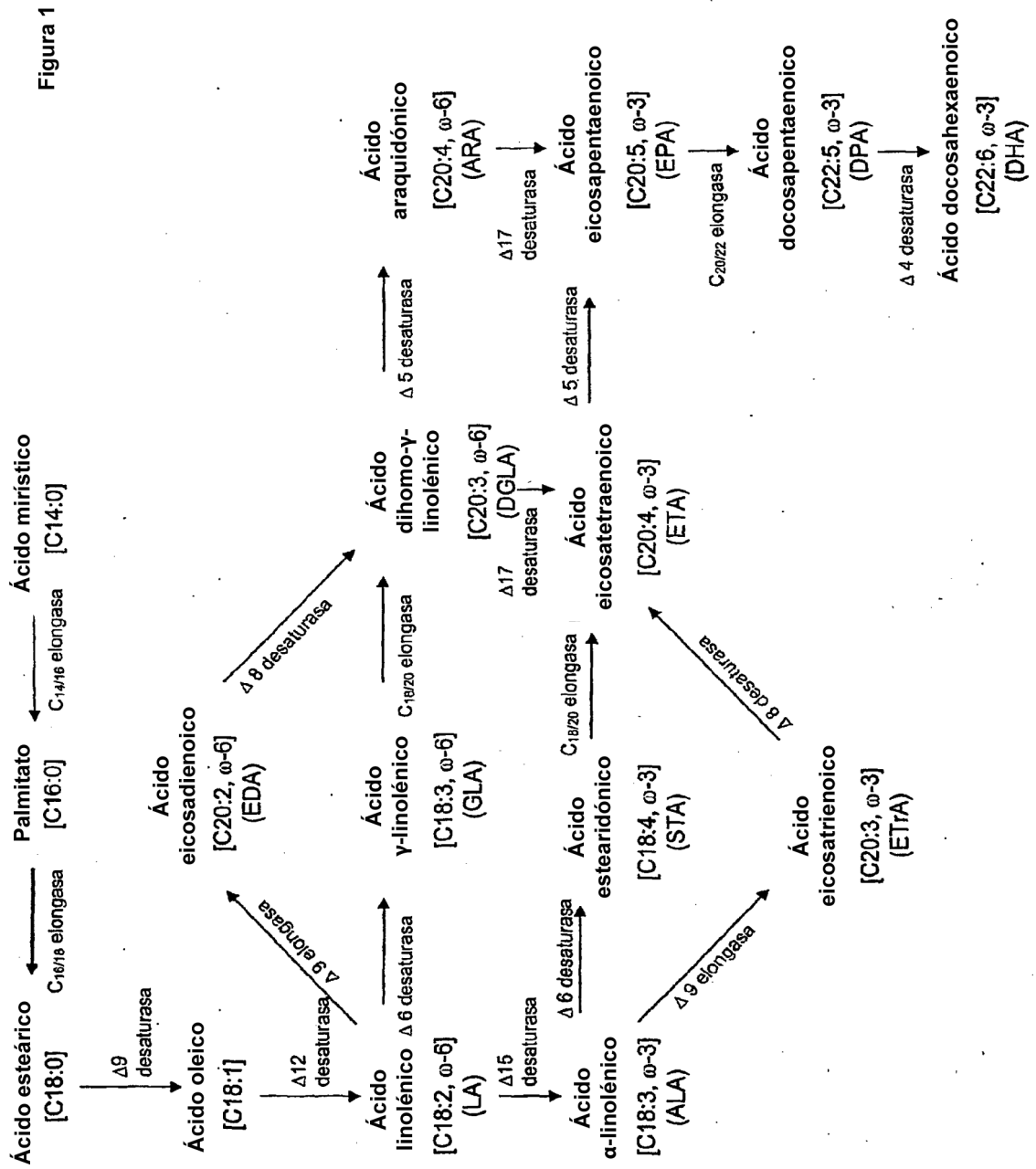


Figura 2

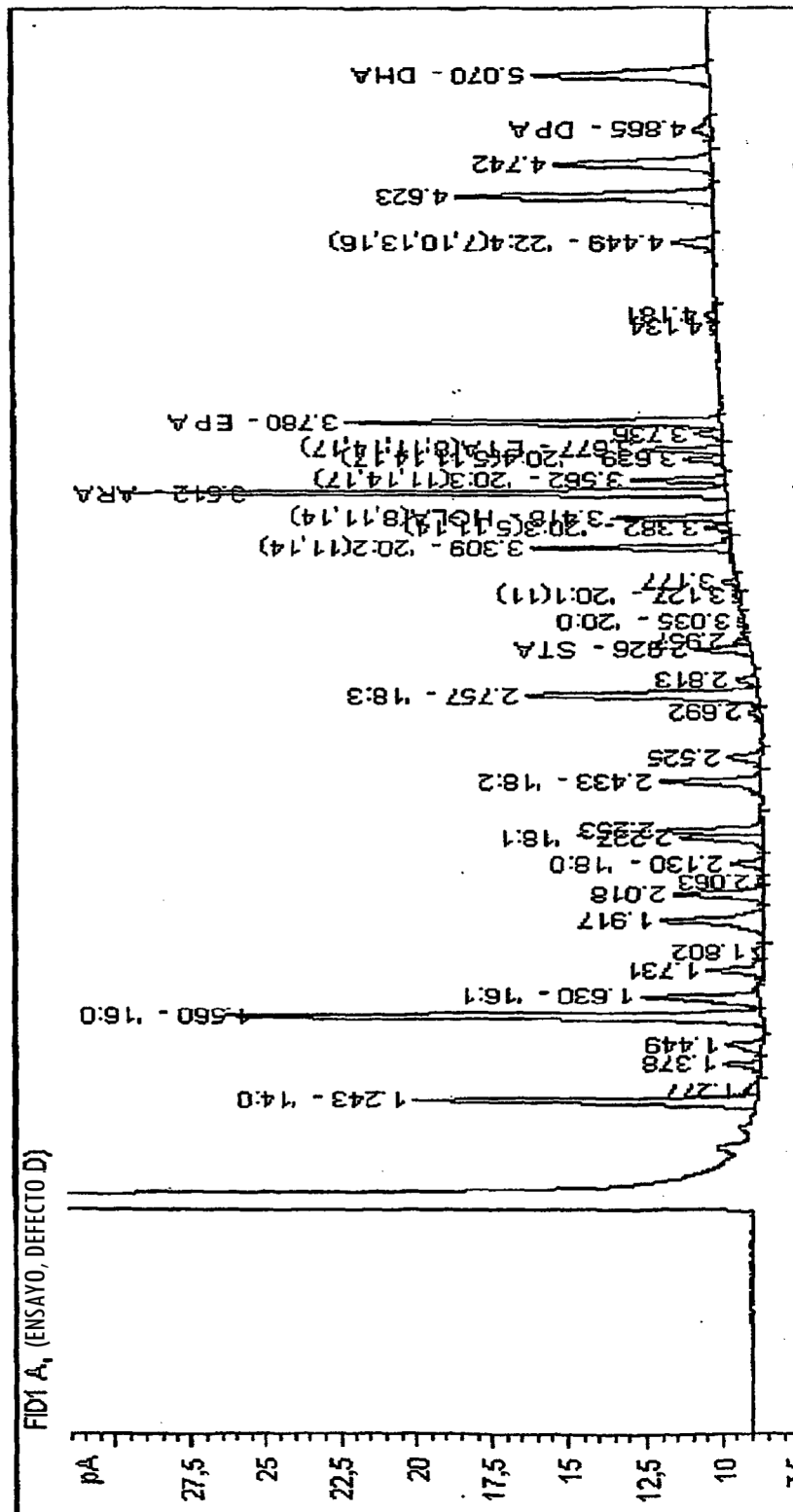


Figura 3

Región conservada 1

205 W E Q H W T - H H A Y T N H A E M D P D S F G A E P M L L F N D - - Y P L D H
 225 W L N Q H V V G H H I Y T N V A G A D P D - L P V D F F K S D V R - - R I V Y R
 204 W L N Q H V V G H H I Y T N V A G A D P D - L P V D F F K S D V R - - R I V H R
 207 W C H Q H V I G H H L Y T N V R N A D P D - L G Q G - E I D F R - - V V T P Y
 178 W K D R H N A - H H H S A T N V R Q G H A D P D - I D N P L L A W S E D D V T R A S
 205 W R A R H N T - H H V C T N E D G S D P D - I K T A P L L I Y V R E N P S I A K
 SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

242 P A R T W L H R F Q A F F Y M P P V L A G Y W L S A V F N P O I L D - L Q Q R G A
 261 Q V L L P I Y K Y Q - H L Y L P P L Y G V L G - - L K F R I Q D D V F E T F V T
 240 Q V L L P I Y K Y Q - H L Y L P P L Y G V L G - - L K F R I Q D D V F E T F V S
 242 Q A R S W Y H K Y Q - H I Y A P I L Y G V Y A - - L K Y R I Q D D - H E I F T K
 216 P I S R K L I Q F Q - Q Y Y F L V I C I L L R - - F I W C F Q S V L T V R S L
 243 R L N - F F Q R W Q - Q Y Y V P T M A I L D - - L Y W R L E S I A Y V A V R
 SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

281 L S V G I R L D N A F I H S R R K Y A V F W R A V Y I A V N V I A P F Y T N S G
 297 L T N G P L R V N P H P V S V G D W A B M I L S K A F W V F Y R I Y L P L A V L Q V
 276 L T N G P L R V N P H P V S V G D W A B M I L S K A F W V F Y R I Y L P L A V L K I
 277 K S N G A I R Y S P I S T I D T A I F I L G K L V E I I S R F I L P L I Y N H S
 252 K D - - - - - L P K M W M Q A A L A A H Y A L - - L C W V F A A H L
 278 - - - - - L P K M W M Q A A L A A H Y A L - - L C W V F A A H L
 SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

321 - L E W S W R V F G N I M L M G V A E S L A L A V L F S L S H N F E S A D R D P
 337 D P A R F W G V F - - - F L A E F S T G W Y L A F N F Q V S H V S T A C E Y P G
 316 T P S T F M G V F - - - F L A E F T T G W Y L A F N F Q V S H V S T E C E Y P C
 317 - F S H L I C F F - - - L I S E L V L G W Y L A I S F Q V S H V S T E D L Q F M A
 288 I L T S L L V F F - - - V S E L V G G F G I A I V F E M N H Y P L E K I G D S
 304 N L I P L M M V A - - - R - - - G F A T G I V V F A T H Y G E D I L D R E
 SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

