

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 860**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C11B 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.1995 E 95930880 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 0778896**

54 Título: **Secuencias de nucleótidos de genes de palmitoil-ACP tioesterasa de canola y soja y su uso en la regulación del contenido de ácidos grasos de los aceites de las plantas de soja y canola**

30 Prioridad:

**31.08.1994 US 299044**

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

**15.04.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HITZ, WILLIAM DEAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 533 860 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

Secuencias de nucleótidos de genes de palmitoil-ACP tioesterasa de canola y soja y su uso en la regulación del contenido de ácidos grasos de los aceites de las plantas de soja y canola

## Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a la preparación y uso de fragmentos de ácido nucleico que codifican enzimas de plantas de palmitoil-ACP tioesterasa que modifican la composición de lípidos de las plantas. Genes quiméricos que incorporan tales fragmentos de ácido nucleico y secuencias reguladoras adecuadas pueden utilizarse para crear plantas transgénicas con niveles alterados de ácidos grasos saturados.

## Antecedentes de la invención

- 10 Los lípidos de las plantas tienen una diversidad de usos industriales y nutricionales y son fundamentales para la función de la membrana de las plantas y la adaptación al clima. Estos lípidos representan un vasto conjunto de estructuras químicas, y estas estructuras determinan las propiedades fisiológicas e industriales del lípido. Muchas de estas estructuras son resultado directo o indirecto de procesos metabólicos que alteran el grado de saturación del lípido.
- 15 Los lípidos de las plantas encuentran su uso principal como aceites comestibles en la forma de triacilglicerolos. La eficiencia específica y las cualidades sanitarias de los aceites comestibles están determinadas en gran parte por su composición de ácidos grasos. La mayoría de los aceites de plantas derivados de variedades comerciales de plantas se componen fundamentalmente de los ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3). Los ácidos palmítico y esteárico son, respectivamente, ácidos grasos saturados de 16 y 18 carbonos de longitud. Los ácidos oleico, linoleico, y linolénico son ácidos grasos insaturados de 18 carbonos de longitud que contienen uno, dos, y tres enlaces dobles, respectivamente. Al ácido oleico se hace referencia como ácido graso monoinsaturado, mientras que a los ácidos linoleico y linolénico se hace referencia como ácidos grasos poliinsaturados. Las cantidades relativas de ácidos grasos saturados e insaturados en los aceites comestibles de plantas utilizados comúnmente se resumen a continuación (Tabla 1):

- 25 Tabla 1

Porcentajes de Ácidos Grasos Saturados e Insaturados en los Aceites de Cosechas Oleaginosas Seleccionadas

	Saturados	Mono-insaturados	Poli-insaturados
Canola	6%	58%	36%
Soja	15%	24%	61%
Maíz	13%	25%	62%
Cacahuete	18%	48%	34%
Cártamo	9%	13%	78%
Girasol	9%	41%	51%
Algodón	30%	19%	51%

- Muchos esfuerzos de investigación recientes han examinado el papel que juegan los ácidos grasos saturados e insaturados juegan en la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. En el pasado, se creía que los mono-insaturados, en contraste con los saturados y poliinsaturados, no tenían efecto alguno sobre el colesterol en suero y el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. Varios estudios clínicos recientes en humanos sugieren que las dietas ricas en grasa mono-insaturada y bajas en grasa saturada pueden reducir el colesterol "malo" (lipoproteína de baja densidad) mientras que mantienen el colesterol "bueno" (lipoproteína de alta densidad) (Mattson et al., Journal of Lipid Research (1985) 26:194-202). El aceite de soja es rico en ácidos grasos saturados cuando se compara con otras fuentes de aceite de plantas y contiene una proporción baja de ácido oleico, con relación al contenido total de ácido graso de la semilla de soja. Estas características no cumplen necesidades sanitarias importantes como se definen por la American Heart Association.

- Un aceite de soja pobre en saturados y poliinsaturados totales y rico en monoinsaturados proporcionaría beneficios importantes para la salud a la población de los Estados Unidos, así como beneficio económico para los productores de aceite.

- 40 La biosíntesis de aceites en las plantas ha sido bastante bien estudiada [véase Harwood (1989) en Critical Reviews in Plant Sciences, vol. 8 (1): 1-43]. La biosíntesis de los ácidos palmítico, esteárico y oleico ocurre en los plastos por la interacción de tres enzimas fundamentales de la "vía ACP": palmitoil-ACP elongasa, estearoil-ACP desaturasa y las acil-ACP tioesterasas.

De estos tres tipos de enzima, las acil-ACP tioesterasas actúan para separar la cadena acilo de la proteína portadora (ACP) y por tanto del camino metabólico. La oleoil-ACP tioesterasa cataliza la hidrólisis de los oleoil-ACP tioésteres a velocidades altas y a velocidades mucho menores la hidrólisis de palmitoil-ACP y estearoil-ACP. Esta actividad múltiple conduce a competición de sustratos entre las enzimas y es la competición de esta acil-ACP tioesterasa y palmitoil-ACP elongasa para el mismo sustrato y de acil-ACP tioesterasa y estearoil-ACP desaturasa para el mismo sustrato lo que conduce a una porción de la producción de los ácidos palmítico y esteárico encontrados en el triacilglicérido de los aceites de plantas.

Una vez separados de la pista de ACP, los ácidos grasos son exportados al citoplasma y se utilizan en éste para sintetizar la acil-coenzima A. Estas acil-CoA's son los donantes de acilo para al menos tres enzimas acilantes de glicerol diferentes (glicerol-3-P aciltransferasa, 1-acil-glicerol-3-P aciltransferasa y diacilglicerol-aciltransferasa, que incorporan los restos acilo en los triacilglicéridos durante la biosíntesis de los aceites.

Estas aciltransferasas exhiben una preferencia acusada, pero no absoluta, para la incorporación de ácidos grasos saturados en las posiciones 1 y 3 y de ácidos grasos monoinsaturados en la posición 2 del triglicérido. Así, la alteración de la composición de ácidos grasos de la reserva de acilo impulsará por acción de paso un cambio correspondiente en la composición de ácidos grasos del aceite.

Basándose en la exposición anterior, un método para alteración de los niveles de los ácidos palmítico, esteárico y oleico en los aceites de plantas consiste en la alteración de sus niveles en la reserva citoplásmica de acil-CoA utilizada para la biosíntesis de los aceites.

Métodos para modulación del contenido de ácidos grasos en aceites de plantas se conocen por Biochemistry and Molecular Biology of Membrane Storage Lipids of Plants, N. Murata y C.R. Somerville, Eds (Rockville, MD: The American Society of Plant Physiologists), 1993, páginas 60-66, Yadav et al., "Genetic manipulation to alter fatty acid profiles of oilseed crops". En un trabajo previo (WO 9.211.373) la Solicitante ha demostrado que la oleoil-ACP tioesterasa puede modularse utilizando cDNA clonado que codifica la enzima de soja. Se utilizó cDNA de oleoil-ACP tioesterasa para formar genes quiméricos para la transformación de células de la planta de soja dando como resultado la inhibición antisentido de acil-ACP tioesterasa en la semilla de la planta. El cDNA codificante de la enzima de *Brassica napus* ha sido clonado también (Töpfer et al., J Plant Physiol. 143:416-425 (1994).

La Solicitante ha descubierto ahora una tioesterasa de plantas totalmente nueva con actividad sobre un sustrato C16 que es útil también para la regulación de la reserva de acil-coenzima A. La Solicitante ha aislado fragmentos de ácido nucleico que codifican palmitoil-ACP tioesterasas de soja y canola que son útiles en la modificación de la composición de ácidos grasos en especies productoras de aceite por transformación genética. Acil-tioesterasas de plantas que tienen actividad sobre sustratos de palmitoil-ACP se dan a conocer en WO 95/13390. Así, la transferencia de los fragmentos de ácido nucleico de la invención o una parte de los mismos que codifica una enzima funcional, junto con secuencias reguladoras adecuadas que dirigen la transcripción de su mRNA a una célula viva dará como resultado la producción o super-producción de palmitoil-ACP tioesterasas y conducirá a niveles incrementados de ácidos grasos saturados en los lípidos celulares, con inclusión de triacilglicérol.

La transferencia de los fragmentos de ácido nucleico de la invención o una parte de los mismos, junto con secuencias reguladoras adecuadas que dirigen la transcripción de su RNA antisentido, a plantas dará como resultado la inhibición de la expresión de la palmitoil-ACP tioesterasa endógena que es sustancialmente homóloga con el fragmento de ácido nucleico transferido y dará como resultado niveles reducidos de ácidos grasos saturados en los lípidos celulares, con inclusión de triacilglicérol.

La transferencia de los fragmentos de ácido nucleico de la invención o una parte de los mismos, junto con secuencias reguladoras adecuadas que dirigen la transcripción de su mRNA, a plantas puede dar como resultado la inhibición por cosupresión de la expresión del gen endógeno de palmitoil-ACP tioesterasa que es sustancialmente homólogo con el fragmento de ácido nucleico transferido y puede dar como resultado niveles reducidos de ácidos grasos insaturados en los lípidos celulares, con inclusión de triacilglicérol.

### Sumario de la invención

Se ha descubierto un medio para controlar los niveles de ácidos grasos saturados e insaturados en aceites de plantas comestibles. Utilizando el cDNA de palmitoil-ACP tioesterasa de la semilla de soja, como el precursor o enzima, se crean genes quiméricos y pueden utilizarse para transformar plantas de soja a fin de producir aceites de semillas con niveles reducidos de ácidos grasos saturados. Análogamente, puede utilizarse el cDNA de palmitoil-ACP tioesterasa de semilla de canola como el precursor o enzima para crear genes quiméricos y estos genes pueden utilizarse luego para transformar plantas de canola a fin de producir aceites de semillas con niveles reducidos de ácidos grasos saturados.

Específicamente, un aspecto de la presente invención es un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una palmitoil-ACP tioesterasa de plantas en donde (i) dicha secuencia demuestra más de 90% de identidad global con la secuencia de DNA que codifica la proteína funcional madura codificada por los nucleótidos 506 a 1477 de SEQ ID NO: 1 y en donde (ii) dicha tioesterasa codificada cataliza la hidrólisis de palmitoil, estearoil y oleoil-ACP tioésteres, con escisión hidrolítica del enlace tioéster carbono-azufre en

el grupo prostético pantoteno de la proteína portadora de palmitoil-acilo como su reacción preferida. Se prefieren aquellos fragmentos de ácido nucleico definidos por los nucleótidos 1 a 1688 de SEQ ID NO: 1, que codifican la palmitoil-ACP tioesterasa de la semilla de soja, y como se definen por los nucleótidos 506 a 1477 de SEQ ID NO: 1, que codifican la palmitoil-ACP tioesterasa catalíticamente activa de la semilla de soja.

- 5 Otro aspecto de esta invención implica un gen quimérico capaz de transformar una célula de planta de una especie productora de aceite que comprende dicho fragmento de ácido nucleico de este tipo enlazado operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación antisentido, produciendo inhibición antisentido de la palmitoil-ACP tioesterasa de semilla en donde dicha inhibición da como resultado niveles reducidos de ácidos grasos saturados. Otro aspecto de esta invención implica un gen quimérico capaz de transformar una célula de
- 10 planta de una especie productora de aceite que comprende un fragmento de ácido nucleico de este tipo enlazado operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación de sentido, para producir la expresión de sentido del gen de palmitoil-ACP tioesterasa de semilla dando como resultado o bien sobreexpresión de la proteína palmitoil-ACP tioesterasa o la infraexpresión de la proteína palmitoil-ACP tioesterasa cuando ocurre cosupresión. Se prefieren aquellos genes quiméricos que incorporan fragmentos de ácido nucleico como se definen por los
- 15 nucleótidos 1 a 1688 de SEQ ID NO: 1, y que codifican la palmitoil-ACP tioesterasa de semilla de soja.

Otro aspecto de la invención proporciona una célula de planta transformada con un gen quimérico arriba descrito.

- Otra realización adicional de la invención implica un método de producción de aceite de semilla de plantas que contiene niveles inferiores de ácidos palmítico y esteárico, que comprende: (a) transformar una célula de planta con un gen quimérico como se describe arriba o un gen quimérico que comprende una parte de uno de los fragmentos
- 20 de ácido nucleico arriba mencionados que codifican una palmitoil-ACP tioesterasa de planta para producir inhibición antisentido de la palmitoil-ACP tioesterasa de semilla, estando dicha parte enlazada operativamente a secuencias reguladoras adecuadas en orientación antisentido, o un gen quimérico que comprende una parte de uno de los fragmentos de ácido nucleico arriba mencionados que codifica una palmitoil-ACP tioesterasa de planta para producir
- 25 cosupresión de la palmitoil-ACP tioesterasa de semilla, estando dicha parte enlazada operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación de sentido, (b) cultivar plantas fértiles a partir de dichas células de planta transformadas, (c) someter a cribado semillas de la progenie de dichas plantas fértiles respecto a los niveles deseados de ácidos palmítico y esteárico, y (d) triturar dichas semillas de la progenie para obtener dicho aceite que contiene niveles inferiores de los ácidos palmítico y esteárico.

- Una realización adicional de la invención implica un método de producción de aceites a partir de semillas de plantas que contienen niveles mayores de los ácidos palmítico y esteárico, que comprende: (a) transformar una célula de
- 30 planta de una especie productora de aceite con un gen quimérico como se ha mencionado arriba que comprende dicho fragmento de ácido nucleico enlazado operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación de sentido, en donde dicho gen quimérico produce aumento de la palmitoil-ACP tioesterasa de semilla, (b) cultivar plantas fértiles sexualmente maduras a partir de dichas células de planta transformadas de una especie productora
- 35 de aceite, (c) someter a cribado semillas de la progenie de dichas plantas fértiles respecto a los niveles deseados de ácidos palmítico y esteárico, y (d) triturar dicha semilla de la progenie para obtener dicho aceite que contiene niveles mayores de ácidos palmítico y esteárico. Métodos preferidos de transformación de tales células de plantas podrían incluir el uso de plásmidos Ti y Ri de Agrobacterium, electroporación, y bombardeo balístico a alta velocidad.

- Otro aspecto adicional de la invención proporciona el uso de un fragmento de ácido nucleico de la invención o una
- 40 parte del mismo como se ha descrito arriba, a fin de reducir el nivel de palmitoil-ACP tioesterasa en una planta transgénica que contiene un gen endógeno que tiene más de 90% de identidad global con la región codificante de dicho fragmento.

Las Descripciones de Secuencia SEQ ID NOs: 1 y 2 muestran las secuencias de nucleótidos del cDNA de palmitoil-ACP tioesterasa de semilla de soja y el cDNA de palmitoil-ACP tioesterasa de semilla de canola, respectivamente.

#### 45 Descripción detallada de la invención

En el contexto de esta descripción, se utilizarán varios términos.

- Los ácidos grasos se especifican por el número de átomos de carbono y el número y la posición del enlace doble: los números antes y después del signo de dos puntos se refieren a la longitud de cadena y el número de enlaces
- 50 dobles, respectivamente. El número que sigue a la designación del ácido graso indica la posición del enlace doble desde el extremo carboxilo del ácido graso con el sufijo "c" para la configuración cis del enlace doble. Por ejemplo, ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1, 9c), ácido petroselinico (18:1, 6c), ácido linoleico (18:2, 9c, 12c), ácido g-linolénico (18:3, 6c, 9c, 12c) y ácido a-linolénico (18:3, 9c, 12c, 15c). A no ser que se especifique otra cosa, 18:1, 18:2 y 18:3 se refieren a los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico. El término
- 55 "palmitoil-ACP tioesterasa" utilizado en esta memoria se refiere a una enzima que cataliza la escisión hidrolítica del enlace tioéster carbono-azufre en el grupo prostético pantoteno de la proteína portadora de palmitoil-acilo como su reacción preferida. La hidrólisis de otros tioésteres de proteínas portadoras de acilo de ácidos grasos puede ser catalizada también por las enzimas. El término "ácido nucleico" se refiere a una molécula grande que puede ser monocatenaria o bicatenaria, compuesta de monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, un fosfato y una

purina o una pirimidina. Un "fragmento de ácido nucleico" es una fracción de una molécula de ácido nucleico dada. En las plantas superiores, el ácido desoxirribonucleico (DNA) es el material genético, mientras que el ácido ribonucleico (RNA) está implicado en la transferencia de la información en el DNA a proteínas. Un "genoma" es el cuerpo entero de material genético contenido en cada célula de un organismo. El término "secuencia de nucleótidos" se refiere a la secuencia de polímeros de DNA o RNA, que pueden ser mono- o bi-catenarios, que contienen opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas, susceptibles de incorporación en polímeros de DNA o RNA. El término "oligómero" se refiere a secuencias de nucleótidos cortas, usualmente de hasta 100 bases de longitud. Como se utiliza en esta memoria, el término "homólogo a" se refiere a la interrelación entre la secuencia de nucleótidos de dos moléculas de ácido nucleico o entre las secuencias de aminoácidos de dos moléculas de proteína. Estimaciones de dicha homología son proporcionadas por hibridación DNA-DNA o DNA-RNA en condiciones de severidad como es bien comprendido por los expertos en la técnica (Hames e Higgins, editores (1985) *Nucleic Acids Hybridisation*, IRL Press, Oxford, Reino Unido); o por la comparación de semejanza de secuencias entre dos ácidos nucleicos o proteínas, tal como por el método de Needleman et al. (*J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453). Como se utiliza en esta memoria, "sustancialmente homólogo" se refiere a secuencias de nucleótidos que tienen más de 90% de identidad global al nivel de nucleótidos con la región codificante de la secuencia reivindicada, tales como genes y pseudo-genes correspondientes a las regiones codificantes. Los fragmentos de ácidos nucleico descritos en esta memoria incluyen moléculas que comprenden posibles variaciones, tanto artificiales como naturales, tales como, pero sin carácter limitante, (a) aquéllas que implican cambios de bases que no causan cambio en un aminoácido codificado, o (b) que implican cambios de bases que alteran un aminoácido pero no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de DNA, (c) aquéllas derivadas de deleciones, transposiciones, ampliaciones, mutagénesis aleatoria o controlada del fragmento de ácido nucleico, y (d) incluso errores ocasionales de secuenciación de nucleótidos.

"Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, con inclusión de secuencias reguladoras que preceden (5' no codificantes) y siguen (3' no codificantes) a la región codificante. Gen "nativo" se refiere a un gen aislado con sus propias secuencias reguladoras como se encuentran en la naturaleza. "Gen quimérico" se refiere a un gen que comprende secuencias heterogéneas reguladoras y codificantes no encontradas en la naturaleza. Gen "endógeno" se refiere al gen nativo encontrado normalmente en su localización natural en el genoma y que no está aislado. Un gen "extraño" se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo hospedador, pero que es introducido por transferencia génica. "Pseudo-gen" se refiere a una secuencia genómica de nucleótidos que no codifica una enzima funcional.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de DNA que codifica una proteína específica y excluye las secuencias no codificantes. La misma puede constituir una "secuencia codificante ininterrumpida", es decir, que carece de un intrón o puede incluir uno o más intrones limitados por uniones de remodelación apropiadas. Un "intrón" es una secuencia de nucleótidos que se transcribe en el primer transcrito pero que se elimina por escisión y religación del RNA dentro de la célula para crear el mRNA maduro que puede traducirse en una proteína.

"Codón de iniciación" y "codón de terminación" se refieren a una unidad de tres nucleótidos adyacentes en una secuencia codificante que especifica la iniciación y terminación de la cadena, respectivamente, de la síntesis de proteínas (traducción del mRNA). "Marco de lectura abierto" se refiere a la secuencia codificante ininterrumpida por intrones entre los codones de iniciación y terminación que codifica una secuencia de aminoácidos.

"Transcrito de RNA" se refiere al producto resultante de la transcripción de una secuencia de DNA catalizada por RNA-polimerasa. Cuando el transcrito de RNA es una copia complementaria perfecta de la secuencia de DNA, se hace referencia al mismo como un transcrito primario, o puede ser una secuencia de RNA derivada del procesamiento posterior a la transcripción del transcrito primario y se hace referencia al mismo como el RNA maduro. "mRNA mensajero (mRNA)" se refiere al RNA que carece de intrones y que puede ser traducido en proteína por la célula. "cDNA" se refiere a un DNA bicatenario que es complementario a y se deriva de mRNA. RNA "de sentido" se refiere a un transcrito de RNA que incluye el mRNA. "RNA antisentido" se refiere a un transcrito de RNA que es complementario a la totalidad o parte de un transcrito primario diana o mRNA y que bloquea la expresión de un gen diana por interferir con el procesamiento, el transporte y/o la traducción de su transcrito primario o mRNA. La complementariedad de un RNA antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia no codificante 5', la secuencia no codificante 3', los intrones, o la secuencia codificante. Adicionalmente, como se utiliza en esta memoria, el RNA antisentido puede contener regiones de secuencias de ribozima que aumentan la eficacia del RNA antisentido para bloquear la expresión génica. "Ribozima" se refiere a un RNA catalítico e incluye endorribonucleasas específicas de la secuencia.

Como se utiliza en esta memoria, las "secuencias reguladoras adecuadas" se refieren a secuencias de nucleótidos en genes nativos o quiméricos que están localizadas aguas arriba (5'), dentro de, y/o aguas abajo (3') de los fragmentos de ácido nucleico de la invención, que controlan la expresión de los fragmentos de ácido nucleico de la invención. El término "expresión", como se utiliza en esta memoria, se refiere a la transcripción y acumulación estable del RNA sentido (mRNA) o el RNA antisentido derivado del o de los fragmentos de ácido nucleico de la invención que, en asociación con el aparato proteínico de la célula, da como resultado niveles alterados de la palmitoil-ACP tioesterasa. La expresión o sobreexpresión del gen implica la transcripción del gen y traducción del mRNA en proteínas de palmitoil-ACP tioésteres precursoras o maduras. "Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de RNA antisentido capaces de prevenir la expresión de la proteína diana.