360 - - - - - T A P L K K T G E P V D W F K T Q V E T S C T Y G G - - F L S G
 374 - - - - - G D E E V - - T S I D D E W A I S Q V K S S V D Y G H G S F I T T
 353 - - - - - G D A P S - - A E V G D E W A I S Q V K S S V D Y A H G S P L A A
 353 T P E I F D G A D H P L P - - T T F N Q G A I L Q V K T Q D Y A Q D S V L S T
 324 - - - - - - - - - V W D G H G F S V G Q I H E T M N I R R G - I I T D
 335 - - - - - - - - - H V E G M T L V E Q T A K T S R N I T G G - W L V N
 SEQ ID NO:14
 SEQ ID NO:13
 SEQ ID NO:12
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:18

Región conservada 2

390 C F T G G L N F Q V E H H L F P 405
 405 F L T G A L N Y Q V T H H L F P 420
 394 F L C G A L N Y Q V T H H L F P 399
 392 F F S G G L N Y Q V I H H C F P 407
 349 W F F G G L N Y Q I E H H L W P 364
 360 V L T G F I S L Q T E H H L F P 375

Figura 4

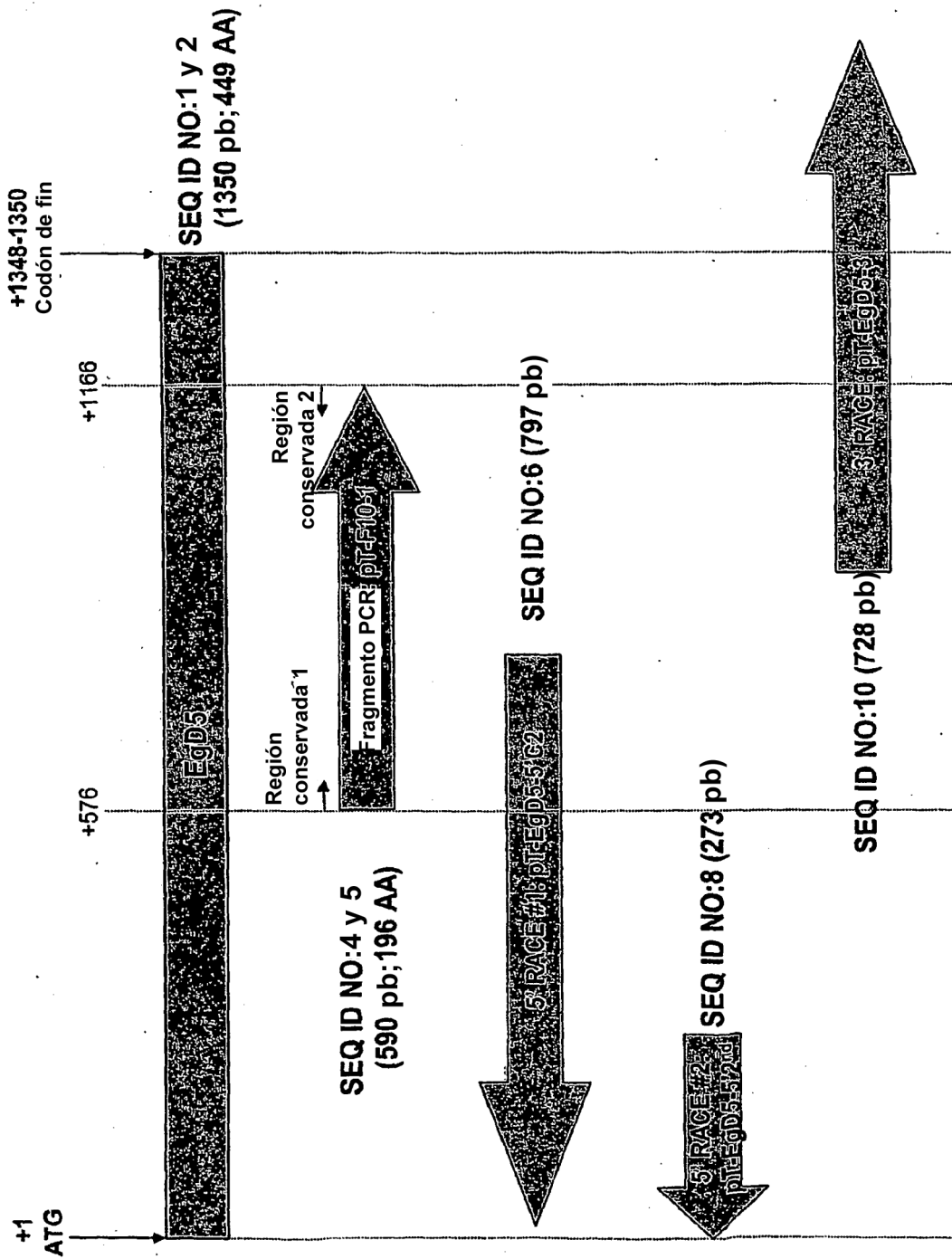


Figura 5

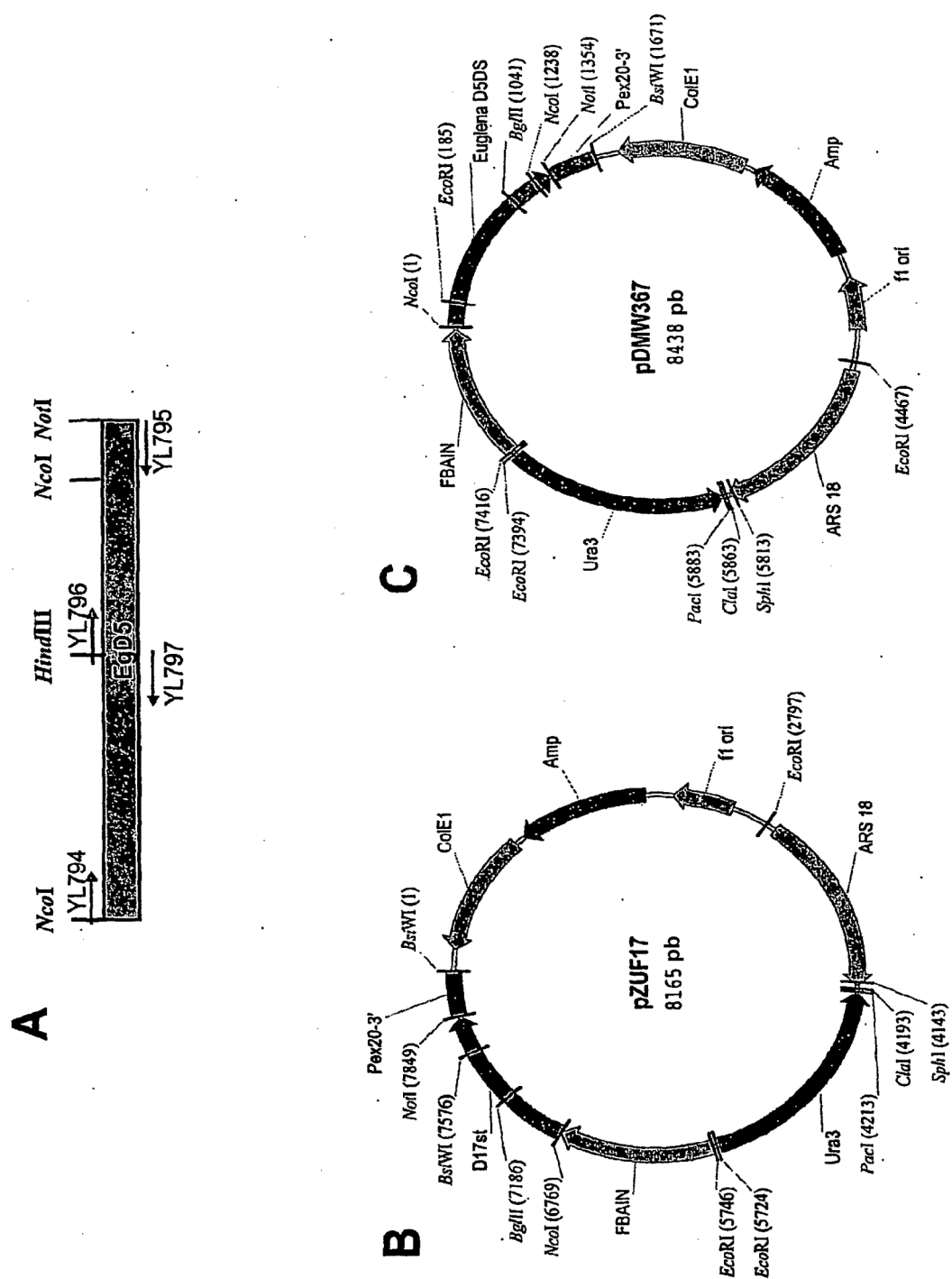


Figura 6

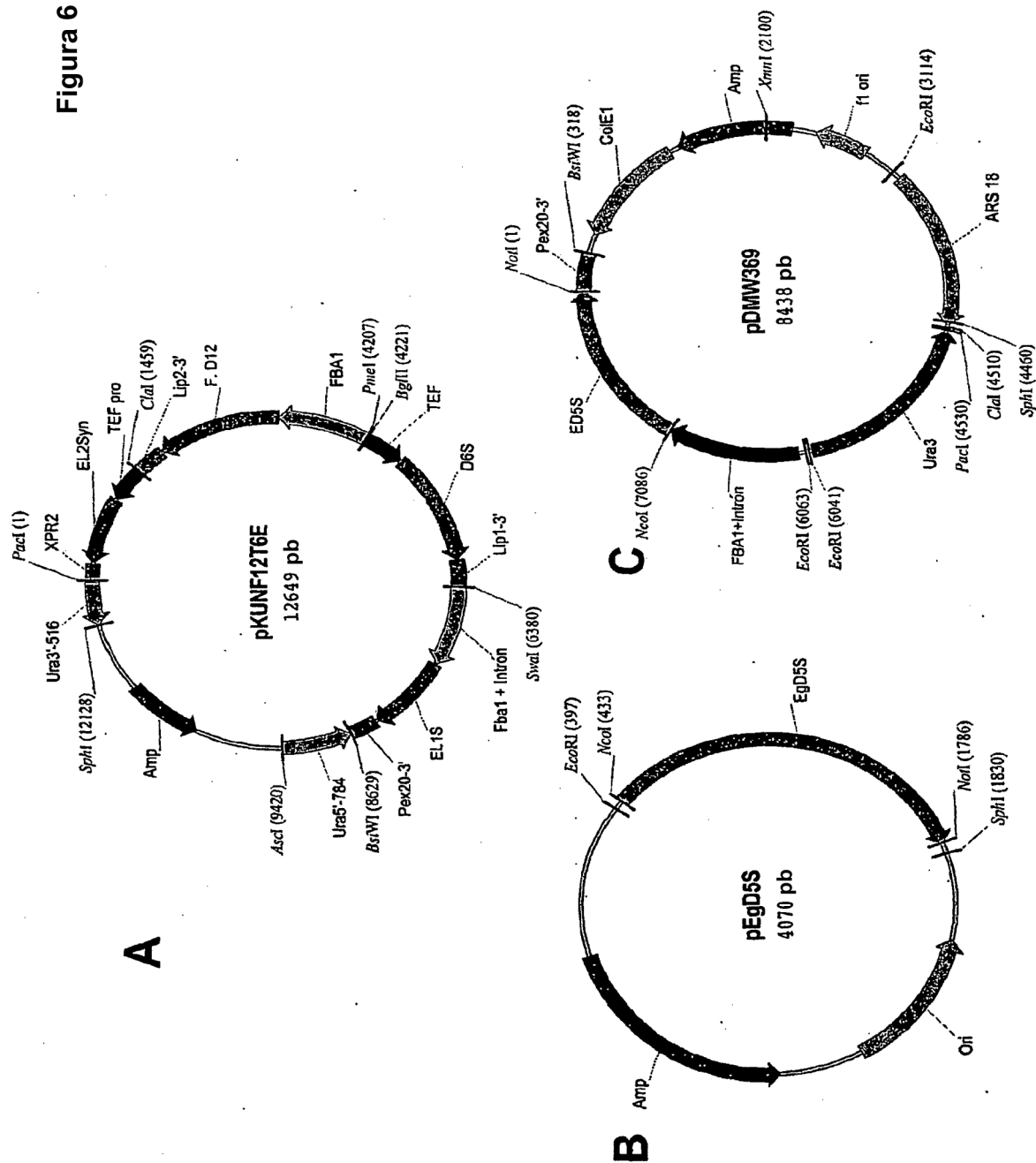


Figura 7

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	SEQ ID NO:1
1	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	SEQ ID NO:1
101	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	SEQ ID NO:1
201	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	SEQ ID NO:1
301	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	SEQ ID NO:1
401	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	SEQ ID NO:1
501	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	SEQ ID NO:1
601	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	SEQ ID NO:1
701	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	SEQ ID NO:1
801	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
901	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	SEQ ID NO:1
901	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
1001	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	SEQ ID NO:1
1001	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	SEQ ID NO:1
1101	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
1201	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	SEQ ID NO:1
1201	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC
1301	1310	1320	1330	1340	1350						SEQ ID NO:1
1301	ATGGCTCTG	AGCTTACG	AGAGAGCT	GTAGAGG	CCGATG	GGATGG	ATGCTT	AGAGG	CTTGAAG	GGCTTGC	CAAGCTTCATC

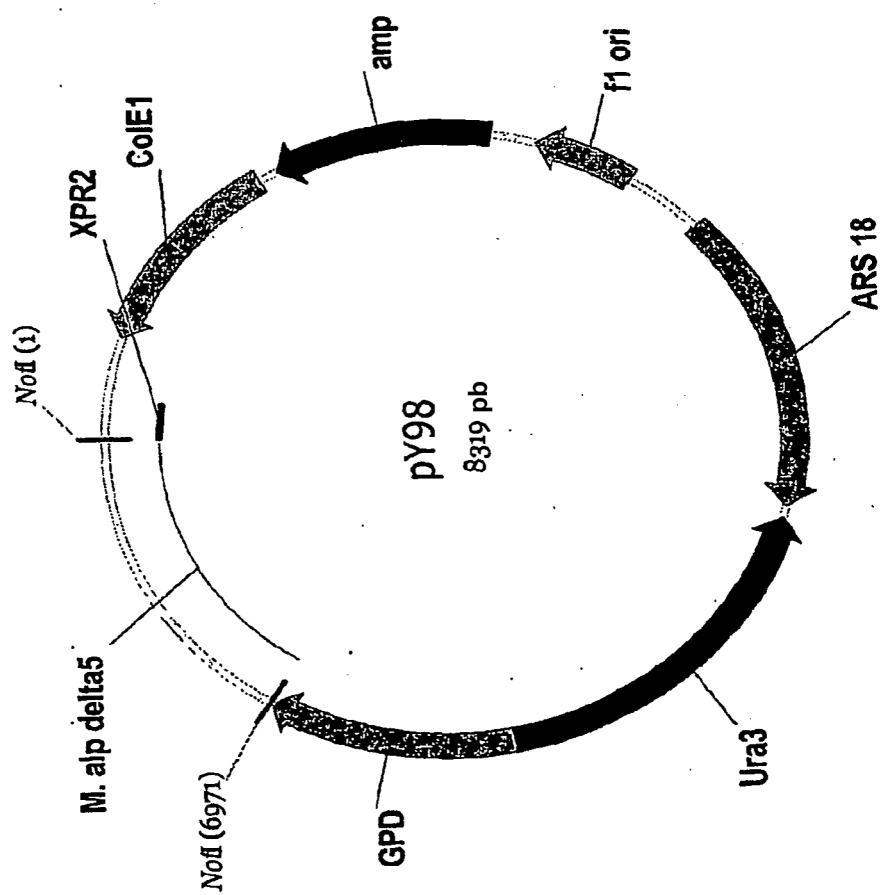
Figura 8A

1	MGKGGDGAQAVSGTDASL---	AEVSSVDSKSVHVLYG	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
1	MGRGDSGQAHPAAELAVPSDRAEVSNADSKALHIVLYG		SEQ ID NO:64 (Pavlova salina).pro
1	MK---S-KRQALP-----	LTID	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
1	MS---TLDRQSI FTIKELESISQRI HDGDEEAMKFIID		SEQ ID NO:63 (Rhizopus stolonifer).pro
1	MS---TLDRQSI FTIKELESISQRI HDGDEEAMKFIID		SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
37	KRV-DVTKFQKAHPGGSKVFRI FQERDATEQFESYHSPKA		SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
41	KRV-DVTKFQRTHPGGSKVFRI FQDRDATEQFESYHSPKA		SEQ ID NO:64 (Pavlova salina).pro
14	GTTYDVSAWVNFHPGGAELIENYQGRDATDAFMVHHSKRA		SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
37	KKVYDVTEFIEDHPGGQVLLTHVGKDSADV FHAMHPESA		SEQ ID NO:63 (Rhizopus stolonifer).pro
37	KKVYDVTEFIEDHPGGQVLLTHVGKDSADV FHAMHPESA		SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
76	IKMMEGMLKKSEDA PASVPLPSRSTMGTEFKEMI ERHKRA		SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
80	IKMMEGMLKKSEDA PADTPLPSQSPMGKDFKAMI ERHVAA		SEQ ID NO:64 (Pavlova salina).pro
54	FDKLR-MPKINPSSSELPPQA AVNEAQEDFRKL REELIAT		SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
77	YEV LNNYFVGDVQETV VTEKSSSAQFAVEMRQLRDQLKKE		SEQ ID NO:63 (Rhizopus stolonifer).pro
77	YEV LNNYFVGDVQETV VTEKSSSAQFAVEMRQLRDQLKKE		SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
116	GLYDPCPLDEL FKLTI VLA PIFVGAYLV---	RSGV-SPL	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
120	GYDPCPLDEL FKLTLVLLPTFAGMYML---	KAGVGSPL	SEQ ID NO:64 (Pavlova salina).pro
83	GMFDASPLWYSYKI STTLGLGLGYFLMVQYQM---	YF	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
117	GYFHSSKLFYAYKVLSTLAI C IAGLSPLYAYGRTSTLAVV		SEQ ID NO:63 (Rhizopus stolonifer).pro
117	GYFHSSKLFYAYKVLSTLAI C IAGLSLLYAYGRTSTLAVV		SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
151	AGALSMGFGFYLDGWL AHDYLLHHA VFKGSVNTLVKANNAM		SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
156	CGALMVSVFGWYLDGWL AHDYLLHHSVFKGSVARTVGNNA A		SEQ ID NO:64 (Pavlova salina).pro
128	IGAVLLGMHYQQMGWLSHDI CHHQTFKNR---	NWNNLV	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
157	ASAITVGI FWQCCGWL AHD FGHHCQCFEDR---	TWNDVL	SEQ ID NO:63 (Rhizopus stolonifer).pro
157	ASAITVGI FWQCCGWL AHD FGHHCQCFEDR---	TWNDVL	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
191	GYALG-FLQGYDVAWWRARHNTHHVCTNEDGSDPDI KTAP		SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
196	GYFLG-FVQGYAVEWWRARHNTHHVCTNEDGSDPDI KTAP		SEQ ID NO:64 (Pavlova salina).pro
163	GLVFGNGLQGF SVTWKDRHNAHSA TNVQGHDPDI DNL P		SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
182	VVFLGNFCQGFSLSWWKNKHNTHHASTNVHGQDPPDI DTAP		SEQ ID NO:63 (Rhizopus stolonifer).pro
182	VVFLGNFCQGFSLSWWKNKHNTHHASTNVHGQDPPDI DTAP		SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro

Figura 8B

230	LLIY-----	260	270	280	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro	
235	LLIY-----	260	270	280	SEQ ID NO:84 (Pavlova salina).pro	
203	LLAWSE-----	260	270	280	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro	
232	VLLWDEYASAA	260	270	280	SEQ ID NO:83 (Rhizopus stolonifer).pro	
232	VLLWDEYASAA	260	270	280	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro	
256	VPTMAILDL	290	300	310	320	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
261	VPTMAILDL	290	300	310	320	SEQ ID NO:84 (Pavlova salina).pro
230	VVICILRLRF	290	300	310	320	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
272	FIL-AFARLS	290	300	310	320	SEQ ID NO:83 (Rhizopus stolonifer).pro
272	FIL-AFARLS	290	300	310	320	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
287	-----	330	340	350	360	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
292	-----	330	340	350	360	SEQ ID NO:84 (Pavlova salina).pro
266	EATGLALH	330	340	350	360	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
305	ERVCI VGH	330	340	350	360	SEQ ID NO:83 (Rhizopus stolonifer).pro
305	ERVCI VGH	330	340	350	360	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
316	ATGI VVF	370	380	390	400	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
321	GTGI TVF	370	380	390	400	SEQ ID NO:84 (Pavlova salina).pro
305	GIAI VFM	370	380	390	400	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
344	TLALVFAL	370	380	390	400	SEQ ID NO:83 (Rhizopus stolonifer).pro
344	TLALVFAL	370	380	390	400	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
358	WLVNVL	410	420	430	440	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro
361	WLVNVL	410	420	430	440	SEQ ID NO:84 (Pavlova salina).pro
346	IIITDWF	410	420	430	440	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro
384	PLGDWFM	410	420	430	440	SEQ ID NO:83 (Rhizopus stolonifer).pro
384	PLGDWFM	410	420	430	440	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro
386	HGLE YR	450	460	470	SEQ ID NO:18 (Pavlova lutheri).pro	
401	HGLE YR	450	460	470	SEQ ID NO:84 (Pavlova salina).pro	
385	HNL PYN	450	460	470	SEQ ID NO:16 (Euglena gracilis).pro	
424	YDI NYH	450	460	470	SEQ ID NO:83 (Rhizopus stolonifer).pro	
424	YDI NYH	450	460	470	SEQ ID NO:51 (Rhizopus stolonifer).pro	

Figura 9



A

Acido graso	Clon	Gen	% delta-5 desat.	Prop. dest. Eg/Ma	Prop. prod./subprod.	Prop. prod./subprod. Eg/Ma	Prop. n-6/n-3
ninguno	pY98	MaD5					
	pDMW367	EgD5					
EDA	pY98	MaD5	3,4	2,7			0,68
	pDMW367	EgD5	8,9				1,76
DGLA	pY98	MaD5	14,0	2,9	4,17	1,08	1,17
	pDMW367	EgD5	40,3		4,52		1,27
ETrA	pY98	MaD5	4,9	1,0			
	pDMW367	EgD5	5,1				
ETA	pY98	MaD5	12,0	2,6	2,44	2,56	
	pDMW367	EgD5	31,8		6,25		