- "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto génico en organismos transgénicos que excede los niveles de producción en organismos normales o no transformados. "Cosupresión" se refiere a la expresión de un gen extraño que tiene homología sustancial con un gen endógeno dando como resultado la supresión de la expresión de ambos genes extraño y endógeno. "Niveles alterados" se refiere a la producción de uno o más productos génicos en organismos transgénicos en cantidades o proporciones que difieren de la de los organismos normales o no transformados.
- "Promotor" se refiere a una secuencia de DNA en un gen, usualmente aguas arriba (5') de su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante por proporcionar el reconocimiento para la RNA-polimerasa y otros factores requeridos para transcripción apropiada. En los constructos de DNA artificiales, pueden utilizarse también promotores para transcribir RNA antisentido. Los promotores pueden contener también secuencias de DNA que están implicadas en la fijación de factores proteínicos que controlan la eficacia de la iniciación de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o de desarrollo. Pueden contener también elementos intensificadores. Un "intensificador" es una secuencia de DNA que puede estimular la actividad de los promotores. El mismo puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para aumentar el nivel y/o la especificidad de tejido de un promotor. El término "promotores constitutivos" se refiere a aquéllos que dirigen la expresión génica en todos los tejidos y en todo momento. Los promotores "específicos de tejido" o "específicos del desarrollo" se refieren en esta memoria a aquéllos que dirigen la expresión génica casi exclusivamente en tejidos específicos, tales como hojas o semillas, o en etapas de desarrollo específicas en un tejido, tal como en la embriogénesis precoz o tardía, respectivamente.
- El término "secuencias 3' no codificantes" se refiere a la porción de secuencia de DNA de un gen que contiene una señal de poliadenilación y cualquier otra señal reguladora capaz de afectar al procesamiento del mRNA o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza usualmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de mRNA.
- "Transformación" hace referencia en esta memoria a la transferencia de un gen extraño al genoma de un organismo hospedador y su herencia genéticamente estable. "Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción" se refiere a longitudes de fragmentos de restricción de tamaño diferente debidas a secuencias nucleotídicas alteradas en o alrededor de formas de genes variantes. "Fértil" se refiere a plantas que son capaces de propagarse sexualmente.
- "Plantas" se refiere a organismos fotosintéticos, tanto eucariotas como procariotas, mientras que el término "plantas superiores" se refiere a plantas eucariotas. "Especies productoras de aceite" se refiere en esta memoria a especies de plantas que producen y almacenan triacilglicerol en órganos específicos, fundamentalmente en las semillas. Tales especies incluyen soja (*Glycine max*), colza y canola (con inclusión de *Brassica napus*, *B. campestris*), girasol (*Helianthus annuus*), algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz (*Zea mays*), cacao (*Theobroma cacao*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), palma de aceite (*Elaeis guineensis*), cacaotero (*Cocos nucifera*), lino (*Linum usitatissimum*), ricino (*Ricinus communis*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*). El grupo incluye también especies no agronómicas que son útiles en el desarrollo de vectores de expresión apropiados tales como tabaco, especies de *Brassica* de ciclo rápido, y *Arabidopsis thaliana*, y especies silvestres que pueden ser una fuente de ácidos grasos singulares.
- "Protocolos dependientes de la secuencia" se refiere a técnicas que se basan en una secuencia de nucleótidos para su utilidad. Ejemplos de protocolos dependientes de la secuencia incluyen, pero sin carácter limitante, los métodos de hibridación de ácido nucleico y oligómeros y métodos de amplificación de DNA y RNA tales como los que se ilustran en diversos usos de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- "PCR" o "reacción en cadena de polimerasa" se referirá a un método que da como resultado la amplificación lineal o logarítmica de moléculas de ácido nucleico. La PCR requiere generalmente una composición de replicación constituida, por ejemplo, por nucleótido-trifosfatos, dos cebadores con secuencias apropiadas, DNA o RNA-polimerasa y proteínas. Estos reactivos y detalles que describen procedimientos para uso en la amplificación de ácidos nucleicos se proporcionan en la Patente U.S. 4.683.202 (1987, Mullis, et al.) y la Patente U.S. 4.683.195 (1986, Mullis, et al.).
- Dos fragmentos de ácido nucleico que codifican palmitoil-ACP tioesterasas de semillas de soja y canola se dan a conocer en esta memoria. Estas enzimas catalizan las disociaciones hidrolíticas de ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico de la ACP en las acil-ACPs respectivas. La transferencia de uno o ambos de estos fragmentos de ácido nucleico o una parte de los mismos que codifica una enzima funcional, con secuencias reguladoras adecuadas a una célula viva dará como resultado la producción o super-producción de palmitoil-ACP tioesterasa, que puede dar como resultado niveles incrementados de ácido palmítico y, en menor proporción, ácidos esteáricos en los lípidos celulares, con inclusión de aceite.
- La transferencia del fragmento o fragmentos de ácido nucleico de la invención, con secuencias reguladoras adecuadas que transcriben el presente cDNA, a una planta que tiene una palmitoil-ACP tioesterasa de semilla endógena que es sustancialmente homogénea con el presente cDNA puede dar como resultado la inhibición por cosupresión de la expresión del gen endógeno de palmitoil-ACP tioesterasa y, como consecuencia, una cantidad reducida de ácido palmítico y en menor proporción ácidos esteáricos en el aceite de la semilla.

La transferencia del fragmento o fragmentos de ácido nucleico de la invención a una o más plantas de soja o canola con secuencias reguladoras adecuadas que transcriben el RNA antisentido complementario al mRNA, o su precursor, para palmitoil-ACP tioesterasa de semilla puede dar como resultado la inhibición de la expresión del gen endógeno de palmitoil-ACP tioesterasa y, como consecuencia, cantidades reducidas de ácido palmítico y en menor proporción ácidos esteáricos en el aceite de la semilla.

Un experto en la técnica apreciará que los fragmentos de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse también como marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción en los estudios genéticos y programas de mejora genética de soja y canola.

Identificación y aislamiento de cDNA codificante de palmitoil-ACP tioesterasa de soja y canola

Con objeto de identificar cDNA codificante de palmitoil-ACP tioesterasa en ambas semillas de soja y canola, fue necesario en primer lugar construir una sonda adecuada para cribado de bibliotecas de cDNA a partir de estos genomas de plantas. Una porción del cDNA de *Arabidopsis* conocida por Grellet et al., *Plant Physiol. Biochem.* 31: 599-602 (1993) y Dörmann et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316: 612-618 (1995) que tiene homología significativa con una C12:0-ACP tioesterasa de *Umbellularia* se utilizó para diseñar cebadores PCR (SEQ ID NO: 3 y 4). Se aisló RNA polisómico y se purificó a partir de *Arabidopsis* utilizándose como molde para RNA-PCR (kit PNA-PCR GeneAmp® de Perkin Elmer Cetus, parte número N808-0017). Utilizando este método se generó un fragmento de 560 pb, y se radiomarcó para utilización como sonda para cribado de bibliotecas de cDNA de soja y canola.

Métodos de creación de bibliotecas de cDNA a partir de genomas eucariotas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). En un método preferido, se aísla RNA total (Kamalay et al., (*Cell* (1980) 19: 935-946) y se purifica el mRNA poliadenilado por medios estándar. El mRNA se incorpora en un fago adecuado tal como el fago lambda y se utiliza para transformar un hospedador adecuado tal como *E. coli*. Los clones transformados se someten a cribado respecto a calvas que se hibridan positivamente utilizando la sonda derivada de PCR radiomarcada.

De esta manera, se seleccionaron fragmentos de DNA a partir de soja y canola que tenían potencial para codificar una acil-ACP tioesterasa. El fragmento de DNA aislado de soja se identifica como SEQ ID NO: 1, y los fragmentos de DNA aislados de canola se identifican como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 31.

Expresión de DNA codificante de acil-ACP tioesterasa de soja y canola en *E. coli*

Con objeto de comprobar la función de los fragmentos de DNA de soja y canola aislados fue necesario expresar los fragmentos en hospedadores recombinantes para purificación de proteínas y análisis de la actividad enzimática.

Se describen en esta memoria vectores y células hospedadoras adecuados para manipulaciones genéticas, y la expresión de proteínas recombinantes. Hospedadores adecuados pueden incluir una diversidad de bacterias gram-negativas y gram-positivas, prefiriéndose generalmente *E. coli*. Ejemplos de vectores derivados de bacterias incluyen vectores de plásmido tales como pBR322, pUC19, pSP64, pUR278 y pORF1. Ilustrativos de vectores virales adecuados son los derivados de fago, vaccinia, y una diversidad de virus. Ejemplos de vectores de fago incluyen 1<sup>+</sup>, 1EMBL3, 12001, 1gt10, 1gt11, Charon 4a, Charon 40, 1ZAP/R, pXB3 y pSC11 son ilustrativos de vectores de vaccinia (Chakrabarti et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:3401-9 (1985) y Mackett et al. *J. Virol.* 49:857864 (1984). También son útiles posiblemente los vectores derivados de bacterias tales como pET-3d (descrito por F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn y J. W. Dubendorff, *Methods in Enzymology* Vol. 185) y la cepa hospedadora de *E. coli* BL21 (DE3) (pLysE).

Una vez construidos los vectores adecuados, se utilizan los mismos para transformar hospedadores bacterianos adecuados. La introducción de fragmentos de DNA deseados en *E. coli* puede realizarse por procedimientos conocidos tales como por transformación, v.g., utilizando células permeabilizadas al calcio, electroporación, o por transfección utilizando un virus de fago recombinante. (Sambrook et al., *supra*.)

Para la expresión de los fragmentos de DNA de soja y canola (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente) los fragmentos se cortaron primeramente con las enzimas de restricción apropiadas para el aislamiento de la región codificante de la proteína madura. Después de esto, los fragmentos de restricción se ligaron a una secuencia enlazadora apropiada y se insertaron en un vector adecuado aguas abajo de un promotor apropiado. Los promotores adecuados pueden ser inducibles o constitutivos, y pueden derivarse de bacterias. Ejemplos de promotores adecuados j son T7 y lac.

Ensayo de tioesterasa:

Métodos para la medida de la actividad de tioesterasa se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Smith et al., *Biochem. J.* 212, 155, (1983) y Spencer et al., *J. Biol. Chem.*, 253, 5922, (1978)). Para el propósito de la presente invención, se utilizó una modificación del método de McKeon y Stumpf [*J. Biol. Chem.* (1982) 257:12141-12147] que implicaba la síntesis de sustrato radiomarcado ([<sup>14</sup>C]acil-ACP) utilizando ACP y ACP-sintetasa aislada de *E. coli*. Se añadieron soluciones de [<sup>14</sup>C] ácido palmítico, [<sup>14</sup>C] ácido esteárico, [<sup>14</sup>C] ácido oleico, [<sup>14</sup>C] ácido láurico, y [<sup>14</sup>C] ácido decanoico a ACP purificada en presencia de ACP-sintetasa y la acil-ACP radiomarcada resultante se purificó

por métodos estándar. La actividad de la proteína codificada y expresada por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 se midió sobre la base de la cantidad de sustrato [<sup>14</sup>C] que se hidrolizó.

#### Inhibición de Genes Diana de Plantas por Utilización de RNA Antisentido

5 Se ha utilizado RNA antisentido para inhibir genes diana de plantas de una manera específica de tejido (véase van der Krol et al., *Biotechniques* (1988) 6:958-976). La inhibición antisentido se ha demostrado utilizando la secuencia de cDNA entera (Sheehy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85:8805-8809) así como una secuencia parcial de cDNA (Cannon et al., *Plant Molec. Biol.* (1990) 15:39-47). Existen pruebas también de que las secuencias 3' no codificantes (Ch'ng et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86:10006-10010) y fragmentos de secuencia codificante 10 5', que contienen tan pocos como 41 pares de bases de un cDNA de 1,87 kb (Cannon et al., *Plant. Molec. Biol.* (1990) 15:39-47), pueden jugar papeles importantes en la inhibición antisentido.

El cDNA entero de palmitoil-ACP tioesterasa de soja se clonó en la orientación antisentido con respecto a un promotor de  $\beta$ -conglucina de soja, y el gen quimérico se transformó en embriones somáticos de soja. Como se demuestra en el Ejemplo 2, estos embriones sirven como un sistema modelo satisfactorio para embriones cigóticos de soja. Los embriones somáticos transformados exhibían inhibición de la síntesis de palmitato y posiblemente de 15 estearato. Análogamente, se clonó el cDNA entero de palmitoil-ACP de *Brassica napus* en la orientación antisentido con respecto a un promotor de napina de colza y el gen quimérico se transformó en *B. napus*.

#### Inhibición de Genes Diana de Plantas por Cosupresión

El fenómeno de la cosupresión ha sido utilizado también para inhibir genes diana de plantas de una manera específica de tejido. La cosupresión de un gen endógeno utilizando la secuencia de cDNA entera (Napoli et al., *The Plant Cell* (1990) 2: 279-289; van der Krol et al., *The Plant Cell* (1990) 2:291-299) así como una secuencia parcial de 20 cDNA (730 pb de un cDNA de 1770 pb) (Smith et al., *Mol. Gen. Genetics* (1990) 224:477-481) se conocen.

Los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención que codifican palmitoil-ACP tioesterasas o partes de las mismas enlazadas operativamente a secuencias reguladoras adecuadas para formar genes quiméricos, pueden utilizarse para reducir el nivel de palmitoil-ACP tioesterasa, alterando con ello la composición de ácidos grasos, en 25 plantas transgénicas que contienen un gen endógeno sustancialmente homólogo al fragmento de ácido nucleico introducido. Los procedimientos experimentales necesarios para esto son similares a los arriba descritos para la expresión antisentido de fragmentos de ácido nucleico de palmitoil-ACP tioesterasa, excepto que puede utilizarse un cDNA total o parcial.

Pueden ser inhibidos también genes endógenos por regiones no codificantes de una copia del gen introducida [por ejemplo, Brusslan, J. A., et al. (1993) *Plant Cell* 5:667-677; Matzke, M. A. et al *Plant Molecular Biology* 16:821-830]. 30

#### Selección de Hospedadores, Promotores e Intensificadores

Una clase preferida de hospedadores heterólogos para la expresión de los fragmentos de ácido nucleico de la invención son hospedadores eucariotas, particularmente las células de plantas superiores. Particularmente 35 preferidas entre las plantas superiores son las especies productoras de aceite, tales como soja (*Glycine max*), colza (con inclusión de *Brassica napus*, *B. campestris*), girasol (*Helianthus annuus*), algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz (*Zea mays*), cacao (*Theobroma cacao*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), palma de aceite (*Elaeis guineensis*), cacaotero (*Cocos nucifera*), lino (*Linum usitatissimum*), y cacahuete (*Arachis hypogaea*).

La expresión en plantas utilizará secuencias reguladoras funcionales en tales plantas. La expresión de genes extraños en plantas está bien establecida (De Blaere et al., *Meth. Enzymol.* (1987) 153:277-291). La fuente del 40 promotor seleccionada para dirigir la expresión de los fragmentos de la invención no es crítica, con tal que la misma tenga actividad de transcripción suficiente para llevar a la práctica la invención por aumento o disminución, respectivamente, del nivel de mRNA traducible para las desaturasas de ácidos grasos en el tejido hospedador deseado. Tales promotores incluyen (a) promotores de plantas constitutivos fuertes, tales como los que dirigen los transcritos 19S y 35S en el virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., *Nature* (1985) 313-810-812; Hull et al., 45 *Virology* (1987) 86:482-493), (b) promotores específicos de tejido o de desarrollo, y (c) otros sistemas promotores de la transcripción modificados por ingeniería en plantas, tales como los que utilizan secuencias promotoras de RNA-polimerasa del bacteriófago T7 para expresar genes extraños. Ejemplos de promotores de tejido son el promotor inducible por la luz de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa (si se desea expresión en tejidos fotosintéticos), el promotor de la proteína zeína del maíz (Matzke et al., *EMBO J.* (1984) 3:1525-1532), y el promotor 50 de la proteína de fijación de clorofila a/b (Lampa et al., *Nature* (1986) 316:750-752).

Se utilizan también promotores que permiten expresión específica de semillas. Esto puede ser especialmente útil, dado que las semillas son la fuente primaria de aceites de plantas, y debido también a que la expresión específica de semilla evitará cualquier efecto deletéreo potencial en tejidos distintos de semilla. Ejemplos de promotores 55 específicos de semilla incluyen, pero sin carácter limitante, los promotores de proteínas de reserva en semillas, que pueden representar hasta el 90% de la proteína de semillas total en muchas plantas. Las proteínas de reserva en semillas están reguladas estrictamente, siendo expresadas casi exclusivamente en semillas de una manera muy específica de tejido y específica de la etapa (Higgins et al., *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1984) 35:191-221; Goldberg et



al., Cell (1989) 56:149-160). Además, proteínas diferentes de reserva de semillas pueden expresarse en etapas diferentes del desarrollo de la semilla.

La expresión de genes específicos de semilla ha sido estudiada con gran detalle (véanse las revisiones de Goldberg et al., Cell (1989) 56: 149-160 e Higgins et al., Ann. Rev. Plant Physiol. (1984) 35: 191-221). Existen actualmente numerosos ejemplos de expresión específica en semilla de genes de proteínas de reserva de semillas en plantas transgénicas dicotiledóneas. Éstos incluyen genes de plantas dicotiledóneas para b-faseolina de judía (Sengupta-Gopalan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:3320-3324; Hoffman et al., Plant Mol. Biol. (1988) 11:717-729), lectina de judía (Voelker et al., EMBO J. (1987) 6:3571-3577), lectina de soja (Okamuro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8240-8244), inhibidor de tripsina de Kunitz de soja (Perez-Grau et al., Plant Cell (1989) 1:095-1109), b-conglicina de soja (Beachy et al., EMBO J. (1985) 4:3047-3053; vicilina de guisante (Higgins et al., Plant Mol. Biol. (1988) 11:683-695), convicilina de guisante (Newbiggin et al., Planta (1990) 180:461-470), legumina de guisante (Shirsat et al., Mol. Gen. Genetics (1989) 215:326-331); napin de colza (Radke et al., Theor. Appl. Genet. (1988) 75:685-694) así como genes de plantas monocotiledóneas tales como la zeína del maíz 15 kD (Hoffman et al., EMBO J. (1987) 6:3213-3221), oleosina del maíz 18 kD (Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:6181-6185), b-hordeína de la cebada (Marris et al., Plant Mol. Biol. (1988) 10:359-366) y glutenina de trigo (Colot et al., EMBO J. (1987) 6:3559-3564).

Además, promotores de genes específicos de semilla enlazados operativamente a secuencias codificantes heterólogas en constructos de genes quiméricos mantienen también su patrón de expresión temporal y espacial en plantas transgénicas. Tales ejemplos incluyen el promotor del gen de la proteína de reserva 2S de la semilla de *Arabidopsis thaliana* para expresar péptidos de encefalina en semillas de *Arabidopsis* y *B. napus* (Vandekerckhove et al., Bio/Technology (1989) 7: 929-932), promotores de lectina de haba y b-faseolina de judía que expresan luciferasa (Riggs et al., Plant Sci. (1989) 63:47-57), y promotores de glutenina de trigo que expresan cloranfenicol-acetil-transferasa (Colot et al., EMBO J. (1987) 6: 3559-3564).

De uso particular en la expresión del fragmento de ácido nucleico de la invención serán los promotores heterólogos procedentes de varios genes de la proteína de semillas de la soja tales como los correspondientes al inhibidor de tripsina de Kunitz (Jofuku et al., Plant Cell (1989) 1:1079-1093; glicina (Nielson et al., Plant Cell (1989) 1:313-328), y b-conglicina (Harada et al., Plant Cell (1989) 1: 415-425). Los promotores de genes para las subunidades a y b de la proteína de reserva de b-conglicina de soja serán particularmente útiles en la expresión del mRNA o el RNA antisentido en los cotiledones en las etapas media a tardía del desarrollo de la semilla (Beachy et al., EMBO J. (1985) 4: 3047-3053) en plantas transgénicas. Esto es debido a que existe muy poco efecto de posición en su expresión en semillas transgénicas, y los dos promotores exhiben regulación temporal diferente. El promotor para el gen de la subunidad a se expresa unos cuantos días antes del correspondiente al gen de la subunidad b. Esto es importante para la transformación de la colza, en la que la biosíntesis comienza aproximadamente una semana antes de la síntesis de la proteína de reserva de la semilla (Murphy et al., J. Plant Physiol. (1989) 135:63-69).

Serán también de uso particular promotores de genes expresados durante la embriogénesis temprana y la biosíntesis del aceite. Las secuencias reguladoras naturales, con inclusión de los promotores nativos, de los genes de palmitoil-ACP tioesterasa que expresan los fragmentos de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse después de su aislamiento por los expertos en la técnica. Serán útiles promotores heterólogos de otros genes implicados en la biosíntesis del aceite de semillas, tales como los correspondientes a isocitrato-liasa y malato-sintasa de *B. napus* (Comai et al., Plant Cell (1989) 1: 293-300), Delta-9 desaturasa de cártamo (Thompson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2578-2582) y ricino (Shanklin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2510-2514), proteína portadora de acilo (ACP) de *Arabidopsis* (Post-Beittenmiller et al., Nucl. Acids Res. (1989) 17:1777), *B. napus* (Safford et al., Eur. J. Biochem. (1988) 174:287-295), and *B. campestris* (Rose et al., Nucl. Acids Res. (1987) 15:7197), b-cetoacil-ACP sintetasa de cebada (Siggaard-Andersen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:4114-4118), y oleosina de *Zea mays* (Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:6181-6185), soja (Genbank, No. de Acceso: X60773) y *B. napus* (Lee et al., Plant Physiol. (1991) 96:1395-1397). Si la secuencia de los genes correspondientes no se da a conocer o no se identifica su región promotora, un experto en la técnica puede utilizar la secuencia publicada para aislar el gen correspondiente y un fragmento del mismo que contiene el promotor. Las secuencias parciales de proteína para la enoil-ACP reductasa y acetil-CoA carboxilasa relativamente abundantes se han publicado también (Slabas et al., Biochim. Biophys. Acta (1987) 877:271-280; Cottingham et al., Biochim. Biophys. Acta (1988) 954:201-207), y un experto en la técnica puede utilizar estas secuencias para aislar los genes de semilla correspondientes con sus promotores. El alcance del nivel de expresión apropiado de los fragmentos de ácido nucleico de la invención puede requerir el uso de genes quiméricos diferentes que utilicen promotores diferentes. Tales genes quiméricos pueden transferirse a plantas hospedadoras sea juntos en un solo vector de expresión o secuencialmente utilizando más de un vector.

Se considera que la introducción de cebadores o elementos semejantes a cebadores en las regiones promotoras de los fragmentos de ácido nucleico nativos o quiméricos de la invención dará como resultado una expresión incrementada para llevar a cabo la invención. Esto podría incluir cebadores virales tales como el encontrado en el promotor 35S (Odell et al., Plant Mol. Biol. (1988) 10: 263-272), cebadores de los genes de opina (Fromm et al., Plant Cell (1989) 1: 987-984), o cebadores de cualquier otra procedencia que den como resultado una transcripción incrementada cuando se ponen en un promotor enlazado operativamente al fragmento de ácido nucleico de la invención.

De importancia particular es el elemento de secuencia de DNA aislado del gen para la subunidad a de b-conglicina que puede conferir una intensificación específica de la semilla de 40 veces a un promotor constitutivo (Chen et al., Dev. Genet. (1989) 10: 112-122). Un experto en la técnica puede aislar fácilmente este elemento e insertarlo dentro de la región promotora de cualquier gen para obtener expresión intensificada específica de semilla con el promotor en plantas transgénicas. La inserción de un elemento de este tipo en cualquier gen específico de semilla que se exprese en momentos distintos que el gen b de conglicina dará como resultado la expresión en plantas transgénicas para un periodo más largo durante el desarrollo de la semilla.

Cualquier región no codificante 3' capaz de proporcionar una señal de poliadenilación y otras secuencias reguladoras que pueden ser requeridas para la expresión apropiada de los fragmentos de ácido nucleico de la invención puede utilizarse para llevar a la práctica la invención. Esto podría incluir los extremos 3' de desaturasa(s) de ácido nucleico posteriormente nativas, genes virales tales como el del transcrito 35S o 19S del virus del mosaico de la coliflor, de los genes de síntesis de opina, la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, o la proteína de fijación de clorofila a/b. Existen numerosos ejemplos en la técnica que demuestran la utilidad de diferentes regiones 3' no codificantes.

#### Métodos de Transformación

Diversos métodos de transformación de células de plantas superiores para uso en los métodos de la presente invención están disponibles para los expertos en la técnica (véanse las Publicaciones EPO 0 295 959 A2 y 0 318 341 A1). Tales métodos incluyen los basados en vectores de transformación que utilizan los plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium* spp. Se prefiere particularmente utilizar el tipo binario de estos vectores. Los vectores derivados de Ti transforman una gran diversidad de plantas superiores, con inclusión de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Sukhapinda et al., Plant Mol. Biol. (1987) 8:209-216; Potrykus, Mol. Gen. Gene. (1985) 199:183). Otros métodos de transformación están disponibles para los expertos en la técnica, tales como la absorción directa de constructos de DNA extraño (véase Pub. EPO 0 295 959 A2), técnicas de electroporación (Fromm et al., Nature (1986) (Londres) 319:791) o bombardeo balístico a alta velocidad con partículas metálicas recubiertas con los constructos de ácido nucleico (Kline et al., Nature (1987) (Londres) 327:70). Una vez transformadas, las células pueden ser regeneradas por los expertos en la técnica.

De relevancia particular son los métodos recientemente descritos para transformar genes extraños en cosechas comercialmente importantes, tales como colza (De Block et al., Plant Physiol. (1989) 91:694-701), girasol (Everett et al., Bio/Technology (1987) 5:1201), y soja (Christou et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1989) 86:7500-7504).

La presente invención se define adicionalmente en los Ejemplos que siguen, en los cuales todas las partes y porcentajes se expresan en peso y los grados son Celsius, a no ser que se indique otra cosa. Debería entenderse que estos Ejemplos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración.

#### Ejemplos

##### Materiales y métodos

A diversas soluciones utilizadas en las manipulaciones experimentales se hace referencia por sus nombres comunes tales como "SSC", "SSPE", "solución de Denhardt", etc. La composición de estas soluciones, así como cualquier método para la manipulación estándar de ácidos nucleicos, transformaciones y cultivo de *E. coli* puede encontrarse por referencia en Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

##### Medios de Crecimiento

A continuación se dan los medios para el crecimiento de cultivos de embriones de plantas:

##### Medios de Cultivo de Embriones de Plantas

Medios:

Soluciones stock de SB55 y SBP6 (g/L):

MS Sulfato Stock 100X

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	37,0
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,69
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,86
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,0025

## ES 2 533 860 T3

### MS Haluros Stock 100X

CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	44,0
KI	0,083
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,00125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,025

### MS FeEDTA Stock 100X

Na <sub>2</sub> EDTA	3,724
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,784

### Stock de Vitamina B5

- 10 g m-inositol
- 100 mg ácido nicotínico
- 100 mg piridoxina HCl
- 1 g tiamina

### SB55 (por litro)

- 10 mL cada stocks de MS
- 1 mL Stock de Vitamina B5
- 0,8 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- 3,033 g KNO<sub>3</sub>
- 1 mL 2,4-D (stock de 10 mg/mL)
- 60 g sacarosa
- 0,667 g asparagina
- pH 5,7

### Para sustituto de SBP6 0,5 mL 2,4-D

### SB103 (por Litro)

- Sales MS
  - 6% maltosa
- 750 mg MgCl<sub>2</sub>
- 0,2% Gelrita
- pH 5,7

### SB71-1 (por Litro)

- Sales B5
- 1 mL Stock de vitamina B5
- 3% sacarosa
- 750 mg MgCl<sub>2</sub>
- 0,2% Gelrita
- pH 5,7

## ES 2 533 860 T3

El medio para la transformación de células de *Brassica napus* y el crecimiento de *Agrobacterium* descrito en el Ejemplo 4 es como sigue:

### Medio de Crecimiento Bacteriano Mínimo A

Se disuelven en agua destilada:

10,5	gramos de fosfato de potasio, dibásico
4,5	gramos de fosfato de potasio, monobásico
1,0	gramos de sulfato de amonio
0,5	gramos de citrato de sodio, dihidratado

Completar hasta 979 mL con agua destilada

Autoclave

Añadir 20 mL de sacarosa al 10% esterilizada por filtración

Añadir 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M esterilizado por filtración

### 5 Medio BC-28 de Callo de Brassica

Por litro:

Medio Orgánico Mínimo de Murashige y Skoog (sales MS, 100 mg/L i-inositol, 0,4 mg/L tiamina; GIBCO #510-3118)

30 gramos de sacarosa

10 18 gramos de manitol

1,0 mg/L 2,4-D

0,3 mg/L cinetina

0,6% agarosa

pH 5,8

### 15 Medio BS-48 de Regeneración de Brassica

Medio Orgánico Mínimo de Murashige y Skoog con vitaminas B5 de Gamborg (SIGMA #1019)

10 gramos glucosa

250 mg xilosa

600 mg MES

20 0,4% agarosa

pH 5,7.

Se esteriliza por filtración y se añaden, después del tratamiento en autoclave:

2,0 mg/L zeatina

0,1 mg/L IAA

### 25 Medio MSV-1A de Elongación de los Brotes de Brassica

Medio Orgánico Mínimo de Murashige y Skoog de vitaminas B5 de Gamborg

10 gramos sacarosa

0,6% agarosa

pH 5,8.

30

## Ensayo de Tioesterasa:

Para ensayar respecto a la presencia de actividad de tioesterasa se prepararon sustratos de acil-ACP radiomarcados con [ $^{14}\text{C}$ ]. La preparación de los sustratos requería el aislamiento de ACP y ACP-sintetasa de *E. coli* y la reacción enzimática de ácido graso [ $^{14}\text{C}$ ] con la proteína ACP.

5 Purificación de la Proteína Portadora de Acilo (ACP) de *E. coli*

A una pasta congelada de células de *E. coli*, (0,5 kg de cultivo en fase semilogarítmica de *E. coli* B cultivadas en medio mínimo y obtenidas de Grain Processing Corp., Muscatine, IA) se añadieron 50 mL de una solución 1M en Tris, 1M en glicina, y 0,25M en EDTA. Se añadieron 10 mL de  $\text{MgCl}_2$  1M y la suspensión se descongeló en un baño de agua a 50°C. Cuando la suspensión se aproximó a 37°C, se transfirió la misma a un baño a 37°C, se llevó a 10  
10 mM en 2-mercaptoetanol y se añadieron 20 mg de DNAsa y 50 mg de lisozima. La suspensión se agitó durante 2 h, y se cizalló luego por tres ráfagas de 20 segundos en un Mezclador Waring. Se ajustó el volumen a 1 L y la mezcla se centrifugó a 24000 x g durante 30 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 90000 x g durante 2 horas. El pelet de alta velocidad resultante se guardó para extracción de acil-ACP sintasa (véase más adelante) y el sobrenadante se ajustó a pH 6,1 por la adición de ácido acético. El extracto se llevó luego a 50% en 2-propanol por  
15 adición lenta de 2-propanol frío a la solución agitada a 0°C. El precipitado resultante se dejó sedimentar durante 2 horas y se separó luego por centrifugación a 16000 x g. El sobrenadante resultante se ajustó a pH 6,8 con KOH y se aplicó a 2 mL/min a una columna de 4,4 x 12 cm de DEAE-Sephacel que se había equilibrado en MES 10 mM, de pH 6,8. La columna se lavó con MES 10 mM, a pH 6,8 y se eluyó con 1 L de un gradiente de LiCl desde 0 a 1,7 M en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 20 mL y se determinó la localización de la ACP eluida por aplicación  
20 de 10  $\mu\text{L}$  de cada segunda fracción a una pista de una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE) (20% de acrilamida). Las fracciones que se eluían en LiCl aproximadamente 0,7 M contenían ACP prácticamente pura y se combinaron, se dializaron durante una noche contra agua y se liofilizaron finalmente.

## Purificación de Acil-ACP Sintasa

Los pelets de membranas resultantes de la centrifugación a alta velocidad arriba descrita se homogeneizaron en 380  
25 mL de Tris-Cl 50 mM, de pH 8,0, y 0,5 M en NaCl, y se centrifugaron luego a 80000 x g durante 90 min. El sobrenadante resultante se desechó y los pelets se resuspendieron en Tris-Cl 50 mM de pH 8,0, hasta una concentración de proteína de 12 mg/mL. La suspensión de membrana se llevó a 2% en Triton X-100 y 10 mM en  $\text{MgCl}_2$ , y se agitó a 0°C durante 20 min antes de centrifugación a 80000 x g durante 90 min. La proteína en el sobrenadante resultante se diluyó a 5 mg/mL con Triton X-100 al 2% en Tris-Cl 50 mM, de pH 8,0 y, finalmente, se  
30 llevó a ATP 5 mM por adición de ATP sólida (sal disódica) junto con una cantidad equimolar de  $\text{NaHCO}_3$ . La solución se calentó en un baño a 55°C hasta que la temperatura interna alcanzó 53°C y se mantuvo luego entre 53°C y 55°C durante 5 min. Después de 5 min, la solución se enfrió rápidamente en hielo y se centrifugó a 15000 x g durante 15 min. El sobrenadante procedente del paso de tratamiento térmico se cargó directamente en una columna de 7 mL de  
35 Blue Sepharose 4B que se había equilibrado en Tris-Cl 50 mM, de pH 8,0, y Triton X-100 al 2%. La columna se lavó con 5 volúmenes del tampón de carga, seguidos por 5 volúmenes de NaCl 0,6 M en el mismo tampón y la actividad se eluyó con KSCN 0,5 M en el mismo tampón. Las fracciones activas se ensayaron respecto a la síntesis de acil-ACP, como se describe más adelante, se combinaron, y se añadieron a 3 mL de un volumen sedimentado de hidroxilapatito equilibrado en Tris-Cl 50 mM, de pH 8,0 y Triton X-100 al 2%. El hidroxilapatito se recogió por  
40 centrifugación, se lavó dos veces con 20 mL de Tris-Cl 50 mM, de pH 8,0, y Triton X-100 al 2%. La actividad se eluyó con dos lavados de 5 mL de fosfato de potasio 0,5 M, pH 7,5, y Triton X-100 al 2%. El primer lavado contenía 66% de la actividad y se concentró con un concentrador de filtración de membrana de 30 kD (Amicon) hasta 1,5 mL.

## Síntesis de Acil-ACP Radiomarcada

Soluciones A de ácido [ $^{14}\text{C}$ ] palmítico, ácido [ $^{14}\text{C}$ ] esteárico, ácido [ $^{14}\text{C}$ ] oleico, ácido [ $^{14}\text{C}$ ] láurico, y ácido [ $^{14}\text{C}$ ]-  
45 decanoico (120 nanomoles de cada una) preparadas en metanol se secaron en viales de reacción de vidrio. La preparación de ACP arriba descrita (1,15 mL, 32 nanomoles) se añadió junto con 0,1 mL de ATP 0,1 M, 0,05 mL de DTT 80 mM, 0,1 mL de LiCl 8 M, y 0,2 mL de Triton X-100 al 13% en Tris-Cl 0,5 M, de pH 8,0, con  $\text{MgCl}_2$  0,1 M. La reacción se mezcló concienzudamente y se añadieron 0,3 mL de la preparación de acil-ACP sintasa, después de lo cual se incubó la reacción a 37°C. Después de intervalos de media hora se recogió una parte alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y se  
50 secó sobre un pequeño disco de papel de filtro. El disco se lavó concienzudamente con cloroformo:metanol:ácido acético (8:2:1, v:v:v) y la radiactividad retenida en el disco se tomó como una medida de [ $^{14}\text{C}$ ]-acil-ACP. Al cabo de 2 horas, se había consumido aproximadamente el 88% de la ACP. Las mezclas de reacción se diluyeron en ratio 1 a 4 con Tris-Cl 20 mM, de pH 8,0, y se aplicaron a columnas de 1 mL de DEAE-Sephacel equilibradas en el mismo tampón. Las columnas se lavaron sucesivamente con 5 mL de Tris-Cl 20 mM, de pH 8,0, 5 mL de 2-propanol al 80% en Tris-Cl 20 mM, pH 8,0, y se eluyeron con LiCl 0,5 M en Tris-Cl 20 mM, de pH 8,0. Los productos eluidos de las  
55 columnas se pasaron directamente a columnas de ... mL de octil-Sepharose CL 4B que se lavaron con 10 mL de fosfato de potasio 20 mM, de pH 6,8, y se eluyeron luego con 2-propanol al 35% en fosfato de potasio 2 mM, de pH 6,8. Los productos eluidos se liofilizaron y se redisolviaron a una concentración de 24  $\mu\text{M}$ .

## Ejemplo 1

Aislamiento de cDNA's para palmitoil-ACP tioesterasa de semillas de soja y canola

Síntesis por PCR de una sonda de DNA para un cDNA de *Arabidopsis* con homología de secuencia a una acil-ACP tioesterasa grasa de cadena media

5 Una porción de la secuencia de un cDNA de *Arabidopsis* secuenciado en el proyecto de secuenciación del genoma transcrito de *Arabidopsis thaliana* (clon YAP140T7) obtenida de Genbank, entrada Z17678 (la secuenciación sistemática de cDNA de *Arabidopsis thaliana* revela un gen que tiene homología con la C12:0-ACP tioesterasa de *Umbellularia californica* (Grellet et al., Plant Physiol. Biochem. 31, 599, (1993)) y la secuencia adicional de un clon de cDNA de *Arabidopsis thaliana* obtenido utilizando dicha secuencia y comunicado por Dr. John Ohroglge (Universidad del Estado de Michigan) se utilizaron para fabricar dos cebadores PCR mostrados en SEQ ID NO: 3 (el cebador de extensión 5') y SEQ ID NO: 4 (el cebador de extensión 3'). El RNA total se extrajo de silicuas verdes de plantas de *Arabidopsis* y se aisló RNA polisómico siguiendo el procedimiento de Kamalay et al (Cell (1980) 19: 935-946). La fracción de mRNA poliadenilado se obtuvo por cromatografía de afinidad en oligo-dT celulosa (Aviv et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1972) 69: 1408-1411). Se utilizaron trece ng del mRNA poliadenilado como molde para la amplificación a partir de oligo-dT utilizando un kit de RNA-PCR de GeneAmp® (Perkin Elmer Cetus, parte número N808-0017). La PCR se realizó a una temperatura de reasociación de 52°C durante 35 ciclos. Se generó un fragmento de DNA de aproximadamente 560 pares de bases, y se aisló por purificación en gel de agarosa.

El fragmento aislado se utilizó como el molde para marcación de cebador aleatorio con [<sup>32</sup>P]dCTP.

20 Clonación de un cDNA de Semilla de *Brassica napus* Homólogo al Fragmento Semejante a Tioesterasa de *Arabidopsis*

La sonda radiomarcada se utilizó para someter a cribado una biblioteca de cDNA de semilla de *Brassica napus*. Con objeto de construir la biblioteca, se cosecharon las semillas de *Brassica napus* 20-21 días después de la polinización, se pusieron en nitrógeno líquido, y se aisló en RNA polisómico siguiendo el procedimiento de Kamalay et al., (Cell (1980) 19: 935-946). La fracción de mRNA poliadenilado se obtuvo por cromatografía de afinidad en oligo-dT celulosa (Aviv et al., supra). Se utilizaron cuatro microgramos de este mRNA para construir una biblioteca de cDNA de semilla en fago lambda (vector Uni-ZAP\_XR) utilizando el protocolo descrito en el ZAP-cDNA\_Synthesis Kit (Catálogo de Stratagene de 1991, artículo #200400). Se sometieron a cribado aproximadamente 240.000 clones respecto a placas de hibridación positiva utilizando la sonda radiomarcada derivada de PCR descrita anteriormente, esencialmente como se describe en Sambrook et al., supra, excepto que se utilizaron condiciones de hibridación a severidad baja (Tris 50 mM, pH 7,6, 6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% SDS, 100 pg de DNA de timo de ternero desnaturalizado y 50°C) y se realizaron dos veces lavados post-hibridación con 2X SSC, 0,5% SDS a la temperatura ambiente durante 15 min, y luego dos veces con 0,2X SSC, 0,5% SDS a la temperatura ambiente durante 15 min, y finalmente dos veces con 0,2X SSC, 0,5% SDS a 50°C durante 15 min. Se seleccionaron nueve calvas positivas que exhibían hibridación fuerte, se extendieron en placas y se repitió el procedimiento de cribado. A partir del cribado secundario se aislaron 4 calvas de fago puras. Se obtuvieron clones de plásmido que contenían las inserciones de cDNA mediante el uso de un fago adyuvante de acuerdo con el protocolo de escisión in vivo proporcionado por Stratagene. Se preparó DNA bicatenario utilizando el equipo Magic® Miniprep (Promega) y las instrucciones de los fabricantes, y los plásmidos resultantes se analizaron en cuanto a tamaño por electroforesis en geles de agarosa. Uno de los cuatro clones, designado p5a, contenía una inserción de aproximadamente 1,5 kb que se secuenció a partir de ambas cadenas por el método di-desoxi. La secuencia de 1483 bases de la inserción de cDNA de p5a se muestra en SEQ ID NO: 2. Un segundo clon, designado p2a, se secuenció también y se encontró que contenía un cDNA de 1673 pares de bases mostrado en SEQ ID NO: 31. Las secuencias de las dos inserciones de cDNA tienen una identidad global de 85%, y codifican péptidos que son idénticos en un 92% global pero que tienen una identidad de 94% dentro la región del péptido maduro supuesto (el péptido después de la separación de la secuencia de tránsito a plastos). Las regiones de cDNA de los dos cDNAs que codifican los péptidos maduros tienen una identidad de 90,4%. Los dos cDNA codifican probablemente dos isozimas de la misma actividad. Basándose en la longitud de los péptidos de tránsito para las dos secuencias, la longitud de los cDNAs respectivos y las alineaciones a las secuencias de soja mostradas más adelante, parece ser que el cDNA en el clon p5a es una versión ligeramente truncada del mensaje actual, mientras que el clon p2a representa un mensaje de longitud total. El cDNA aislado del clon p2a ha sido secuenciado y la secuencia se da en SEQ ID NO: 31.

Clonación de un cDNA de Semilla de Soja Homólogo al Fragmento Semejante a Tioesterasa de *Arabidopsis*

Se construyó una biblioteca de cDNA como sigue: Se separaron embriones de soja (aprox. 50 mg de peso fresco cada uno) de las vainas y se congelaron en nitrógeno líquido. Los embriones congelados se trituraron a un polvo fino en presencia de nitrógeno líquido y se extrajeron luego por homogeneización en Polytron y se fraccionaron para enriquecimiento en RNA total por el método de Chirgwin et al. (Biochemistry (1979) 18: 5294-5299). La fracción de ácido nucleico se enriqueció en RNA poliA+ por paso de RNA total a través de una columna de oligo-dT celulosa y elución del RNA poliA+ con sal como ha sido descrito por Goodman et al. (Meth. Enzymol. (1979) 68:75-90). Se sintetizó el cDNA a partir del RNA poliA+ purificado utilizando el Sistema de Síntesis de cDNA (Bethesda Research Laboratory) y las instrucciones del fabricante. El DNA bicatenario resultante se metiló con DNA-metilasa EcoRI

(Promega) antes de rellenar sus extremos con DNA-polimerasa T4 (Bethesda Research Laboratory) y ligación de los extremos romos a enlazadores EcoRI fosforilados utilizando DNA-ligasa T4 (Pharmacia, Upsala, Suecia). El DNA bicatenario se digirió con la enzima EcoRI, se separó del exceso de enlazadores por paso a través de una columna de filtración en gel (Sephacrose CL-4B), y se ligó al vector lambda ZAP (Stratagene, 1109N, Torrey Pine Rd. La Jolla CA.) conforme a las instrucciones del fabricante. El DNA ligado se empaquetó en fago utilizando el extracto de empaquetamiento Gigapack (Stratagene) conforme las instrucciones del fabricante. La biblioteca de cDNA resultante se amplificó de acuerdo con las instrucciones de Stratagene y se guardó a -80°C.

Siguiendo las instrucciones en el Manual del Kit de Clonación Lambda ZAP (Stratagene), se utilizó la biblioteca de fago de cDNA para infectar células BB4 de *E. coli* y un total de aproximadamente 360.000 unidades formadoras de calvas se extendieron en 6 placas Petri de 150 mm de diámetro. Se realizaron levantamientos duplicados de las placas en filtros de nitrocelulosa (Schleicher @ Schuell). Los filtros se prehibridaron en 25 mL de tampón de hibridación consistente en 6X SSPE, 5X solución de Denhardt, 0,5% SDS, 5% de sulfato de dextrano y 0,1 mg/mL de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (Sigma Chemical Co.) a 50°C durante 2 horas. Se añadió la sonda radiomarcada basada en el producto PCR de *Arabidopsis* arriba descrito, y se dejó hibridar durante 18 h a 50°C. Los filtros se lavaron exactamente como se ha descrito arriba. La autorradiografía de los filtros indicó que había 9 calvas que se hibridaban fuertemente. Las 9 calvas se sometieron a una segunda tanda de cribado como anteriormente.

A partir del segundo cribado, se aislaron 3 calvas de fago puras. Clones de plásmido que contenían las inserciones de cDNA se obtuvieron mediante el uso de un fago adyuvante conforme al protocolo de escisión in vivo proporcionado por Stratagene. Se preparó DNA bicatenario utilizando el Miniprep Magic® (Promega) y las instrucciones de los fabricantes, y los plásmidos resultantes se analizaron respecto a tamaño por electroforesis en geles de agarosa. Uno de los cuatro clones, designado p233b, contenía una inserción de aproximadamente 1,2 kb, una de cuyas cadenas se secuenció parcialmente por el método didesoxi. Las 311 bases de p233b que se secuenciaron exhibían una identidad de secuencia de 81,2% en comparación con la secuencia semejante a tioesterasa de *Arabidopsis* que era la base para la sonda PCR. Los otros dos clones aislados del cribado inicial parecían ser concatémoros de cDNA en los cuales las inserciones primarias tenían un tamaño similar a p233a. La comparación de la secuencia en el extremo 5' de p233a con la secuencia de canola y con la secuencia de *Arabidopsis* indicaba que p233a es una versión truncada en 5' de la tioesterasa supuesta. La iniciación de cDNA de p233b se separó por digestión con EcoRI y la inserción se purificó por electroforesis en gel de agarosa. La inserción purificada se utilizó como molde para marcación del cebador aleatorio como se ha descrito arriba. Aproximadamente 150.000 unidades formadoras de calvas de la biblioteca de cDNA de semilla de soja se extendieron en 3 placas como se ha descrito arriba y los levantamientos en nitrocelulosa duplicados se cribaron a severidad alta (hibridación a 60°C en 6 x SSC, 0,1% SDS durante 18 horas, lavado a 60°C en 0,2 x SSC, 0,1% SDS dos veces durante 10 minutos cada vez). De 18 calvas positivas obtenidas, se seleccionó una, designada pTE11, que contenía una inserción de 1,5 kB para secuenciación por el método di-desoxi. La secuencia de las 1688 bases en la inserción de cDNA de soja de pTE11 se muestra en SEQ ID NO: 1.

## Ejemplo 2

Expresión de la proteína catalíticamente activa codificada por los CDNA'S de soja y canola homólogos a la tioesterasa supuesta de *arabidopsis* en *E. Coli*

Vectores plasmídicos para la expresión de las porciones de los cDNA's de tioesterasa supuesta de soja y canola que se suponía codificaban la pro-proteína se prepararon utilizando el vector pET-3d (descrito por F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn y J. W. Dubendorff, *Methods in Enzymology* Vol. 185) y la cepa de células hospedadora BL21 (DE3) (pLysE).

El clon p5a de canola se digirió con PvuII y HindIII para liberar un fragmento de 1235 pares de bases que se hizo romo con DNA-polimerasa I antes de aislamiento por electroforesis en gel de agarosa. Se sintetizaron dos oligonucleótidos que, una vez unidos por reasociación, forman la secuencia enlazadora siguiente:

5'-GATGGAGGAGCAG (SEQ ID NO:3)

3'-CTCCTCGTC (SEQ ID NO:4)

Los enlazadores se ligaron al fragmento de 1235 pares de bases que se ligó luego al pET-3d digerido con NcoI y tratado con fosfatasa intestinal de ternero. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes BL21(DE3)(pLysE) y se utilizaron 20 clones resistentes a ampicilina para inocular cultivos líquidos de 5 mL. Se preparó DNA plasmídico a partir de los cultivos y se digirió con PvuII, NcoI y EcoRI para determinar la presencia de una inserción y su orientación con respecto al promotor T7. Se obtuvo solamente un plásmido que contenía la inserción, y se invirtió la orientación de la región codificante con respecto al promotor. El DNA plasmídico se digirió con NcoI, se aisló la inserción y se religó a pET-3d tratado con fosfatasa y digerido con NcoI como anteriormente. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células XL-1 competentes. Se utilizaron 10 colonias aisladas para inocular cultivos líquidos de 5 mL y se aisló el DNA plasmídico. Se determinó que tres clones se encontraban en la dirección de avance por su patrón de fragmentos de restricción con EcoRI. La región a través del sitio de clonación se secuenció y se encontró que situaba la metionina inicial codificada por la secuencia de DNA enlazadora en marco

con la proteína codificada por el cDNA de canola para dar la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en SEQ ID NO: 6.

5 El cDNA de soja que contenía el plásmido pTE11 se digirió con SphI y EcoRI, que se hizo como con DNA-polimerasa I y el fragmento de 1208 pares de bases resultante se aisló por electroforesis en gel de agarosa. Los enlaces arriba descritos se ligaron al fragmento y el producto se ligó al vector pET-3b como se ha descrito para el fragmento de cDNA de canola anterior. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células XL-1 competentes y 10 de las colonias obtenidas se utilizaron para inocular cultivos líquidos de 5 mL. El DNA plasmídico aislado de los cultivos se digirió con NcoI a fin de determinar la presencia de una inserción de cDNA y con HpaI y SphI para determinar la orientación de la inserción con relación al promotor T7. Se obtuvo un clon con una inserción orientada correctamente, y se utilizó para transformar células competentes BL21(DE3) (pLysE). La secuencia de aminoácidos deducida de la proteína expresada se muestra en SEQ ID NO: 7.

15 Colonias simples de las cepas BL21(DE3) (pLysE) que contenían el vector de expresión pET:canola y los vectores de expresión de cDNA de soja se utilizaron para inocular 5 mL de medio 2xYT que contenía 50 mg/L de ampicilina. Los cultivos se dejaron crecer durante una noche a 37°C, se diluyeron a 0,1 DO a 600 nm con medio fresco que contenía ampicilina, y se dejaron crecer nuevamente hasta 1,5 DO a 600 nm a 37°C. Ambos cultivos se indujeron por la adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Las células se cosecharon por centrifugación 3 horas después de la introducción. Se añadió un volumen de tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 15 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM y 15% de glicerol) aproximadamente igual al volumen del pellet, y las células se resuspendieron por mezclado vorticial. Se añadió una pequeña cantidad de perlas de vidrio de 2 mm y PMSF 0,2 M en 2-propanol hasta una concentración final de 0,2 mM inmediatamente antes de sonicación. El lisado de células se centrifugó en una microcentrífuga para su aclaramiento y el sobrenadante de la línea de células que expresaba cDNA de canola se diluyó en ratio 1 a 20 con Tricine 50 mM (pH 8,2, 1 mg/mL de BSA y DTT 1 mM) para dar una concentración de proteína en el lisado de 1,8 mg/mL. La línea de células que expresaba el cDNA de soja se diluyó análogamente en ratio 1 a 5 para dar una concentración de proteína en el lisado de 2,4 mg/mL.

#### 25 Ensayo de Acil-ACP Tioesterasa

Los reactivos y sustratos para el ensayo de tioesterasa se prepararon como se ha descrito arriba en la sección de MATERIALES Y MÉTODOS. La Acil-ACP tioesterasa se ensayó como ha sido descrito por Mckeon y Stumpf [J. Biol. Chem. (1982) 257: 12141-12147]. Todas las acil-ACP's radiomarcadas se ajustaron a concentraciones que oscilaban desde 0,18  $\mu$ M a 2,06  $\mu$ M y un volumen de 40  $\mu$ L con un tampón de reacción constituido por 1 mg/mL de seroalbúmina bovina en tampón CAPS-NaOH (50 mM) a pH 1,5. Las reacciones se iniciaron con lisado de *E. coli* que expresaba los cDNAs de planta para la acil-ACP tioesterasa supuesta de semilla de soja o semilla de canola y se incubaron durante tiempos que variaban desde 12 segundos a 1 minuto dependiendo de la actividad de la fracción. Las reacciones se terminaron por la adición de 100  $\mu$ L de una solución de ácido acético al 5% en 2-propanol y se extrajeron dos veces con 1 mL cada vez de hexano saturado con agua. Se añadieron 5 mL de fluido de centelleo ScintiVerse Bio HP (Fisher) a os extractos combinados y se determinó la radiactividad en los ácidos grasos liberados por recuento de centelleo.

40 Los ensayos de tioesterasa realizados sobre extractos en *E. coli* de cultivos que no se transformaron con plásmidos que expresaban tioesterasa tenían actividades específicas de aproximadamente 0,025 nanomoles/min/mg de proteína en los ensayos de palmitoil-ACP, estearoil-ACP y oleoil-ACP cuando el ensayo se realizó a concentración 1  $\mu$ M de sustrato. Dado que este ruido de fondo de *E. coli* era de 70 a 150 veces menor que la actividad encontrada en las líneas que expresaban tioesterasa de plantas, se desprecia en los datos siguientes.

45 Se realizaron ensayos a cuatro concentraciones de sustrato para la enzima de soja y a una concentración que daba actividad máxima para la enzima de canola. Los ensayos se realizaron de tal modo que se consumió menos del 25% del sustrato disponible para cada concentración de sustrato, y la concentración de sustrato indicada en la Tabla 2 es la concentración media durante el tiempo de la reacción.

Tabla 2

Actividad de las Tioesterasas de Soja y Canola Contra Palmitoil-ACP, Estearoil-ACP y Oleoil-ACP Tioesterasa		
	SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (nmoles/min/mg proteína)
<u>Palmitoil-ACP</u>		
	0,18 $\mu$ M	1,17
	0,37 $\mu$ M	1,87
	0,74 $\mu$ M	3,43
	1,01 $\mu$ M	3,61



Actividad de las Tioesterasas de Soja y Canola Contra Palmitoil-ACP, Estearoil-ACP y Oleoil-ACP Tioesterasa		
	SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (nmoles/min/mg proteína)
<u>Estearoil-ACP</u>		
	0,18 $\mu$ M	0,67
	0,41 $\mu$ M	1,08
	0,81 $\mu$ M	1,80
	1,62 $\mu$ M	1,76
<u>Oleoil-ACP</u>		
	0,18 $\mu$ M	0,21
	0,41 $\mu$ M	0,77
	1,03 $\mu$ M	0,86
	2,06 $\mu$ M	0,98
<u>Palmitoil-ACP*</u>		
	0,58 $\mu$ M	17,6
<u>Dodecanoil-ACP*</u>		
	0,54 $\mu$ M	0,11
<u>Lauroil-ACP*</u>		
	0,54 $\mu$ M	0,07
Canola Tioesterasa		
<u>Palmitoil-ACP</u>		
	1,01 $\mu$ M	3,33
<u>Estearil-ACP</u>		
	0,81 $\mu$ M	1,27
<u>Oleoil-ACP</u>		
	1,03 $\mu$ M	1,76
*Datos de un experimento separado en el que la pET:palmitoil-tioesterasa de soja se expresaba a un nivel mayor en células BL21(DE3).		

Los datos de la Tabla 2 muestran que ambas enzimas de canola y soja son acil-ACP tioesterasas. Si bien ninguna de las enzimas tiene actividad significativa frente a lauroil-ACP o decanoil-ACP que es el sustrato para la enzima a la que las mismas eran homólogas según su identificación inicial (la secuenciación sistemática de cDNA de *Arabidopsis thaliana* revela un gen que guarda homología con la C12:0-ACP tioesterasa de *Umbellularia californica*. Francoise Grellet, Richard Cooke, Monique Raynal, Michele Laudie y Michel Delseny, Plant Physiol. Biochem. 1993 31:599-602), ambas son activas contra ACP's de cadena acilo más larga. Ambas tienen una preferencia comprendida entre dos y tres veces mayor para palmitoil-ACP con respecto a estearoil-ACP u oleoil-ACP. Esto está en contraste con las acil-ACP tioesterasas conocidas de estas especies que exhiben una preferencia acusada de sustrato para oleoil-ACP [WO 9.211.373]. Las enzimas representan por tanto una segunda clase de acil-ACP tioesterasa, presente en los mismos tejidos que la oleoil-ACP tioesterasa que tienen preferencia de sustrato para acil-ACP's saturadas de cadena larga.

### Ejemplo 3

Regulación de la expresión de Palmitoil-ACP tioesterasa en la soja

Construcción de Vectores para Transformación de *Glycine max* para Expresión Reducida de Palmitoil-ACP Tioesterasa en Semillas de Soja en Desarrollo

Se construyeron plásmidos que contenían la secuencia de cDNA antisentido de palmitoil-ACP tioesterasa de *G. Max* bajo control del promotor beta-conglicina de soja (Beachy et al. EMBO J. (1985) 4:3047-3053). La construcción de los vectores que expresaban el cDNA antisentido de Delta-12 desaturasa de soja bajo el control de estos promotores se facilitó por el uso de plásmidos pCW109 y pML18, los dos cuales se describen en [WO 9.411.516].

- 5 Se introdujo un sitio singular NotI en la región de clonación entre el promotor beta-conglicina y el extremo 3' de faseolina en pCW109 por digestión con NcoI y XbaI seguido por eliminación de los extremos de DNA monocatenario con exonucleasa de haba mung. Se ligaron enlazadores NotI (New England Biochemical, número de catálogo NEP1125) al plásmido linealizado para producir el plásmido pAW35. El sitio NotI simple en pML18 se destruyó por  
10 digestión con NotI, rellenado de los extremos monocatenarios con dNTP's y fragmento Klenow seguido por religación del plásmido linealizado. El pML18 modificado se digirió luego con HindIII y se trató con fosfatasa intestinal de ternero.

- La casete de expresión beta-conglicina:NotI:faseolina en pAW35 se separó por digestión con HindIII y el fragmento de 1,7 kB se aisló por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento aislado se ligó a la construcción de pML18 modificada y linealizada arriba descrita. Un clon con la orientación deseada se identificó por digestión con NotI y XbaI para liberar un fragmento de 1,08 kB, lo que indicaba que la orientación de la unidad de transcripción beta-conglicina era la misma que la unidad de transcripción del marcador seleccionable. El plásmido resultante recibió el nombre pBS19.

- Se sintetizaron los cebadores de amplificación PCR SOYTE3 (5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCTGACACAATAGCCCTTCT-3') (SEQ ID NO:5) correspondiente a las bases 1 a 16 de SEQ ID NO: 1 con bases adicionales para proporcionar un sitio de restricción NotI y bases adicionales suficientes para permitir la digestión con NotI, y SOYTE4 (5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCGATTACTGCTGCTTTTC-3') (SEQ ID NO: 12) correspondiente al complemento inverso de las bases 1640 a 1657 de SEQ ID NO: 1 con bases adicionales para proporcionar un sitio de restricción NotI y bases adicionales suficientes para permitir la digestión con NotI. Utilizando estos cebadores, pTE11 como molde y procedimientos de amplificación PCR estándar (Perkin Elmer Cetus, kit PCR GeneAmp), se amplificó un fragmento de 1,6 kB de p233b y se aisló por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento se digirió durante una noche a 37°C con NotI, se extrajo con fenol/cloroformo seguido por extracción con cloroformo y precipitación con etanol. El plásmido pBS19 se digirió con NotI, se trató con fosfatasa intestinal de ternero y el plásmido linealizado se purificó por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento de pTE11 digerido con NotI y amplificado por PCR arriba descrito se ligó al pBS19 linealizado y la mezcla de ligación se utilizó para transformar células XI-1 competentes. Un clon en el que el cDNA de palmitoil-ACP de soja estaba orientado en la dirección antisentido con respecto al promotor beta-conglicina se identificó por digestión con HindIII. La orientación antisentido libera fragmentos de 1,6 y 1,9 kB, mientras que la orientación de sentido libera fragmentos de 1,15 y 2,3 kB. El plásmido antisentido de palmitoil-ACP tioesterasa de soja se designó pTC3 y el plásmido con orientación de sentido se designó pTC4.

### 35 Transformación de Cultivos de Embriones Somáticos de Soja

Se mantuvieron cultivos de suspensión embriogénicos de soja en 35 mL de medio líquido (SB55 o SBP6, MATERIALES Y MÉTODOS) en una máquina de sacudidas rotativa, a 150 rpm, y a 28°C con luces mixtas fluorescentes e incandescentes en un protocolo día/noche de 16:8 h. Los cultivos se subcultivaron cada 4 semanas por inoculación de aproximadamente 35 mg de tejido en 35 mL de medio líquido.

- 40 Se transformaron cultivos de suspensión embriogénicos de soja con pTC3 por el método de bombardeo de partículas con cañón electrónico (véase Kline et al. (1987) Nature (Londres) 327:70). Para estas transformaciones se utilizó un instrumento DuPont Biolistic PDS1000/HE (retroadaptación con helio).

- A 50 mL de una suspensión de partículas de oro de 1 mm de 60 mg/mL se añadieron (en este orden): 5 µL de DNA (1 µg/µL), 20 µL de espermidina (0,1 M), y 50 µL de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M). La preparación de partículas se agitó durante 3  
45 min, se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 s y se eliminó el sobrenadante. Las partículas recubiertas de DNA se lavaron una sola vez en 400 µL de etanol al 70% y se suspendieron en 40 µL de etanol anhidro. La suspensión de DNA/partículas se trató por ultrasonidos 3 veces durante 1 s cada vez. Se cargaron luego 5 µL de las partículas de oro recubiertas con DNA en cada macrodisco portador.

- Aproximadamente 300-400 mg de un cultivo de suspensión de 4 semanas de antigüedad se pusieron en una cápsula Petri vacía de 60 x 15 mm, y el líquido residual se retiró del tejido con una pipeta. Para cada experimento de transformación, se bombardearon normalmente del orden de 5-10 placas de tejido. La presión de rotura de la membrana se ajustó a 1000 psi (6.895 kPa) y la cámara se evacuó a un vacío de 28 pulgadas (70 cm) de mercurio. El tejido se situó aproximadamente a 3,5 pulgadas de distancia (8,75 cm) del tamiz de retención y se bombardeó 3 veces. Después del bombardeo, el tejido se puso nuevamente en líquido y se cultivó como se ha descrito arriba.

- 55 Once días después del bombardeo, se cambió el medio líquido con SB55 fresco que contenía 50 mg/mL de higromicina. El medio selectivo se renovó semanalmente. Siete semanas después del bombardeo, se observó el crecimiento de tejido fresco transformado a partir de agrupaciones embriogénicas necróticas no transformadas. El tejido fresco aislado se separó y se inoculó en matraces individuales para generar nuevos cultivos de suspensión

embriogénicos transformados y propagados clonalmente. Así, se trató cada línea nueva como evento de transformación independiente. Estas suspensiones pueden mantenerse luego como suspensiones de embriones agrupados en una etapa de desarrollo inmadura por subcultivo o regenerados en plantas enteras por maduración y germinación de embriones somáticos individuales.

- 5 Las agrupaciones embriogénicas transformadas se separaron del cultivo líquido y se pusieron en un medio agar sólido (SB103, MATERIALES Y MÉTODOS) que no contenía hormona ni antibiótico alguno. Los embriones se cultivaron durante cuatro semanas a 26°C con luces mixtas fluorescentes e incandescentes en un protocolo día/noche de 16:8 horas antes del análisis.

10 Análisis de Embriones Transgénicos de *Glycine max* que Contienen un Constructo Antisentido de Palmitoil-ACP Tioesterasa

15 El vector pTC3 que contenía el cDNA de palmitoil-ACP tioesterasa de soja, en la orientación antisentido, bajo el control del promotor de beta-conglicinina de soja como se ha descrito arriba dio lugar a 7 líneas de embriones maduros. Un cultivo de la línea de embriones utilizada para transformación se realizó por cultivo hasta embriones maduros sin transformación o selección a fin de servir como una línea de control de perfil de ácidos grasos. El análisis de ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases de los acilmetil-ésteres grasos, esencialmente como ha sido descrito por Browse et al., (Anal. Biochem. (1986) 52:141-145) excepto que se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2,5% en metanol como el reactivo de metilación y las muestras se calentaron durante 1,5 h a 80°C para efectuar la metanólisis de los lípidos del embrión utilizando embriones maduros simples como la fuente de tejido. Se analizaron 9 a 10 embriones de cada línea transformada y 5 embriones del control sin transformar, y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Ácidos grasos en los embriones de soja de control y en embriones de soja transformados con un vector que expresa la palmitoil-ACP tioesterasa de soja en la orientación antisentido

LÍNEA DE EMBRIÓN	EMBRIÓN NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
2872 control	1	12,7	4,6	20,8	53,1	7,9
2872 control	2	13,8	3,1	12,0	58,0	12,0
2872 control	3	15,9	3,9	11,2	53,9	13,9
2872 control	4	14,5	2,9	13,9	57,7	9,2
2872 control	5	15,8	4,4	13,4	51,8	12,4
353/3/1	1	6,4	2,1	11,3	63,1	17,0
353/3/1	2	13,3	3,0	14,5	53,9	14,8
353/3/1	3	6,9	2,0	11,2	62,9	16,9
353/3/1	4	12,1	2,8	9,6	55,8	19,6
353/3/1	5	5,8	1,9	12,3	64,1	15,4
353/3/1	6	10,1	2,3	11,8	57,3	17,7
353/3/1	7	3,9	2,0	17,9	64,1	12,0
353/3/1	8	8,2	2,4	11,0	61,1	16,4
353/3/1	9	8,0	2,4	10,5	59,9	18,3
353/3/1	10	5,1	1,9	13,2	66,8	12,8
353/3/2	1	6,3	2,0	12,0	62,2	17,4

ES 2 533 860 T3

LÍNEA DE EMBRIÓN	EMBRIÓN NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
353/3/2	2	9,0	2,5	11,1	60,5	16,8
353/3/2	3	8,3	2,1	11,0	60,3	16,4
353/3/2	4	15,1	2,9	10,1	51,8	19,4
353/3/2	5	6,4	2,1	15,5	60,3	15,5
353/3/2	6	16,1	2,9	11,1	53,5	15,9
353/3/2	7	7,6	2,0	10,3	64,5	15,0
353/3/2	8	5,5	2,1	12,1	64,6	15,7
353/3/2	9	15,9	3,0	9,5	51,8	19,1
353/3/2	10	5,8	2,0	12,8	63,7	14,9
353/3/3	1	7,6	2,5	10,9	61,2	15,9
353/3/3	2	5,4	4,1	20,4	40,2	7,9
353/3/3	3	5,2	1,9	12,6	67,2	12,4
353/3/3	4	4,5	2,0	28,8	54,7	9,1
353/3/3	5	6,7	1,8	11,7	62,1	16,1
353/3/3	6	6,0	1,5	10,3	63,2	17,3
353/3/3	7	6,6	2,5	9,4	65,4	15,0
353/3/3	8	13,2	2,9	21,6	49,9	11,6
353/3/3	9	13,4	3,2	16,4	52,5	12,7
357/1/1	1	8,3	2,1	12,3	63,7	12,8
357/1/1	2	11,1	2,8	11,1	59,3	14,2
357/1/1	3	7,5	2,1	14,1	63,1	12,2
357/1/1	4	7,7	2,4	13,8	62,7	12,4
357/1/1	5	14,2	3,0	10,5	58,2	12,7
357/1/1	6	11,8	2,5	11,3	60,7	12,7
357/1/1	7	13,8	3,2	10,1	56,1	14,8
357/1/1	8	6,3	1,6	12,8	65,8	12,4
357/1/1	9	10,5	2,8	11,2	57,5	16,7
357/1/1	10	7,2	1,9	13,8	62,1	14,1
357/1/2	1	3,4	1,6	18,6	64,6	11,8
357/1/2	2	3,7	1,5	19,0	65,1	11,6

ES 2 533 860 T3

LÍNEA DE EMBRIÓN	EMBRIÓN NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
357/1/2	3	5,2	1,4	21,6	56,4	15,5
357/1/2	4	3,9	1,5	12,7	69,5	12,4
357/1/2	5	4,9	1,6	12,2	68,3	12,9
357/1/2	6	4,3	2,0	14,3	66,2	13,0
357/1/2	7	10,5	2,5	12,9	57,7	16,2
357/1/2	8	6,4	1,8	24,7	53,4	13,7
357/1/2	9	11,8	2,3	9,0	57,1	19,4
357/1/2	10	3,1	1,4	14,8	62,3	12,1
357/1/3	1	11,5	2,3	9,7	61,5	14,8
357/1/3	2	9,9	2,3	9,5	64,2	14,0
357/1/3	3	12,7	2,9	13,5	57,3	13,5
357/1/3	4	13,9	3,0	14,3	50,1	18,7
357/1/3	5	14,7	3,0	13,0	53,0	16,3
357/1/3	6	11,8	2,4	9,9	58,3	17,7
357/1/3	7	11,3	2,3	10,1	60,8	15,1
357/1/3	8	11,7	2,4	9,9	61,3	14,2
357/1/3	9	14,4	2,5	5,5	63,3	14,3
357/1/3	10	9,6	2,2	18,7	57,0	12,4
357/5/1	1	4,0	1,3	17,7	63,1	13,3
357/5/1	2	3,8	1,3	16,9	65,0	12,4
357/5/1	3	2,9	1,8	17,6	65,4	11,6
357/5/1	4	4,1	1,4	13,6	66,0	14,0
357/5/1	5	2,8	1,8	17,0	67,3	10,9
357/5/1	6	6,3	1,9	14,3	61,2	15,5
357/5/1	7	3,4	1,0	14,9	68,9	11,1
357/5/1	8	4,5	1,5	17,0	62,4	14,0
357/5/1	9	2,9	0,9	14,5	70,5	10,6
357/5/1	10	3,1	1,1	14,9	69,1	11,0

El contenido medio de palmitato de 6 de las 7 líneas transformadas es significativamente menor que el de la línea de embriones de control. En cada una de estas 6 líneas, el contenido medio de estearato es también menor que el valor medio de control. Este resultado es esperado si la palmitoil-ACP tioesterasa de soja es responsable de la liberación de la totalidad o parte del palmitato que se incorpora en triacilglicérido y si la construcción antisentido ha reducido la cantidad de palmitoil-ACP tioesterasa producida. Dado que el contenido de estearato de las líneas se reduce en lugar de aumentarse en correspondencia con la disminución de palmitato, puede deducirse lo siguiente: la capacidad

para alargar la palmitoil-ACP a estearoil-ACP tiene que ser suficiente para convertir el flujo aumentado en estearato, y la capacidad para desaturar la estearoil-ACP a oleoil-ACP tiene que ser también suficiente para convertir el flujo aumentado a oleato. Estos dos eventos conducen a una disminución significativa en los ácidos grasos saturados totales producidos en los embriones transformados. Puede deducirse también que la capacidad de desaturación del oleato está presente en exceso del sustrato suministrado al mismo, dado que la mayor parte del carbono que no se eliminó de la pista sintética de ACP se encuentra en la fracción de linoleato.

Esto se aprecia muy claramente en una comparación de las líneas 357/1/3 y 357/5/1. La línea 357/1/3 estaba transformada pero exhibe poca o ninguna alteración en el fenotipo de ácidos grasos, mientras que la línea 357/5/1 es muy uniforme entre todos los embriones testados en la producción de un fenotipo de ácidos grasos alterado. El contenido medio de ácido palmítico del lípido en la línea 357/5/1 es 3,2 veces menor que el de la línea 357/1/3, y el contenido medio de ácido esteárico de 357/1/3 es 1,8 veces menor que el de la línea 357/5/1. La disminución combinada de ácidos grasos saturados es 12,2% de los ácidos grasos totales, y de dicho 12,2%, aproximadamente la totalidad (11,7%) puede explicarse como oleato y linoleato aumentados.

Así pues, el efecto combinado es una línea de embriones de soja con 65% menos de ácidos grasos saturados y con ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados incrementados.

A partir de estos datos se llega a la conclusión de que la reducción de la cantidad de palmitoil-ACP tioesterasa expresada en las semillas de soja en desarrollo conducirá a la producción de aceite de soja con contenido reducido en ácidos grasos saturados. La variación en la cantidad de efecto antisentido observado entre los embriones pero dentro de una línea transformada observada en la Tabla 3 es una característica de este sistema de transformación que se explica con mayor detalle más adelante. La relación entre los datos tomados de los embriones inmaduros y las semillas de los embriones cigóticos producidos en plantas regeneradas a partir de estos embriones somáticos se expone más adelante.

El Fenotipo de Ácidos Grasos Resultante de la Inhibición o Cosupresión Antisentido de la Expresión Génica en los Embriones Somáticos de Soja es Predictivo del Fenotipo de Ácidos Grasos de Semillas de Plantas Regeneradas a Partir de Dichos Embriones

Los embriones de soja somáticos maduros son un buen modelo para embriones cigóticos. Si bien en el estado de embrión globular en cultivo líquido, los embriones somáticos de soja contienen cantidades muy bajas de triacilglicerol o proteínas de reserva, típicas de los embriones cigóticos de soja en maduración. En esta etapa de desarrollo, la ratio de triacilglicérido total a lípido polar total (fosfolípidos y glicolípidos) es aproximadamente 1:4, como es típico de los embriones cigóticos de soja en la etapa de desarrollo a partir de la cual se inició el cultivo de embriones somáticos. Asimismo, en la etapa globular, los mRNAs para las proteínas de semilla prominentes, la subunidad alfa de beta-conglicina, el inhibidor 3 de tripsina de Kunitz, y la lectina de semilla están esencialmente ausentes. Después de transferencia a medio exento de hormonas para permitir la diferenciación al estado de embrión somático en maduración, triacilglicerol se convierte en la clase de lípido más abundante. Asimismo, los mRNAs para la subunidad alfa de beta-conglicina, el inhibidor 3 de tripsina de Kunitz y la lectina de semilla se convierten en mensajes muy abundantes en la población total de mRNA. Sobre esta base, el sistema de embriones somáticos de soja se comporta muy análogamente a los embriones de soja cigóticos en maduración in vivo, y es por tanto un sistema modelo satisfactorio y rápido para analizar los efectos fenotípicos de la modificación de la expresión de genes en el camino de biosíntesis de los ácidos grasos.

Es muy importante, que el sistema modelo es predictivo también de la composición de ácidos grasos de semillas de plantas derivadas de embriones transgénicos. Esto se ilustra con dos constructos antisentido diferentes en dos tipos diferentes de experimento y en un experimento de cosupresión similar:

Embriones globulares de cultivo líquidos transformados con un gen quimérico constituido por desaturasa Delta-15 microsómica de soja (experimento 1, WO 9.311.245) o desaturasa Delta-12 microsómica de soja (experimento 2) en orientación antisentido bajo el control de un promotor específico de semilla (promotor beta-conglicina) dieron lugar a embriones maduros. Se determinó el contenido de ácidos grasos de los embriones somáticos maduros de las líneas transformadas con vector únicamente (control) y el vector que contenía los genes quiméricos antisentido así como de semillas de plantas regeneradas a partir de ellos. En el experimento 1, se analizó un conjunto de embriones de cada línea respecto a contenido de ácidos grasos y otro conjunto de embriones de la misma línea se regeneró en plantas. En el experimento 2, se utilizaron líneas diferentes, que contenían el mismo constructo antisentido para análisis de ácidos grasos en embriones somáticos y para regeneración en plantas. En el experimento 1, en todos los casos en los que se observó un contenido reducido de 18:3 en una línea de embriones transgénicos, comparada con el control, se observó también un contenido reducido de 18:3 en las semillas que se segregaban de plantas derivadas de dicha línea, cuando se compararon con la semilla de control (Tabla 4).

En el experimento 2, aproximadamente 55% de las líneas de embriones transformadas exhibían un contenido de 18:1 incrementado cuando se compararon con las líneas de control (Tabla 5). Las semillas de soja, de plantas regeneradas a partir de líneas de embriones somáticos diferentes que contenían el mismo constructo antisentido, tenían una frecuencia similar (53%) de transformantes ricos en oleato que los embriones somáticos (Tabla 5). Ocasionalmente, una línea embrionaria puede ser quimérica. Es decir, 10-70% de los embriones en la línea pueden

no contener el transgén. Se ha encontrado que los embriones restantes que contienen de hecho el transgén son clonales en todos los casos. En un caso de este tipo, plantas que contienen a la vez fenotipos de tipo salvaje y transgénicos pueden generarse a partir de una sola línea transgénica, aun cuando la mayor parte de los embriones analizados de dicha línea tenían un fenotipo transgénico. Un ejemplo de esto se muestra en la Tabla 6, en la cual, de 5 plantas regeneradas a partir de una sola línea de embrión, 3 tienen un fenotipo rico en oleico y 2 eran de tipo salvaje. En la mayoría de los casos, todas las plantas regeneradas de una sola línea transgénica tendrán semillas que contienen el transgén.

Tabla 4

Porcentaje de Contenido de 18:3 de Embriones y Semillas de Líneas de Soja Transgénicas de Control y del Constructo Antisentido Delta-15

Línea Transformante	Media de embriones (SD, n=10)	Media de semillas* (SD, n=10)
Control	12,1 (2,6)	8,9 (0,8)
Δ15 antisentido, línea 1	5,6 (1,2)	4,3 (1,6)
Δ15 antisentido, línea 2	8,9 (2,2)	2,5 (1,8)
Δ15 antisentido, línea 3	7,3 (1,1)	4,9 (1,9)
Δ15 antisentido, línea 4	7,0 (1,9)	2,4 (1,7)
Δ15 antisentido, línea 5	8,5 (1,9)	4,5 (2,2)
Δ15 antisentido, línea 6	7,6 (1,6)	4,6 (1,6)

\*[Las semillas que se segregaban con fenotipo de tipo salvaje y sin una copia del transgén no se incluyen en estas medias]

Tabla 5

Niveles de Oleato en Embriones Somáticos y Semillas de Plantas de Soja Regeneradas Transformadas Con o Sin el Constructo Antisentido Delta-12-Desaturasa

Vector	# de líneas	# de líneas con 18:1 alto	Media # %18:1
Embriones somáticos:			
Control	19	0	12,0
D 12 antisentido	20	11	35,3
Semillas de plantas regeneradas:			
Control	6	0	18,2
D 12 antisentido	17	9	44,4

\* El valor medio 18:1 de transgénicos es la media de todos los embriones o semillas transformados con el constructo antisentido Delta-12 en el cual al menos un embrión o semilla de dicha línea tenía un contenido de 18:1 mayor que dos desviaciones estándar del valor de control (12,0 en embriones, 18,2 en semillas). El valor medio del control es la media de embriones o semillas que no contienen DNA transgénico alguno pero se han tratado de manera idéntica a los transgénicos

Tabla 6

Valor Medio de 15-20 Semillas de 5 Plantas Diferentes Regeneradas a Partir de una Sola Línea de Embrión. Únicamente las plantas #2, 9 y 11 tienen Semillas con un Fenotipo Rico en 18:1

Línea 4 Planta #	Semilla media 18:1 %	Semilla más rica 18:1 %
1	18,0	26,3
2	33,6	72,1
7	13,6	21,2
9	32,9	57,3
11	24,5	41,7

En un experimento similar, 75% de la región codificante (comenzando en el extremo 5') de la secuencia de Delta-12 desaturasa y de la secuencia Delta-15 desaturasa se pusieron cada uno detrás del promotor b-conglicina en una construcción simple para transformación de soja como se ha descrito arriba. Como en el experimento 2 anterior, se utilizaron conjuntos de embriones separados para análisis en la etapa de embrión y regeneración en plantas fértiles. El contenido medio de 18:1 y 18:3 en 5 embriones de cada una de 7 líneas transformadas se da en la Tabla 7. De las 7 líneas, dos tienen claramente niveles elevados de 18:1 como sería de esperar de embriones en los cuales la conversión de 18:1 en 18:2 por Delta-12 desaturasa es limitada debido a la expresión reducida de la enzima. En estas mismas líneas, existe una ligera disminución en el contenido de 18:3, indicativa de una actividad reducida de Delta-15 desaturasa.

Tabla 7

El contenido de 18:1 y 18:3 en embriones somáticos de 7 líneas transformadas con un constructo de cosupresión combinada de Delta-12 y Delta-15. Los valores son la media de 5 embriones individuales

Línea	%18:1	%18:3
561/1/1	45,1	10,1
561/1/2	18,4	13,8
561/1/3	10,7	15,2
561/4/1	39,3	13,4
561/4/2	18,7	13,2
561/4/4	19,7	14,1
561/4/5	14,6	16,1
561/4/6	43,9	12,9

Se regeneraron 20 plantas fértiles de soja a partir de embriones somáticos transformados con la construcción de cosupresión de D12/D15 desaturasa combinada arriba descrita. Se analizaron 5 semillas individuales de cada planta y, de las 20 líneas, 2 exhibían perfiles de ácidos grasos a granel que sugerían que ambas actividades D12 y D15 desaturasa eran reducidas. Las primeras semillas de plantas transformadas deberían ser genéticamente segregantes para el transgén de tal modo que se analizaron semillas individuales de estas dos líneas para deducir una estimación del número de loci del transgén que contribuían al fenotipo de ácidos grasos. Se analizaron 99 semillas de la línea 557-2-8-1 y 137 semillas de la línea 557-2-8-2. Las clases de perfiles de ácidos grasos de ambas líneas eran coherentes con dos loci transgénicos contribuyentes al fenotipo. El perfil medio de ácidos grasos de las semillas que se consideró existían en la clase fuertemente segregante se dan en la Tabla 8 para las dos líneas citadas

Tabla 8

Los perfiles medios de ácidos grasos (como % de los ácidos grasos totales) para las semillas homocigóticas dobles probables de dos líneas que segregaban transgenes de cosupresión para las desaturasas  $\Delta 12$  y  $\Delta 15$ . Los datos son el valor medio de 10 perfiles de semilla individuales para la línea 557-2-8-1 y 13 perfiles de semilla individuales para la línea 557-2-8-2. El perfil de una línea no transformada cultivada junto con las líneas transformadas se muestra para comparación.

Línea	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
557-2-8-1	8,6	2,1	82,5	2,5	4,2
557-2-8-2	8,3	2,1	82,0	2,2	5,0
No transformada	13,3	2,4	17,4	52,3	19,2

Como en el caso de las construcciones antisentido, los perfiles de ácidos grasos observados en los embriones somáticos son predictivos del tipo y magnitud de alteración en el perfil de ácidos grasos que se obtendrá a partir de las semillas de plantas fértiles transformadas con la misma construcción que los embriones somáticos. Así, se llega a la conclusión de que un fenotipo alterado de ácidos grasos observado en una línea transgénica de embriones somáticos maduros es predictivo de una composición de ácidos grasos alterada de las semillas de las plantas derivadas de dicha línea.

Análisis de Embriones Transgénicos de *Glycine max* que Contenían un Constructo A de Palmitoil-ACP Tioesterasa en Orientación de Sentido

El vector pTC4 que contenía el cDNA de palmitoil-ACP tioesterasa de soja, en la orientación de sentido, bajo el control del promotor beta-conglicina de soja como se ha descrito arriba dio lugar a 6 líneas de embriones maduros



## ES 2 533 860 T3

en el sistema de embriones somáticos de soja. De 6 a 10 embriones de cada una de estas líneas se analizaron respecto a contenido relativo de cada ácido graso como se ha descrito arriba. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

5 Ácidos grasos en embriones de soja transformados con un vector que expresa la palmitoil-ACP tioesterasa de soja en la orientación de sentido

LÍNEA DE EMBRIÓN	EMBRIÓN NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
361/1/1	1	14,8	3,3	10,9	54,9	14,5
361/1/1	2	13,1	2,7	10,2	56,9	16,3
361/1/1	3	11,7	3,0	14,5	57,4	12,4
361/1/1	4	10,0	3,1	24,1	50,4	11,6
361/1/1	5	10,9	2,6	17,9	54,6	12,9
361/1/1	6	10,5	3,1	27,5	47,3	10,6
361/1/1	7	9,8	3,4	31,5	43,9	10,5
361/1/1	8	10,5	3,4	23,7	50,0	11,0
361/1/1	9	15,0	3,5	9,6	57,5	13,4
361/1/1	10	12,8	3,1	18,7	52,6	12,0
361/1/2	1	3,9	2,3	16,1	66,7	10,1
361/1/2	2	10,2	3,3	26,4	47,5	11,7
361/1/2	3	4,7	2,3	20,8	60,0	11,4
361/1/2	4	3,7	2,5	27,0	56,9	8,8
361/1/2	5	3,9	3,1	37,7	45,8	8,4
361/1/2	6	3,8	2,0	16,6	67,2	9,4
361/2/1	1	13,1	2,9	10,8	55,8	16,7
361/2/1	2	12,0	2,5	11,2	57,3	16,2
361/2/1	3	13,5	3,0	13,2	55,2	13,6
361/2/1	4	13,5	2,8	11,6	56,4	14,9
361/2/1	5	15,3	3,0	7,0	56,9	17,0
361/2/1	6	13,1	2,2	10,1	59,0	14,1
361/2/1	7	13,4	2,9	12,5	56,9	13,6
361/2/1	8	15,1	4,0	13,9	49,4	16,5
361/2/1	9	15,7	3,3	11,2	54,6	13,8
361/2/1	10	13,1	2,7	11,5	58,0	13,8
361/2/2	1	4,4	1,5	40,3	40,9	12,9
361/2/2	2	29,2	3,6	12,8	42,2	11,2
361/2/2	3	2,4	1,0	37,1	45,0	14,4
361/2/2	4	1,7	0,7	46,6	37,3	14,4
361/2/2	5	3,4	1,5	31,2	51,6	12,4

ES 2 533 860 T3

LÍNEA DE EMBRIÓN	EMBRIÓN NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
361/2/2	6	4,1	1,4	29,6	46,2	20,1
361/2/2	7	3,7	1,2	37,8	40,1	18,4
361/2/2	8	3,6	1,5	35,4	46,2	13,3
361/2/2	9	5,6	2,4	41,1	31,7	17,6
361/5/1	1	13,7	2,5	11,8	57,8	13,4
361/5/1	2	27,2	3,6	9,8	46,3	11,8
361/5/1	3	16,8	2,8	12,8	53,4	13,4
361/5/1	4	14,6	2,5	11,4	56,6	14,2
361/5/1	5	25,9	4,0	13,8	42,9	12,5
361/5/1	6	25,1	3,3	10,3	49,3	11,0
361/5/1	7	27,2	3,0	4,9	48,6	15,6
361/5/1	8	27,0	3,8	9,8	44,9	13,1
361/5/1	9	28,5	3,5	10,1	45,8	11,2
361/5/1	10	22,8	4,1	14,0	46,1	11,9
361/5/2	1	28,7	3,5	9,8	44,3	12,7
361/5/2	2	31,0	3,5	8,7	43,5	12,4
361/5/2	3	20,2	3,7	9,8	51,0	14,2
361/5/2	4	26,6	3,4	12,9	44,2	11,8
361/5/2	5	27,3	3,5	9,3	44,4	12,4
361/5/2	6	25,9	3,5	11,6	45,2	12,7
361/5/2	7	25,6	3,7	9,2	46,5	13,8
361/5/2	8	25,3	3,7	11,2	46,5	12,3
361/5/2	9	24,8	3,8	9,6	46,4	14,5
361/5/2	10	26,6	3,7	9,8	44,9	14,0

5 Como es a menudo el caso cuando se aumenta la expresión de un mRNA que es endógeno para el tejido diana, los efectos tanto de la sobre-expresión de la enzima resultante como de la infra-expresión de la enzima debida a la cosupresión se observa en este experimento. Mientras que las líneas 361/1/1 y 361/2/1 tienen perfiles de ácidos grasos muy similares a las líneas de control (representados en la Tabla 9), la mayoría de los embriones ... las líneas 361/1/1 y 361/2/1 tienen perfiles de ácidos grasos muy similares a las líneas de control (representados en la Tabla 9), la mayoría de los embriones en la línea 361/1/2 tienen niveles de ácido palmítico que son aproximadamente 3 veces menores que los controles o las líneas transformadas que no presentan fenotipo de ácidos grasos alterado. En contraste, el contenido de ácido palmítico de la totalidad de los embriones en la línea 361/5/2 está aumentado y el contenido medio de ácido palmítico es 26,2% o 1,8 veces el embrión medio de control. La línea 361/2/2 contiene 8 embriones que exhiben el fenotipo de cosupresión (ácido palmítico bajo) y un solo embrión que exhibe el fenotipo de sobre-expresión (contenido alto de ácido palmítico).

10 En este experimento, los efectos de expresión alterada de la palmitoil-ACP tioesterasa de soja se observan en ambas tinciones, y los fenotipos resultantes son como sería de esperar a partir de la especificidad de sustratos de la enzima. La modulación en sentido creciente de la expresión aumenta el contenido relativo de ácido palmítico y reduce el contenido relativo de ácido palmítico.

Ejemplo 4

Regulación de la expresión de Palmitoil-ACP tioesterasa en la canola

Construcción de Vectores para Transformación de *Brassica napus* para Expresión Reducida de Palmitoil-ACP Tiosterasa en Semillas de Canola en Desarrollo

5 Se separó una cola poliA extendida de la secuencia de palmitoil-ACP tiosterasa de canola contenida en el plásmido p5b como sigue. Se digirió el plásmido p5b con EcoRI y Ssp I y se liberó el fragmento de 1,5 kB del vector pBluescript por electroforesis en gel de agarosa. Los extremos monocatenarios se rellenaron con fragmento Klenow y dNTP's.

Se construyeron casetes de expresión del promotor napín de canola como sigue: se sintetizaron 8 cebadores de oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos del napín clon lambda CGN1-2 publicado en la Patente Europea 2755378. Las secuencias de los oligonucleótidos eran:

<b>BR42:</b>	<b>5'-AACATCAATGGCAGCAACTGCGGA-3'</b>	<b>13</b>
<b>BR43:</b>	<b>5'-GCCGGCTGGATTTGTGGCATCAT-3'</b>	<b>14</b>
<b>BR45:</b>	<b>5'-CTAGATCTCCATGGGTGTATGTTCTGTAGTGATG-3'</b>	<b>15</b>
<b>BR46:</b>	<b>5'-TCAGGCCTGTTCGACCTGCGGATCAAGCAGCTTTCA-3'</b>	<b>16</b>
<b>BR47:</b>	<b>5'-CTAGATCTGGTACCTAGATTCCAAACGAAIATCCT-3'</b>	<b>17</b>
<b>BR48:</b>	<b>5'-AACATCAGGCAAGTTAGCATTTCG-3'</b>	<b>18</b>
<b>BR49:</b>	<b>5'-TCAGGCCTGTTCGACGAGGTCCTTCGTCAGCATAT-3'</b>	<b>19</b>
<b>BR50:</b>	<b>5'-AACGAACCAATGACTTCCTGCGGGA-3'</b>	<b>20</b>

10 El DNA genómico de la variedad de canola 'Hyola401' (Zeneca Seeds) se utilizó como molde para la amplificación por PCR de las regiones del promotor napín y el terminador napín. El promotor se amplificó primeramente utilizando los cebadores BR42 y BR43, y se reamplificó utilizando los cebadores BR45 y BR46. Se derivó el plásmido pIMC01 por digestión del producto PCR del promotor de 1,0 kb con Sall/BglII y ligación en pBluescript SK+ digerido con Sall/BamHI (Stratagene). La región del terminador napín se amplificó utilizando los cebadores BR48 y BR50, y se reamplificó utilizando los cebadores BR47 y BR49. El plásmido pIMC06 se derivó por digestión del producto PCR terminador de 1,2 kb con Sall/BglII y ligación en pSP72 (Promega) digerido con Sall/BglII. Utilizando como molde pIMC06, la región del terminador se reamplificó por PCR utilizando cebador.

BR57 5'-CCATGGGAGCTCGTCGACGAGGTCCTTCGTCACGAT-3' 21

20 y cebador

BR58 5'-GAGCTCCCATGGAGATCTGGTACCTAGATTCCAAAC-3' 22

25 El plásmido pIMC101 que contenía el promotor y el terminador napín se generó por digestión del producto PCR con SacI/NcoI y ligación en pIMC01 digerido con SacI/NcoI. El plásmido pIMC101 con tiene un casete de expresión de napín 2,2 kb que incluye secuencias completas 5' y 3' de napín no traducidas y un sitio NcoI introducido en el ATG de comienzo de la traducción. Se utilizaron el cebador BR61 5'-GACTATGTTCTGAATTCTCA-3' 32 y el cebador BR62 5'-GACAAGATCTGCGGCCGCTAAAGAGTGAAGCCGAGGCTC-3' 24 para amplificar por PCR un fragmento de ~ 270 pb desde el extremo 3' del promotor napín. Se obtuvo el plásmido pIMC401 por digestión del producto PCR resultante con EcoRI/BglII y ligación en pIMC101 digerido con EcoRI/Bgl II. El plásmido pIMC401 contiene un casete de expresión de napín de 2,2 kb que carece de la secuencia no traducida 5' de napín e incluye un sitio NotI en el comienzo de la transcripción.

30 en el comienzo de la transcripción.

Las secuencias oligonucleotídicas eran:

BR42 y BR43 correspondientes a las bases 29 a 52 (BR42) y el complemento de las bases 1146 a 1169 (BR43) de SEQ ID NO: 8.

35 BR45 y BR46 correspondientes a las bases 46 a 66 (BR46) y el complemento de las bases 1028 a 1047 (BR45) de SEQ ID NO: 8. Adicionalmente, BR46 tenía bases correspondientes a un sitio Sall (5'-GTCGAC-3') y unas cuantas bases adicionales (5'-TCAGGCCT-3') en su extremo 3', y BR45 tenía bases correspondientes a un sitio BglII (5'-AGATCT-3') y dos bases (5'-CT-3') adicionales en el extremo 5' del cebador.

40 BR47 y BR48, correspondientes a las bases 81 a 102 (BR47) y las bases 22 a 45 (BR4) de SEQ ID NO: 10. Adicionalmente, BR47 tenía dos bases (5'-CT-3') adicionales en el extremo 5' del cebador seguidas por bases correspondientes a un sitio BglII (5'-AGATCT-3') seguidas por unas cuantas bases adicionales (5'-TCAGGCCT-3').

BR49 y BR50 correspondientes al complemento de bases 1256 a 1275 (BR49), y el complemento de las bases 1274 a 1297 (BR50) de SEQ ID NO: 10. Adicionalmente, BR49 tenía bases correspondientes a un sitio Sall (5'-GTCGAC-3') y unas cuantas bases adicionales (5'-TCAGGCCT-3') en su extremo 5'.

BR57 y BR58 correspondían al complemento de bases 1258 a 1275 (BR57) y bases 81 a 93 (BR58) de SEQ ID NO: 10. Adicionalmente, el extremo 5' de BR57 tenía algunas bases extra (5'-CCATGG-3') seguidas por bases correspondientes a un sitio SacI (5'-GAGCTC-3') seguidas por más bases adicionales (5'-GTTCGACGAGG-3') (SEQ ID NO: 25).

- 5 El extremo 5' de BR58 tenía bases adicionales (5'-GAGCTC-3') seguidas por bases correspondientes a un sitio NcoI (5'-CCATGG-3') seguidas por bases adicionales (5'-AGATCTGGTACC-3') (SEQ ID NO: 26).

BR61 y BR62 correspondientes a bases 745 a 764 (BR61) y las bases 993 a 1013 (BR62) de SEQ ID NO: 8. Adicionalmente, el extremo 5' de BR62 tenía bases adicionales (5'-GACA-3') seguidas por bases correspondientes a un sitio Bgl II (5'-AGATCT-3') seguidas por unas cuantas bases adicionales (5'-GCGGCCGC-3').

- 10 El DNA genómico de la variedad de canola 'Hyola401' (Zeneca Seeds) se utilizó como molde para la aplicación por PCR de las regiones del promotor napín y el terminador napín. El promotor se amplificó primeramente utilizando los cebadores BR42 y BR43, y se reamplificó utilizando los cebadores BR45 y BR46. El plásmido pIMC01 se derivó por digestión del producto PCR promotor de 1,0 kb con Sall/BglIII y ligación en pBluescript SK<sup>+</sup> digerido con Sall/BamHI (Stratagene). La región del terminador napín se amplificó utilizando los cebadores BR48 y BR50, y se reamplificó utilizando los cebadores BR47 y BR49. El plásmido pIMC06 se derivó por digestión del producto PCR terminador de 1,2 kb con Sall/BglIII y ligación en pSP72 digerido con Sall/BglIII (Promega). Utilizando pIMC06 como molde, la región del terminador se reamplificó por PCR utilizando el cebador BR57 y el cebador BR58. El plásmido pIMC101 que contenía a la vez el promotor y el terminador napín se generó por digestión del producto PCR con SacI/NcoI y ligación en pIMC01 digerido con SacI/NcoI. El plásmido pIMC 101 contiene un casete de expresión de napín de 2,2 kb que incluye las secuencias no traducidas 5' y 3' de napín completas y un sitio NcoI introducido en el ATG de comienzo de la traducción. Se utilizaron el cebador BR61 y el cebador BR62 para amplificar por PCR un fragmento de ~ 270 pb desde el extremo 3' del promotor napín. Se obtuvo el plásmido pIMC401 por digestión del producto PCR resultante con EcoRI/BglIII y ligación en pIMC101 digerido con EcoRI/BglIII. El plásmido pIMC401 contiene un casete de expresión de napina de 2,2 kb que carece de la secuencia 5' NotI de napín e incluye un sitio NotI al comienzo de la transcripción.

- 25 El plásmido pIMC401 se digirió con NotI y los extremos monocatenarios se rellenaron con dNTP's y fragmento Klenow. El plásmido linealizado se trató con fosfatasa intestinal de ternero. El plásmido tratado con fosfatasa y linealizado se ligó al fragmento de 1,5 kB de extremos romos de la palmitoil-ACP tioesterasa de canola arriba descrito. La transformación de células de *E. coli* competentes con la mezcla de ligación dio como resultado el aislamiento de clones en los cuales la secuencia de cDNA de planta estaba en la orientación de sentido con respecto al promotor napín (pIMC29) y en la orientación antisentido (pIMC30).

- 30 El vector para transformación de la construcción de palmitoil-ACP tioesterasa antisentido bajo control del promotor napín en plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* se produjo por construcción de un sistema vector del plásmido binario Ti (Bevan, (1984) Nucl. Acids Res. 12: 8711-8720). Un vector inicial para el sistema, (pZS199) está basado en un vector que contiene: (1) el gen quimérico nopalina-sintasa/neomicin-fosfotransferasa como marcador seleccionable para células de plantas transformadas (Brevan et al. (1984) Nature 304:184-186), (2) los bordes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti (Brevan et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12: 8711-8720), (3) el segmento complementario  $\alpha$  lacZ de *E. coli* (Vieria y Messing (1982) Gene 19: 259-267) con sitios singulares de endonucleasas de restricción para EcoRI, KpnI, BamHI, y Sall, (4) el origen de replicación bacteriano del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh et al. (1984) Plasmid 11:206-220), y (5) el gen de neomicin-fosforotransferasa bacteriana de Tn5 (Berg et al. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3628-3632) como marcador seleccionable para *A. tumefaciens* transformado. El promotor de nopalina-sintasa en el marcador seleccionable de plantas se reemplazó por el promotor 35S (Odell et al. (1985) Nature, 313:810-813) por una estrategia estándar de digestión con endonucleasas de restricción y ligación. El promotor 35S es necesario para la transformación eficiente de *Brassica napus* como se describe más adelante.

- 35 Los vectores binarios que contenían las casetes de expresión sentido y antisentido de palmitoil-ACP tioesterasa se construyeron por digestión de pIMC29 y pIMC30 con Sall para liberar la secuencia 3' de cDNA de napina:palmitoil-ACP tioesterasa y purificación en gel de agarosa de los fragmentos de 3,8 kB. El plásmido pZS199 se digirió también con Sall y los fragmentos de 3,8 kB aislados de pIMC29 y pIMC30 se ligaron al vector linealizado. La transformación y el aislamiento de los clones dieron como resultado el vector binario que contenía el constructo de sentido (pIMC129) y el constructo antisentido (pIMC130).

#### Transformación de *Brassica napus* Mediada por *Agrobacterium*

- 40 Los vectores binarios pIMC129 y pIMC130 se transfirieron por un método de congelación/descongelación (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187 a la cepa de *Agrobacterium* LBA4404/pAL4404 (Hockema et al (1983), Nature 303: 179-180).

45 La variedad cultivada "Westar" de *Brassica napus* se transformó por co-cultivo de fragmentos de brotes con la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 portadora del vector binario apropiado.

Se esterilizaron semillas de *B. napus* por agitación en 10% Chlorox, 0,1% SDS durante 30 minutos, y se lavaron luego concienzudamente con agua destilada estéril. Las semillas se germinaron en medio estéril que contenía CaCl<sub>2</sub> 30 mM y 1,5% de agar, y se dejaron crecer durante 6 días en la oscuridad a 24°C.

5 Cultivos líquidos de *Agrobacterium* para transformación de plantas se dejaron crecer durante una noche a 28°C en medio Mínimo A que contenía 100 mg/L de kanamicina. Las células bacterianas se redujeron a un sedimento por centrifugación y se resuspendieron a una concentración de 10<sup>8</sup> células/mL en medio Orgánico Mínimo de Murashige y Skoog que contenía acetosiringona 100 µM.

10 Se cortaron hipocótilos de brotes de *B. napus* en segmentos de 5 mm que se introdujeron inmediatamente en la suspensión bacteriana. Después de 30 min, los fragmentos de hipocótilo se retiraron de la suspensión bacteriana y se pusieron en medio de callo BC-28 que contenía acetosiringona 100 µM. El tejido de planta y las *Agrobacterias* se co-cultivaron durante 3 días a 24°C en luz tenue.

15 El co-cultivo se terminó por transferencia de los fragmentos de hipocótilo a medio de callo BC-28 que contenía 200 mg/mL de carbenicilina para destruir las *Agrobacterias*, y 25 mg/L de kanamicina para seleccionar el crecimiento de las células de plantas transformadas. Los fragmentos de brotes se incubaron en este medio durante 3 semanas a 24°C bajo luz continua.

20 Después de 3 semanas, los segmentos se transfirieron a medio de regeneración BS-48 que contenía 200 mg/L de carbenicilina y 25 mg/L de kanamicina. Los tejidos de plantas se subcultivaron cada dos semanas en medio de regeneración selectiva fresco, en las mismas condiciones de cultivo descritas para el medio de callo. Los callos supuestamente transformados crecían rápidamente en medio de regeneración; cuando los callos alcanzan un diámetro de aproximadamente 2 mm, se retiran de los fragmentos de hipocótilo y se ponen en el mismo medio sin kanamicina.

Los brotes comienzan a aparecer al cabo de varias semanas después de la transferencia a medio de regeneración BS-48. Tan pronto como los brotes forman tallos apreciables, se cortan los mismos de los callos, se transfieren a medio de elongación MSV-1A, y se someten a un fotoperiodo de 16:8 h a 24°C.

25 Una vez que los brotes se han alargado varios entrenudos, se cortan los mismos por encima de la superficie del agar y los extremos cortados se sumergen en Rootone. Los brotes tratados se plantan directamente en medio húmedo para tiestos sin tierra Metro-Mix 350. Los tiestos se cubren con bolsas de plástico que se retiran cuando las plantas están creciendo claramente al cabo de unos 10 días.

30 Las plantas se dejan crecer sometidas a un fotoperiodo de 16:8 h, con una temperatura diurna de 23°C y una temperatura nocturna de 17°C. Cuando el tallo floreciente primario comienza a alargarse, se cubre el mismo con una bolsa de malla para contención del polen a fin de prevenir el crecimiento exogámico. Se facilita la autopolinización por agitación mediante sacudidas de las plantas varias veces al día, y las semillas maduran durante aproximadamente 90 días después de la transferencia a tiestos.

35 El contenido relativo de cada uno de los 7 ácidos grasos principales en el lípido de las semillas se analizó como sigue: Veinte semillas tomadas al azar de una muestra de 25 vainas de cada planta se trituraron en 0,5 mL de 2-propanol. Se transfirieron 25 µL del extracto resultante a un tubo de vidrio y el disolvente se evaporó en corriente de nitrógeno. El residuo seco se sometió a metanólisis en 0,5 mL de metóxido de sodio al 1% en metanol a 60°C durante 1 hora. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos producidos se extrajeron en 1 mL de hexano y se añadieron 0,5 mL de agua a la mezcla disolvente para lavar el metanol de la capa de hexano. Se transfirió una porción de la capa de hexano a un vial de muestra para análisis por cromatografía gas-líquido como se describe en el Ejemplo 3 anterior. Si bien se analizaron 7 ácidos grasos, únicamente se muestra la contribución relativa de los 5 ácidos grasos principales al total en las Tablas 10, 11 y 12 siguientes.

Tabla 10

La contribución relativa de 5 ácidos grasos al contenido a granel de ácidos grasos de semilla en plantas de canola segregantes transformadas con pIMC129 que contenía la palmitoil-ACP tioesterasa de canola en la orientación de sentido al promotor napín

TRANSFORMANTE NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
129-511	4,1	1,4	67,9	19,0	5,9
129-186	4,2	1,4	66,5	20,0	5,9
129-230	4,2	1,2	63,9	21,0	7,9
129-258	4,0	1,4	57,2	25,5	10,0

## ES 2 533 860 T3

La contribución relativa de 5 ácidos grasos al contenido a granel de ácidos grasos de semilla en plantas de canola segregantes transformadas con pIMC129 que contenía la palmitoil-ACP tioesterasa de canola en la orientación de sentido al promotor napín

TRANSFORMANTE NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
129-107	4,7	1,7	59,0	24,1	8,4
129-457	4,3	1,3	62,0	22,8	7,7
129-381	4,2	1,1	58,0	24,8	10,0
129-515	4,4	1,3	63,4	21,8	7,5
129-122	4,0	1,4	63,0	21,4	8,4
129-176	4,1	1,4	65,7	19,6	7,5
129-939	4,4	1,7	64,8	19,2	8,2
129-303	4,2	1,5	62,3	21,4	9,4
129-208	3,8	1,4	66,9	18,0	8,2
129-835	4,3	1,6	58,0	24,5	9,7
129-659	4,0	1,6	60,8	22,2	10,0
129-44	4,2	1,8	66,0	18,4	7,7
129-756	3,9	1,6	60,0	22,4	10,0
129-30	4,0	1,7	64,8	18,7	9,6
129-340	3,8	1,7	67,1	17,4	7,9
129-272	3,9	1,8	59,4	21,3	12,0
129-358	4,2	1,5	60,7	20,8	11,0
129-223	4,3	1,6	63,4	20,6	8,3
129-314	4,1	2,0	61,8	21,4	9,4
129-657	4,2	1,8	64,8	18,3	9,1
129-151	4,2	1,4	62,5	20,8	9,2
129-40	4,3	1,6	63,8	20,8	7,8
129-805	4,4	2,2	61,6	19,4	10,0
129-44	4,1	1,6	64,2	19,1	8,7
129-288	3,5	1,5	65,1	18,9	8,9
129-833	4,2	1,7	58,8	23,6	9,4
129-889	4,6	2,8	57,6	26,4	9,5
129-247	5,7	1,5	52,8	27,2	13,0
129-355	4,3	2,3	66,0	19,1	6,3
129-631	4,5	2,3	66,7	19,4	5,6
129-73	5,0	2,5	65,4	20,8	6,4
129-407	3,9	1,5	65,4	21,2	6,1
Westar	4,0	1,7	64,0	19,7	8,5

Ninguna de las plantas transformadas analizadas tiene perfiles de ácidos grasos que sean acusadamente diferentes del esperado en las semillas de canola. Las plantas números 129-805, 129-889 y 129-73 tienen un contenido ligeramente elevado de ácidos grasos saturados, y pueden representar líneas con una cantidad baja de sobre-expresión. Dado que el evento de transformación da lugar a una planta que es heterocigótica para el transgén introducido, la semilla de estas plantas es segregante con respecto al número de copias del transgén. Si, como era

de esperar el fenotipo de ácidos grasos es aditivo con respecto al número de copias del transgén, el efecto pleno no puede apreciarse en la población de semillas a granel hasta la segunda generación después de la transformación. Un análisis ulterior se realizará sobre generaciones de plantas subsiguientes con aumentos moderados en el contenido de ácidos grasos saturados.

- 5 No existe evidencia acusada alguna para el fenotipo bajo en palmitato esperado a partir de un transformante cosupresor. No obstante, en contraste con la soja, la cosupresión en canola es un evento de transformación raro. En la experiencia de los inventores con otros genes en el camino de la biosíntesis de los ácidos grasos, han sido necesarias tantas como 200 líneas transformadas para observar un fenotipo de cosupresión acusado.

Tabla 11

- 10 La contribución relativa de 5 ácidos grasos al contenido de ácidos grasos de semillas a granel en plantas de canola segregantes transformadas con pIMC130 que contiene la palmitoil-ACP tioesterasa de canola en la orientación antisentido al promotor napín

TRANSFORMANTE NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
130-220	4,0	1,7	65,5	20,1	6,4
130-527	4,1	1,7	62,6	19,7	10,0
130-529	4,4	1,7	69,6	17,4	4,6
130-347	4,0	1,4	64,8	21,3	6,1
130-738	4,9	1,5	56,6	27,4	7,3
130-317	4,2	1,4	62,4	22,7	7,6
130-272	4,8	1,6	62,7	23,2	6,4
130-412	4,4	1,4	63,7	22,3	6,7
130-119	3,9	1,1	59,7	25,7	7,9
130-257	5,0	1,8	62,1	20,5	8,8
130-677	4,8	1,2	53,6	28,6	10,0
130-310	4,6	1,6	61,6	23,0	7,3
130-323	4,0	2,0	67,8	16,9	7,4
130-699	4,1	1,1	62,8	23,4	6,8
130-478	5,0	2,0	57,0	23,4	11,0
130-651	4,4	1,6	66,0	19,2	7,7
130-126	3,4	1,7	68,4	16,2	8,6
130-465	5,1	1,9	58,5	24,1	10,0
130-234	4,2	1,6	64,2	20,9	7,8
130-661	4,4	1,4	60,6	22,8	9,6
130-114	4,2	1,4	65,2	19,7	7,8
130-305	4,6	1,6	58,6	23,9	10,0
130-240	4,1	1,4	69,1	17,4	6,5
130-660	4,1	1,4	67,0	18,5	7,2
130-350	4,1	1,5	62,5	21,1	9,8
130-36	4,1	1,9	61,4	21,7	8,9
130-527	4,1	1,5	64,7	19,0	9,0
130-33	4,0	1,1	62,6	22,1	9,1
Westar	4,0	1,7	64,0	19,7	8,5

5 El contenido medio de ácido palmítico para los 28 transformantes analizados es 4,3, con una desviación estándar de la media de 0,39. Si bien no existe línea alguna que se desvíe notablemente del valor medio en el análisis de semillas a granel, la línea 130-126 se encuentra en un exceso de dos desviaciones estándar por debajo de la media. Dado que esto podría ser indicativo de un fenotipo antisentido débil observado en una población de semillas segregantes como se ha descrito arriba, se analizaron 12 semillas individuales de la planta respecto a contenido relativo de ácidos grasos junto con 12 semillas simples de una planta Westar no transformada en la misma cámara de crecimiento y se plantaron en una fecha comparable. Los resultados de tales análisis se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

10 La contribución relativa de 5 ácidos grasos al contenido de ácidos grasos total en semillas individuales de transformantes 130-126 y de semillas individuales de una planta de control no transformada

TRANSFORMANTE NO.	ÁCIDO GRASO COMO % DEL TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS				
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
130-126	3,07	1,51	67,27	17,26	8,74
130-126	3,11	1,74	64,70	18,19	9,47
130-126	3,20	1,66	69,71	16,21	7,40
130-126	3,47	1,77	69,98	15,66	6,73
130-126	3,76	2,04	71,26	15,42	5,00
130-126	3,56	1,80	71,74	15,47	4,83
130-126	3,30	2,05	65,22	18,11	9,37
130-126	3,45	1,91	71,32	14,72	5,94
130-126	4,30	1,90	64,97	17,91	8,84
130-126	2,95	1,93	65,57	17,27	10,30
130-126	3,44	1,71	69,98	16,06	6,26
130-126	3,43	1,81	72,40	14,78	5,02
WESTAR4/8	3,81	1,71	62,46	20,46	9,70
WESTAR4/8	4,28	1,42	63,27	20,86	8,30
WESTAR4/8	4,00	1,55	68,80	18,08	5,30
WESTAR4/8	4,19	1,97	61,51	20,01	10,40
WESTAR4/8	4,37	1,60	63,92	20,02	7,96
WESTAR4/8	4,41	1,45	62,95	20,39	8,36
WESTAR4/8	4,12	1,84	60,90	21,19	10,00
WESTAR4/8	3,89	1,69	63,63	19,68	8,99
WESTAR4/8	3,97	1,73	67,68	17,57	6,43
WESTAR4/8	3,97	1,78	63,78	19,47	8,94
WESTAR4/8	3,85	1,76	64,85	18,56	8,65
WESTAR4/8	4,06	1,69	63,74	20,16	8,52

15 El contenido medio relativo de ácido palmítico de las 12 semillas del transformante 130-126 es 3,42% y la desviación estándar de la media de 0,359, mientras que el contenido medio de ácido palmítico de las 12 semillas de control es 4,08 con una desviación estándar media de 0,20. El valor medio más bajo, la mayor desviación estándar y el intervalo más amplio de contenidos observados de ácido palmítico son todos ellos indicativos de una población segregante en la cual las semillas homocigóticas para el transgén antisentido de la palmitoil-ACP tioesterasa de canola producen ligeramente menos ácido palmítico. El fenotipo observado se confirmará por análisis de semillas a granel de plantas múltiples en la generación siguiente.



5 Como se ha indicado para la construcción de sentido anterior, la existencia de fenotipos de ácidos grasos alterados máximamente son eventos de transformación raros en la canola. Así, el fenotipo de la semilla segregante con contenido bajo de palmitato en el transformante 130-126 es indicativo de que la infra-expresión antisentido de palmitoil-ACP tioesterasa en las semillas de canola es capaz de reducir la producción de ácidos grasos saturados, pero no indica el contenido mínimo de ácido palmítico que puede alcanzarse por este método.

**Listado de Secuencias**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- 10 (A) NOMBRE: E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
(B) CALLE: 1007 MARKET STREET  
(C) CIUDAD: WILMINGTON  
(D) ESTADO: DELAWARE  
(E) PAÍS: EE.UU.  
15 (F) CÓDIGO POSTAL: 19898  
(G) TELÉFONO: 302-992-4931  
(H) TELEFAX: 302-773-0164

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE GENES DE PALMITOIL-ACP TIOESTERASA DE CANOLA Y SOJA Y SU USO EN LA REGULACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES DE LAS PLANTAS DE SOJA Y CANOLA

20 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 32

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- 25 (A) TIPO DE MEDIO: disco flexible  
(B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM  
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS, Versión 3.1  
(D) PROGRAMA: Microsoft Word, Versión 2.0

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 1688 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CLASE DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO:NO

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SENCUENCIA: SEQ ID NO:1:

ACAATTACAC TGTCTCTCTC TTTTCCAAAA TTAGGGAAAC AACCAAGGACG CAAAATGACA	60
CAATAGCCCT TCTTCCCTGT TTCCAGCTTT TCTCCTTCTC TCTCTCTCCA TCTTCTTCTT	120
CTTCTTCACT CAGTCAGATC CAACTCCTCA GATAACACAA GACCAAACCC GCTTTTTCTG	180
CATTCTAGA CTAGACGTTT TACCGGAGAA GCGACCTTAG AAATTCATTA TGGTGGCAAC	240
AGCTGCTACT TCATCATTTT TCCCTGTTAC TTCACCCTCG CCGGACTCTG GTGGAGCAGG	300
CAGCAAACCT GGTGGTGGGC CTGCAAACCT TGGAGGACTA AAATCCAAAT CTGCGTCTTC	360
TGGTGGCTTG AAGGCAAAGG CGCAAGCCCC TTCGAAAATT AATGGAACCA CAGTTGTTAC	420
ATCTAAAGAA AGCTTCAAGC ATGATGATGA TCTACCTTCG CCTCCCCCA GAACTTTTAT	480
CAACCAGTTG CTGATTGGA GCATGCTTCT TGCTGCTATC ACAACAATTT TCTTGGCCGC	540
TGAAAAGCAG TGGATGATGC TTGATTGGAA GCCACGGCGA CCTGACATGC TTATTGACCC	600
CTTTGGGATA GGAAAATTG TTCAGGATGG TCTTGTGTTT CGTGAAAAC TTTCTATTAG	660
ATCATATGAG ATTGGTGCTG ATCGTACCGC ATCTATAGAA ACAGTAATGA ACCATTTGCA	720
AGAAACTGCA CTTAATCATG TTAAGAGTGC TGGGCTTCTT GGTGATGGCT TTGGTTCCAC	780
GCCAGAAATG TGCAAAAAGA ACTTGATATG GGTGGTTACT CGGATGCAGG TTGTGGTGGG	840
ACGCTATCCT ACATGGGGTG ACATAGTTCA AGTGGACACT TGGGTTTCTG GATCAGGGAA	900
GAATGGTATG CGTCGTGATT GGCTTTTACG TGACTCCAAA ACTGGTGAAA TCTTGACAAG	960
AGCTTCCAGT GTTTGGGTCA TGATGAATAA GCTAACACGG AGGCTGTCTA AAATCCAGA	1020
AGAAGTCAGA CAGGAGATAG GATCTTATTT TGTGGATTCT GATCCAATTC TGGAAGAGGA	1080
TAACAGAAA CTGACTAAAC TTGACGACAA CACAGCGGAT TATATTCGTA CCGGTTTAAG	1140
TCCTAGGTGG AGTGATCTAG ATATCAATCA GCATGTCAAC AATGTGAAGT ACATTGGCTG	1200
GATTCTGGAG AGTGCTCCAC AGCCAATCTT GGAGAGTCAT GAGCTTTCTT CCATGACTTT	1260
AGAGTATAGG AGAGAGTGTG GTAGGGACAG TGTGCTGGAT TCCCTGACTG CTGTATCTGG	1320
GGCCGACATG GGCAATCTAG CTCACAGCGG GCATGTTGAG TGCAAGCATT TGCTTCGACT	1380
GGAAAATGGT GCTGAGATTG TGAGGGGCAG GACTGAGTGG AGGCCCAAAC CTGTGAACAA	1440
CTTTGGTGTT GTGAACCAGG TTCCAGCAGA AAGCACCTAA GATTGAAAT GGTAAACGAT	1500
TGGAGTTGCA TCAGTCTCCT TGCTATGTTT AGACTTATTC TGGTTCCCTG GGGAGATTT	1560
TGCTTGTGTC TATCCAATCA ATCTACATGT CTTTAAATAT ATACACCTTC TAATTTGTGA	1620
TACTTTGGTG GGTAAGGGGG AAAAGCAGCA GTAAATCTCA TTCTCATTGT AATTAAAAA	1680
AAAAAAA	1688

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 1483 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

5 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

```

GGCAGGAGCT CATTCTTCCC TCTCCCATCT TCCCCACTCG ACCCCACCGC AAAAACCAAC      60
AAAGTCACCA CCTCCACCAA CTTCTCCGGC ATCTTCCCCA CTCCAAACTC CTCCGGCAGA      120
TGAAGGTAA ACCAAACGCT CAGGCCCCAC CCAAGATCAA CGGCAAGAGA GTCGGTCTCC      180
CTTCTGGCTC GGTGAAGCCT GATAACGAGA CGTCTCACA GCATCCCGCA GCACCGAGGA      240
CGTTCATCAA CCAGCTGCCT GACTGGAGCA TGCTTCTTGC TGCAATAACA ACCGTCTTCT      300
TGGCGGCTGA GAAGCAGTGG ATGATGCTTG ACTGGAAACC GAGGCGCTCT GACGTGATTA      360
TGGATCCGTT TGGGTTAGGG AGGATCGTTC AGGATGGGCT TGTGTTCCGT CAGAATTCT      420
CTATTCGGTC TTATGAGATA GGTGCTGATC GCTCTGCGTC TATAGAAACG GTTATGAATC      480
ATTTACAGGA AACGGCACTA AACCATGTTA AGACTGCTGG ACTGCTTGA GAATGGTTTG      540
GTTCTACTCC TGAGATGGTT AAGAAGAACT TGATTTGGGT TGTTACTCGT ATGCAGGTTG      600
TCGTTGATAA ATATCCTACT TGGGGAGATG TTGTGGAAGT AGATACATGG GTGAGCCAGT      660
CTGGAAGAA CGGTATGCGT CGTGATTGGC TAGTTCGAGA TGGCAATACT GGAGAAATTT      720
TAACAAGAGC ATCAAGTGTG TGGGTGATGA TGAATAAACT GACAAGAAGA TTATCAAAGA      780
TTCTGAAGA GGTTCGAGGG GAGATAGAGC CTTACTTTGT TAATTCTGAC CCAGTCCTTG      840
CCGAGGACAG CAGAAAGTTA ACAAACCTTG ATGACAAGAC TGCTGACTAT GTTCGTTCTG      900
GTCTCACTCC GCGTTGGAGT GACTTGGATG TTAACCAGCA CGTTAACAAT GTGAAGTACA      960
TCGGGTGGAT ACTGGAGAGT GCACCTGTGG GGATGATGGA GAGTCAGAAG CTGAAAAGCA     1020
TGACTIONGGA GTATCGCAGG GAGTGCGGGA GGGACAGTGT GCTTCAGTCC CTCACCGCGG     1080
TTTCGGGCTG CGATATCGGT AGCCTCGGGA CGGCTGGTGA AGTGGAATGT CAGCATCTGC     1140
TCCGTCTCCA GGATGGAGCT GAAGTGGTGA GAGGAAGAAC AGAGTGGAGT TCCAAAACAT     1200
CAACAACAAC TTGGGACATC ACACCGTGAA AAGAATATAG CAAACATGGG TTCTTTGGTT     1260
CGTTTGTAAC ACTATACTAC CTTGCTTGCA ACCACCACTA CTCAAAAACA GTTTGGGCCA     1320
CCTTTGTATA TTTTCTTTGG TTCTTATTTT TTTTCTTCTT GGAGGTCCCT TTTTATTATA     1380
TTTATTTTTT CTTTGGGTG CCAGACAAAG GCAAATAACT TTCTTATCCT AATATTATTT     1440
AAATGTATTT TATTTTGGGG GTTTAAAAAA AAAAAAAAAA AAA                          1483
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:3:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 13 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

CATGGAGGAG CAG 13

- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

20 CTGCTCCTC 9

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

AAGGAAAAA GCGGCCGCTG ACACAATAGC CCTTCT 36

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 328 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

ES 2 533 860 T3

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

Thr Val Phe Leu Ala Ala Glu Lys Gln Trp Met Met Leu Asp Trp Lys  
20 25 30

Pro Arg Arg Ser Asp Val Ile Met Asp Pro Phe Gly Leu Gly Arg Ile  
35 40 45

Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Gln Asn Phe Ser Ile Arg Ser Tyr  
50 55 60

Glu Ile Gly Ala Asp Arg Ser Ala Ser Ile Glu Thr Val Met Asn His  
65 70 75 80

Leu Gln Glu Thr Ala Leu Asn His Val Lys Thr Ala Gly Leu Leu Gly  
85 90 95

Asp Gly Phe Gly Ser Thr Pro Glu Met Val Lys Lys Asn Leu Ile Trp  
100 105 110

Val Val Thr Arg Met Gln Val Val Val Asp Lys Tyr Pro Thr Trp Gly  
115 120 125

Asp Val Val Glu Val Asp Thr Trp Val Ser Gln Ser Gly Lys Asn Gly  
130 135 140

Met Arg Arg Asp Trp Leu Val Arg Asp Gly Asn Thr Gly Glu Ile Leu  
145 150 155 160

Thr Arg Ala Ser Ser Val Trp Val Met Met Asn Lys Leu Thr Arg Arg  
165 170 175

Leu Ser Lys Ile Pro Glu Glu Val Arg Gly Glu Ile Glu Pro Tyr Phe  
180 185 190

Val Asn Ser Asp Pro Val Leu Ala Glu Asp Ser Arg Lys Leu Thr Lys  
195 200 205

Leu Asp Asp Lys Thr Ala Asp Tyr Val Arg Ser Gly Leu Thr Pro Arg  
210 215 220

Trp Ser Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Asn Asn Val Lys Tyr Ile  
225 230 235 240

Gly Trp Ile Leu Glu Ser Ala Pro Val Gly Met Met Glu Ser Gln Lys  
245 250 255

Leu Lys Ser Met Thr Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser  
260 265 270

Val Leu Gln Ser Leu Thr Ala Val Ser Gly Cys Asp Ile Gly Ser Leu  
275 280 285

Gly Thr Ala Gly Glu Val Glu Cys Gln His Leu Leu Arg Leu Gln Asp  
290 295 300

Gly Ala Glu Val Val Arg Gly Arg Thr Glu Trp Ser Ser Lys Thr Ser  
305 310 315 320

Thr Thr Thr Trp Asp Ile Thr Pro  
325

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 328 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) CLASE DE CADENA: desconocida  
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

Met Glu Glu Gln Leu Leu Ala Ala Ile Thr Thr Ile Phe Leu Ala Ala  
1 5 10 15  
Glu Lys Gln Trp Met Met Leu Asp Trp Lys Pro Arg Arg Pro Asp Met  
20 25 30  
Leu Ile Asp Pro Phe Gly Ile Gly Lys Ile Val Gln Asp Gly Leu Val  
35 40 45  
Phe Arg Glu Asn Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg  
50 55 60  
Thr Ala Ser Ile Glu Thr Val Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala Leu  
65 70 75 80  
Asn His Val Lys Ser Ala Gly Leu Leu Gly Asp Gly Phe Gly Ser Thr  
85 90 95  
Pro Glu Met Cys Lys Lys Asn Leu Ile Trp Val Val Thr Arg Met Gln  
100 105 110  
Val Val Val Glu Arg Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Ile Val Gln Val Asp  
115 120 125  
Thr Trp Val Ser Gly Ser Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp Leu  
130 135 140  
Leu Arg Asp Ser Lys Thr Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ala Ser Ser Val  
145 150 155 160  
Trp Val Met Met Asn Lys Leu Thr Arg Arg Leu Ser Lys Ile Pro Glu  
165 170 175  
Glu Val Arg Gln Glu Ile Gly Ser Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Ile  
180 185 190  
Leu Glu Glu Asp Asn Arg Lys Leu Thr Lys Leu Asp Asp Asn Thr Ala  
195 200 205  
Asp Tyr Ile Arg Thr Gly Leu Ser Pro Arg Trp Ser Asp Leu Asp Ile  
210 215 220  
Asn Gln His Val Asn Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu Ser  
225 230 235 240  
Ala Pro Gln Pro Ile Leu Glu Ser His Glu Leu Ser Ser Met Thr Leu  
245 250 255  
Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Asp Ser Leu Thr  
260 265 270  
Ala Val Ser Gly Ala Asp Met Gly Asn Leu Ala His Ser Gly His Val  
275 280 285  
Glu Cys Lys His Leu Leu Arg Leu Glu Asn Gly Ala Glu Ile Val Arg  
290 295 300  
Gly Arg Thr Glu Trp Arg Pro Lys Pro Val Asn Asn Phe Gly Val Val  
305 310 315 320  
Asn Gln Val Pro Ala Glu Ser Thr  
325

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1174 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

**ATAGGAGGTG GGAGAATGGG TATAGAATAA CATCAATGGC AGCAACTGCG GATCAAGCAG 60**  
**CTTTCATATT AAGCATACCA AAGCGTAAGA TGGTGGATGA AACTCAAGAG ACTCTCCGCA 120**  
**CCACCGCCTT TCCAAGTACT CATGTCAAGG TTGGTTTCTT TAGCTTTGAA CACAGATTTG 180**  
**GATCTTTTTG TTTTGTTC ATATACTTAG GACCTGAGAG CTTTTGGTTG ATTTTTTTTT 240**  
**CAGGACAAAT GGGCGAAGAA TCTGTACATT GCATCAATAT GCTATGGCAG GACAGTGTGC 300**  
**TGATACACAC TTAAGCATCA TGTGAAAGC CAAAGACAAT TGGAGCGAGA CTCAGGGTCG 360**  
**TCATAATACC AATCAAAGAC GTAAAACCAG ACGCAACCTC TTTGGTTGAA TGTAATGAAA 420**  
**GGGATGTGTC TTGGTATGTA TGTACGAATA ACAAAGAGA AGATGGAATT AGTAGTAGAA 480**  
**AATATTTGGG AGCTTTTTAA GCCCTTCAAG TGTGCTTTTT ATCTTATTGA TATCATCCAT 540**  
**TTGCGTTGTT TAATGCGTCT CTAGATATGT TCCTATATCT TTCTCAGTGT CTGATAAGTG 600**  
**AAATGTGAGA AAACCATACC AAACCAAAAT ATTCAAATCT TATTTTTAAT AATGTTGAAT 660**  
**CACTCGGAGT TGCCACCTTC TGTGCCAATT GTGCTGAATC TATCACACTA GAAAAAACA 720**  
**TTTCTTCAAG GTAATGACTT GTGGACTATG TTCTGAATTC TCATTAAGTT TTTATTTTCT 780**  
**GAAGTTAAG TTTTACCTT CTGTTTTGAA ATATATCGTT CATAAGATGT CACGCCAGGA 840**  
**CATGAGCTAC ACATCGCACA TAGCATGCAG ATCAGGACGA TTTGTCACTC ACTTCAAACA 900**  
**CCTAAGAGCT TCTCTCTCAC AGCGCACACA CATATGCATG CAATATTTAC ACGTGATCGC 960**  
**CATGCAAATC TCCATTCTCA CCTATAAATT AGAGCCTCGG CTTCACTCTT TACTCAAACC 1020**  
**AAAACATC ACTACAGAAC ATACACAAAT GGCGAACAAG CTCTTCCTCG TCTCGGCAAC 1080**  
**TCTCGCCTTG TTCTTCCTTC TCACCAATGC CTCCGTCTAC AGGACGGTTG TGAAGTCGA 1140**  
**CGAAGATGAT GCCACAAATC CAGCCGGCCC ATTT 1174**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1174 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)



(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

TATCCTCCAC CCTCTTACCC ATATCTTATT GTAGTTACCG TCGTTGACGC CTAGTTCGTC	60
GAAAGTATAA TTCGTATGGT TTCGCATTCT ACCACCTACT TTGAGTTCTC TGAGAGGCGT	120
GGTGGCGGAA AGGTTCATGA GTACAGTTCC AACCAAAGAA ATCGAAACTT GTGTCTAAAC	180
CTAGAAAAAC AAAACAAAGG TATATGAATC CTGGACTCTC GAAAACCAAC TAAAAAATA	240
GTCTGTGTTA CCCGCTTCTT AGACATGTAA CGTAGTTATA CGATACCGTC CTGTCACACG	300
ACTATGTGTG AATTTCGTAGT ACACCTTTTCG GTTTCTGTTA ACCTCGCTCT GAGTCCCAGC	360
AGTATTATGG TTAGTTTCTG CATTTTGGTC TCGGTTGGAG AAACCAACTT ACATTACTTT	420
CCCTACACAG AACCATACAT ACATGCTTAT TGTTTTCTCT TCTACCTTAA TCATCATCTT	480
TTATAAACCC TCGAAAAATT CGGGAAGTTC ACACGAAAAA TAGAATAACT ATAGTAGGTA	540
AACGCAACAA ATTACGCAGA GATCTATACA AGGATATAGA AAGAGTCACA GACTATTCAC	600
TTTACTCTCT TTTGGTATGG TTTGGTTTTA TAAGTTTAGA ATAAAAATTA TTACAACTTA	660
GTGAGCCTCA ACGGTGGAAG ACACGGTTAA CACGACTTAG ATAGTGTGAT CTTTTTTTGT	720
AAAGAAGTTC CATTACTGAA CACCTGATAC AAGACTTAAG AGTAATTCAA AAATAAAGA	780
CTTCAAATTC AAAAATGGAA GACAAAACCT TATATAGCAA GTATTCTACA GTGCGGTCCT	840
GTACTCGATG TGTAGCGTGT ATCGTACGTC TAGTCTGCT AACAGTGAG TGAAGTTTGT	900
GGATTCTCGA AGAGAGAGTG TCGCGTGTGT GTATACGTAC GTTATAAATG TGCCTAGCG	960
GTACGTTTAG AGGTAAGAGT GGATATTTAA TCTCGGAGCC GAAGTGAGAA ATGAGTTTGG	1020
TTTTGAGTAG TGATGTCTTG TATGTGTTTA CCGCTTGTTT GAGAAGGAGC AGAGCCGTTG	1080
AGAGCGGAAC AAGAAGGAAG AGTGGTTACG GAGGCAGATG TCCTGCCAAC ACCTTCAGCT	1140
GCTTCTACTA CGGTGTGTTAG GTCGGCCGGG TAAA	1174

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1303 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

ACGCACTTAC CTAGAGCTTG CAACATCAGG CAAGTTAGCA TTTGCCCTT CCAGAAGACC 60  
 ATGCCTGGGC CCGGCTTCTA CTAGATTCCA AACGAATATC CTCGAGAGTG TGTATACCAC 120  
 GGTGATATGA GTGTGGTTGT TGATGTATGT TAACACTACA TAGTCATGGT GTGTGTTCCA 180  
 TAAATAATGT ACTAATGTAA TAAGAACTAC TCCGTAGACG GTAATAAAAG AGAAGTTTTT 240  
 TTTTTTACT CTTGCTACTT TCCTATAAAG TGATGATTAA CAACAGATAC ACCAAAAGA 300  
 AAACAATTAA TCTATATTCA CAATGAAGCA GTACTAGTCT ATTGAACATG TCAGATTTTC 360  
 TTTTCTAAA TGTCTAATTA AGCCTTCAAG GCTAGTGATG ATAAAAGATC ATCCAATGGG 420  
 ATCCAACAAA GACTCAAATC TGGTTTTGAT CAGATACTTC AAAACTATTT TTGTATTTCAT 480  
 TAAATTATGC AAGTGTCTT TTATTTGGTG AAGACTCTTT AGAAGCAAAG AACGACAAGC 540  
 AGTAATAAAA AAAACAAAGT TCAGTTTTAA GATTTGTTAT TGACTTATTG TCATTGAAA 600  
 AATATAGTAT GATATTAATA TAGTTTTATT TATATAATGC TTGTCTATTC AAGATTTGAG 660  
 AACATTAATA TGATACTGTC CACATATCCA ATATATTAAG TTTCAATTTCT GTTCAACAT 720  
 ATGATAAGAT GGTCAAATGA TTATGAGTTT TGTATTAC CTGAAGAAA GATAAGTGAG 780  
 CTTGAGTTT CTGAAGGTA CGTGATCTTC ATTTCTGGC TAAAAGCGAA TATGACATCA 840  
 CCTAGAGAAA GCCGATAATA GTAAACTCTG TTCTTGTTT TTGGTTTAAAT CAAACCGAAC 900  
 CGGTAGCTGA GTGTCAAGTC AGCAAACATC GCAAACCATA TGTC AATTCG TTAGATTCCC 960  
 GGTTTAAGTT GTAAACCGGT ATTTCAATTTG GTGAAAACCC TAGAAGCCAG CCACCTTTTT 1020  
 AATCTAATTT TTGCAAACGA GAAGTCACCA CACCTCTCCA CTAAAACCT GAACCTTACT 1080  
 GAGAGAAGCA GAGCAAAGA ACAAATAAAA CCCGAAGATG AGACCACCAC GTGCGGCGGG 1140  
 ACGTTCAGGG GACGGGAGG AAGAGAAATGC GCGGTTTGG TGGCGGCGGC GGACGTTTGG 1200  
 TGGCGGCGGT GGACGTTTTG GTGGCGGCGG TGGACCTTTG GTGGTGATA TCGTGACGAA 1260  
 GGACCTCCA GTGAAGTCAT TGGTTCGTTT ACTCTTTTCT TAG 1303

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1303 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

10 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

TGCGTGAATG GATCTCGAAC GTTGTAGTCC GTTCAATCGT AAACGGGGAA GGTCTTCTGG 60  
 TACGGACCCG GGCCGAAGAT GATCTAAGGT TTGCTTATAG GAGCTCTCAC ACATATGGTG 120  
 CCACTATACT CACACCAACA ACTACATACA ATTGTGATGT ATCAGTACCA CACACAAGGT 180  
 ATTTATTACA TGATTACATT ATTCTTGATG AGGCATCTGC CATTATTTTC TCTTCAAAAA 240  
 AAAAAAATGA GAACGATGAA AGGATATTTT ACTACTAATT GTTGTCTATG TGGTTTTTCT 300  
 TTTGTTAATT AGATATAAGT GTTACTTCGT CATGATCAGA TAACCTGTAC AGTCTAAAAG 360  
 AAAAAAGATTT ACAGATTAAT TCGGAAGTTC CGATCACTAC TATTTTCTAG TAGGTTACCC 420  
 TAGGTTGTTT CTGAGTTTAG ACCAAAATA GTCTATGAAG TTTTGATAAA AACATAAGTA 480  
 ATTTAATACG TTCACAAGAA AATAAACCAC TTCTGAGAAA TCTTCGTTTC TTGCTGTTTCG 540  
 TCATTATTTT TTTTGTTC AAGTCAAAATT CTAACAATA ACTGAATAAC AGTAAACTTT 600  
 TTATATCATA CTATAATTAT ATCAAATAA ATATATTACG AACAGATAAG TTCTAAACTC 660  
 TTGTAATTAT ACTATGACAG GTGTATAGGT TATATAATTC AAAGTAAAGA CAAGTTTGTA 720  
 TACTATTCTA CCAGTTTACT AATACTCAA ACAATAAATG GACTTCTTTT CTATTCACTC 780  
 GAAGCTCAA GACTTCCCAT GCACTAGAAG TAAAGAACCG ATTTTCGCTT ATACTGTAGT 840  
 GGATCTCTTT CGGCTATTAT CATTTGAGAC AAGAACCAA AACCAAATTA GTTTGGCTTG 900  
 GCCATCGACT CACAGTTCAG TCGTTTGTAG CGTTTGGTAT ACAGTTAAGC AATCTAAGGG 960  
 CCAAATTCAA CATTTGGCCA TAAAGTAAAC CACTTTTGGG ATCTTCGGTC GGTGGAAAAA 1020  
 TTAGATTA AACTTTTGCT CTTCAAGTGGT GTGGAGAGGT GATTTTGGGA CTGGAATGA 1080  
 CTCTCTTCGT CTCGTTTTCT TGTTTATTTT GGGCTTCTAC TCTGGTGGTG CACGCCGCC 1140  
 TGCAAGTCCC CTGCCCTCC TTCTCTTACG CCGCCAAACC ACCGCCGCCG CCTGCAAACC 1200  
 ACCGCCGCCA CCTGCAAAC CACCGCCGCC ACCTGGAAC CACCACCTAT AGCACTGCTT 1260  
 CCTGGAGGGT CACTTCAGTA ACCAAGCAA TGAGAAAAGA ATC 1303

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

10 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

AAGAAAAAA GCGGCCGCGA TTTACTGCTG CTTTTC 36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:13:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

AACATCAATG GCAGCAACTG CGGA 24

- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:14:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

20 GCCGGCTGGA TTTGTGGCAT CAT 23

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

CTAGATCTCC ATGGGTGTAT GTTCTGTAGT GATG 34

- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:16:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 40 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

TCAGGCCTGT CGACCTGCGG ATCAAGCAGC TTTCA 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 34 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

CTAGATCTGG TACCTAGATT CCAAACGAAA TCCT 34

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

20 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

AACATCAGGC AAGTTAGCAT TTGC 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 34 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

30 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

TCAGGCCTGT CGACGAGGTC CTTTCGTCAGC ATAT 34

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:20:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

AACGAACCAA TGACTTCACT GGGA 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

10 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

CCATGGGAGC TCGTCGACGA GGCCTTCGT CACGAT 36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:22:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

GAGCTCCCAT GGAGATCTGG TACCTAGATT CCAAAC 36

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 20 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

35 GACTATGTTC TGAATTCTCA 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 39 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CLASE DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

GACAAGATCT GCGGCCGCTA AAGAGTGAAG CCGAGGCTC 39

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:25:

15 GTCGACGAGG 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

AGATCTGGTA CC 12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1688 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CLASE DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

35 (iv) ANTI-SENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

TTTTTTTTTT TTTAATTAC AATGAGAATG AGATTACTG CTGCTTTTCC CCCTTACCCA 60  
 CCAAAGTATC ACAAATTAGA AGGTGTATAT ATTTAAAGAC ATGTAGATTG ATTGGATAGA 120  
 CACAAGCAAA ACTCTCCCCA GGGAAACCAGA ATAAGTCTAA ACATAGCAAG GAGACTGATG 180  
 CAACTCCAAT CGTTAACCAT TTCAAATCTT AGGTGCTTTC TGCTGGAACC TGGTTCACAA 240  
 CACCAAAGTT GTTCACAGGT TTGGGCCTCC ACTCAGTCCT GCCCCTCACA ATCTCAGCAC 300  
 CATTTTCCAG TCGAAGCAAA TGCTTGCACT CAACATGCCG GCTGTGAGCT AGATTGCCCA 360  
 TGTCGGCCCC AGATACAGCA GTCAGGGAAT CCAGCACACT GTCCCTACCA CACTCTCTCC 420  
 TATACTCTAA AGTCATGGAA GAAAGCTCAT GACTCTCCAA GATTGGCTGT GGAGCACTCT 480  
 CCAGAATCCA GCCAATGTAC TTCACATTGT TGACATGCTG ATTGATATCT AGATCACTCC 540  
 ACCTAGGACT TAAACCGGTA CGAATATAAT CCGCTGTGTT GTCGTCAAGT TTAGTCAGTT 600  
 TTCTGTTATC CTCTCCAGA ATTGGATCAG AATCCACAAA ATAAGATCCT ATCTCCTGTC 660  
 TGACTTCTTC TGGAATTTTA GACAGCCTCC GTGTTAGCTT ATTCATCATG ACCCAAACAC 720  
 TGGAAGCTCT TGTCAGATT TCACCAGTTT TGGAGTCACG TAAAAGCCAA TCACGACGCA 780  
 TACCATTCTT CCCTGATCCA GAAACCCAAG TGTCCACTTG AACTATGTCA CCCCATGTAG 840  
 GATAGCGTTC CACCACAACC TGCATCCGAG TAACCACCCA TATCAAGTTC TTTTGCACA 900  
 TTTCTGGCGT GGAACCAAAG CCATCACCAA GAAGCCCAGC ACTTTTAACA TGATTAAGTG 960  
 CAGTTTCTTG CAAATGGTTC ATTACTGTTT CTATAGATGC GGTACGATCA GCACCAATCT 1020  
 CATATGATCT AATAGAAAAG TTTTCACGGA ACACAAGACC ATCCTGAACA ATTTTTCCTA 1080  
 TCCCAAAGGG GTCAATAAGC ATGTCAGGTC GCCGTGGCTT CCAATCAAGC ATCATCCACT 1140  
 GCTTTTCAGC GGCCAAGAAA ATTGTTGTGA TAGCAGCAAG AAGCATGCTC CAATCAGGCA 1200  
 ACTGGTTGAT AAAAGTTCTG GGGGGAGGCG AAGGTAGATC ATCATCATGC TTGAAGCTTT 1260  
 CTTTAGATGT AACAACTGTG GTTCCATTAA TTTTCGAAGG GGCTTGCGCC TTTGCCTTCA 1320  
 AGCCACCAGA AGACGCAGAT TTGGATTTTA GTCCTCCAAG GTTTGCAGGC CCACCACCAA 1380  
 GTTTGCTGCC TGCTCCACCA GAGTCCGGCG AGGGTGAAGT AACAGGGAAA AATGATGAAG 1440  
 TAGCAGCTGT TGCCACCATA ATGAATTTCT AAGGTCGCTT CTCCGGTAGA ACGTCTAGTC 1500  
 TAGAAATGCA GAAAAGCGG GTTGGTCTT GTGTTATCTG AGGAGTTGGA TCTGACTGAG 1560  
 TGAAGAAGAA GAAGAAGATG GAGAGAGAGA GAAGGAGAAA AGCTGGAAC AGGGAAGAAG 1620  
 GGCIATGTG TCATTTTGCG TCCTTGTGT TCCCTAATT TTGGAAAAGA GAGAGACAGT 1680  
 GTAATTGT 1688

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1483 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico



(C) CLASE DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

5 (iv) ANTI-SENTIDO: SÍ

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:28:

```

TTTTTTTTTT TTTTTTTTAA AACCCCAAAA ATAAAATACA TTAAATAAT ATTAGGATAA    60
GAAAGTTATT TGCCTTTGTC TGGCACCCAA AAGAAAAAAT AAATATAATA AAAAGGGACC    120
TCCAAGAAGA AAAAAAATAA GAACCAAAGA AAATATACAA AGGTGGCCCA AACTGTTTTT    180
GAGTAGTGGT GGTGCAAGC AAGGTAGTAT AGTTTTACAA ACGAACCAAA GAACCCATGT    240
TTGCTATATT CTTTTACGG TGTGATGTCC CAAGTTGTTG TTGATGTTTT GGAAGTCCAC    300
TCTGTTCTTC CTCTACCAC TTCAGTCCA TCCTGGAGAC GGAGCAGATG CTGACATTCC    360
ACTTCACCAG CCGTCCCGAG GCTACCGATA TCGCAGCCCG AAACCGCGGT GAGGGACTGA    420
AGCACACTGT CCCTCCCGCA CTCCCTGCGA TACTCCAGAG TCATGCTTTT CAGCTTCTGA    480
CTCTCCATCA TCCCCACAGG TGCACCTCTC AGTATCCACC CGATGTACTT CACATTGTTA    540
ACGTGCTGGT TAACATCCAA GTCACCTCAA CGCGGAGTGA GACCAGAACG AACATAGTCA    600
GCAGTCTTGT CATCAAGTTT TGTTAACTTT CTGCTGTCCT CGGCAAGGAC TGGGTCAGAA    660
TTAACAAAGT AAGGCTCTAT CTCCCCTCGA ACCTCTTCAG GAATCTTTGA TAATCTTCTT    720
GTCAGTTTAT TCATCATCAC CCACACACTT GATGCTCTTG TTAAATTTTC TCCAGTATTG    780
CCATCTCGAA CTAGCCAATC ACGACGCATA CCGTTCTTTC CAGACTGGCT CACCCATGTA    840
TCTACTTCCA CAACATCTCC CCAAGTAGGA TATTTATCAA CGACAACCTG CATACGAGTA    900
ACAACCCAAA TCAAGTTCTT CTTAACCATC TCAGGAGTAG AACCAAACCC ATCTCCAAGC    960
AGTCCAGCAG TCTTAACATG GTTTAGTGCC GTTCTCTGTA AATGATTCAT AACCGTTTCT   1020
ATAGACGCAG AGCGATCAGC ACCTATCTCA TAAGACCGAA TAGAGAAATT CTGACGGAAC   1080
ACAAGCCCAT CCTGAACGAT CCTCCCTAAC CCAAACGGAT CCATAATCAC GTCAGAGCGC   1140
CTCGGTTTCC AGTCAAGCAT CATCCACTGC TTCTCAGCCG CCAAGAAGAC GGTTGTTATT   1200
GCAGCAAGAA GCATGCTCCA GTCAGGCAGC TGTTGATGA ACGTCCTCGG TGCTGCGGGA   1260
TGCTGTGAGG ACGTCTCGTT ATCAGGCTTC ACCGAGCCAG AAGGGAGACC GACTCTCTTG   1320
CCGTTGATCT TGGGTGGGGC CTGAGCGTTF GGTTTAACCT TCATCTGCCG GAGGAGTTTG   1380
GAGTGGGGAA GATGCCGGAG AAGTTGGTGG AGGTGGTGAC TTTGTTGGTT TTTGCGGTGG   1440
GGTCGAGTGG GGAAGATGGG AGAGGGAAGA ATGAGCTCGT GCC                        1483
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:29:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 324 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido  
 (C) CLASE DE CADENA: desconocida  
 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

5 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

```

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

Met Gln Val Val Val Asp Lys Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Val Val Glu  
 115 120 125

Val Asp Thr Trp Val Ser Gln Ser Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp  
 130 135 140

Trp Leu Val Arg Asp Gly Asn Thr Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ala Ser  
 145 150 155 160

Ser Val Trp Val Met Met Asn Lys Leu Thr Arg Arg Leu Ser Lys Ile  
 165 170 175

Pro Glu Glu Val Arg Gly Glu Ile Glu Pro Tyr Phe Val Asn Ser Asp  
 180 185 190

Pro Val Leu Ala Glu Asp Ser Arg Lys Leu Thr Lys Leu