FIG. 11

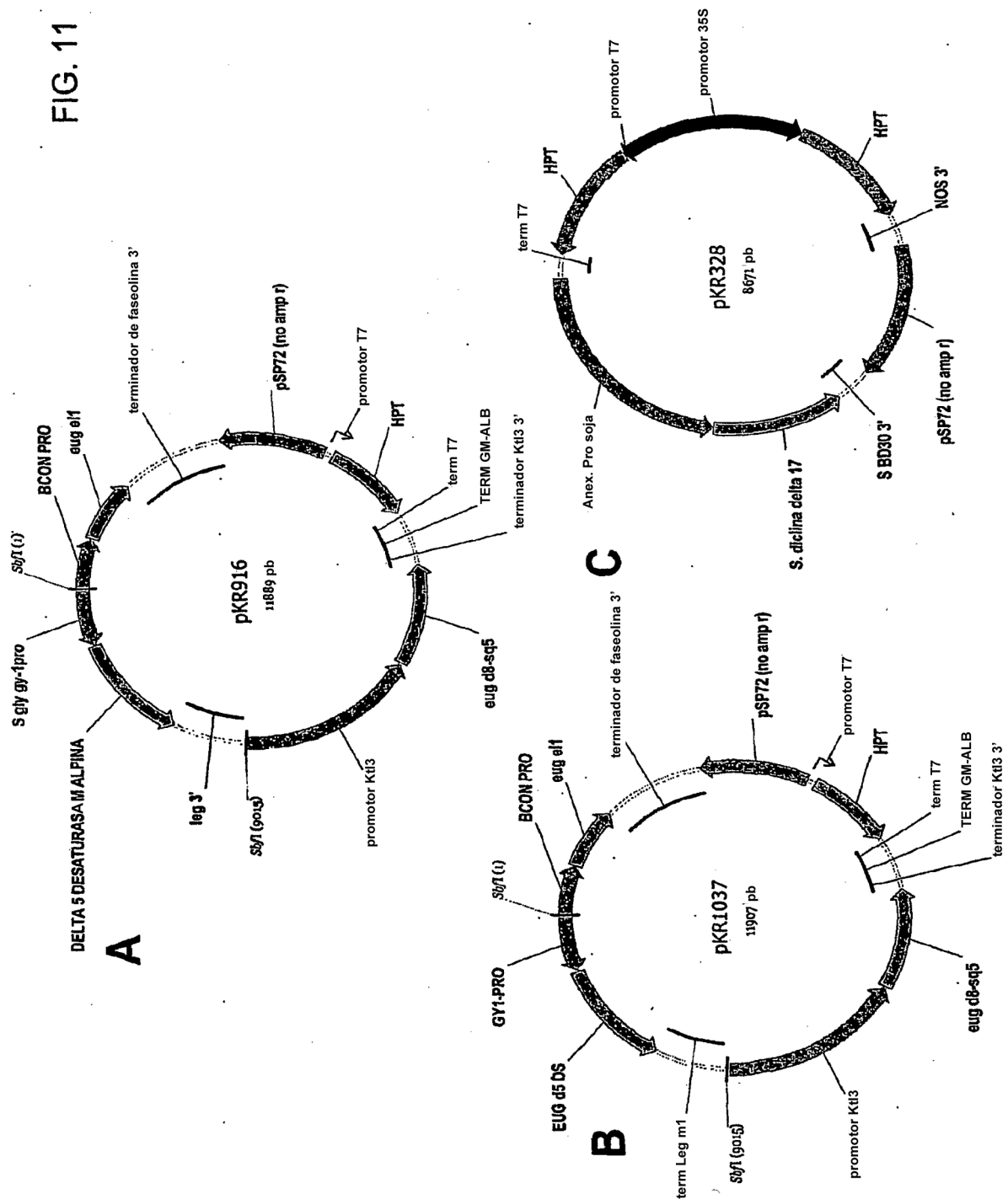


FIG. 12A

	Composición media de ácidos grasos (% en p.)														Correcto % delta-5 desat.	Incorrecto % delta-5 desat.	
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUP	ETA	EPA	Otros			
Acontecim.																	
2010-5-4-1	13,4	2,7	8,1	25,9	13,8	4,9	5,1	0,0	0,8	1,7	8,9	0,0	9,0	5,7	100,0	67,7	
2010-5-12-1	17,2	5,0	14,3	28,4	12,5	5,7	0,8	0,3	0,0	2,1	4,8	0,4	6,0	2,6	89,3	41,5	
2010-13-2-1	14,6	4,5	17,6	25,0	6,6	9,9	1,7	1,1	0,5	1,7	3,8	0,5	8,8	3,7	85,2	32,0	
2010-9-10-1	17,2	4,3	14,7	22,1	7,1	7,1	0,7	0,8	0,1	3,4	5,9	1,7	10,5	4,4	80,6	38,8	
2010-13-3-1	15,9	4,5	15,0	28,5	9,2	7,8	0,1	2,1	0,5	1,3	2,2	0,6	9,5	3,0	78,1	20,8	
2010-6-2-1	17,9	3,4	10,1	18,8	9,4	8,1	0,6	0,3	0,1	6,6	15,1	1,3	4,9	3,3	76,4	52,0	
2010-6-1-1	16,9	3,2	9,8	22,5	7,6	19,2	2,1	3,5	6,5	2,7	0,8	0,5	2,6	2,0	69,5	11,8	
2010-12-8-1	16,0	3,9	14,9	17,2	5,2	18,2	0,3	1,9	0,0	7,0	2,2	1,9	8,4	2,9	68,8	9,2	
2010-9-13-1	16,6	3,6	8,6	26,3	13,1	7,4	0,8	7,2	7,6	1,6	0,2	1,0	4,2	1,7	59,0	10,2	
2010-12-4-1	15,7	4,2	27,6	17,2	4,7	6,7	0,0	3,5	0,0	1,6	0,0	6,8	7,2	4,9	41,2	0,0	

FIG. 12B

	Composición media de ácidos grasos (% en p.)														Correcto % delta-5 desat.	Incorrecto % delta-5 desat.
	16:0	18:0	18:1	LA	ALA	EDA	SCI	DGLA	ARA	ERA	JUP	ETA	EPA	Otros		
Acontecim.																
2036-5-1-1	14,1	3,8	18,8	26,6	8,3	9,8	1,4	0,0	0,3	2,4	3,4	0,1	8,2	2,7		28,2
2041-5-4-1	16,7	4,4	17,1	32,5	11,1	7,3	0,3	0,0	0,1	2,1	1,4	0,1	5,4	1,5		15,2
2036-6-1-1	14,2	3,3	19,3	32,1	11,5	6,0	0,3	0,1	0,2	1,7	2,3	0,1	6,7	2,4		25,3
2036-5-3-1	12,7	2,7	17,2	29,4	7,4	10,2	0,4	0,2	0,3	2,0	1,7	0,3	12,8	2,6		14,9
2041-6-1-1	15,4	4,2	13,2	24,9	8,4	13,8	4,8	0,4	6,2	2,0	1,1	0,0	2,3	2,3		27,2
2036-3-2-1	12,9	2,7	14,5	28,8	5,4	13,8	0,9	0,3	0,5	2,9	3,7	0,4	9,4	3,9		21,4
2041-1-3-1	15,0	4,5	23,7	21,5	9,1	8,3	1,0	0,7	7,4	1,5	0,6	0,3	3,8	2,6		13,8
2036-7-2-1	18,0	4,5	16,5	25,3	13,2	5,4	0,4	0,9	8,9	1,0	0,2	0,4	3,1	2,2		9,1
2036-6-5-1	13,3	3,0	18,5	25,3	6,9	10,1	0,6	0,9	3,1	1,2	0,4	0,9	12,4	3,3		8,1
2036-6-7-1	12,8	3,4	14,9	30,2	6,0	13,3	0,7	2,7	8,8	1,1	0,2	0,7	2,4	2,9		5,5

FIG. 13

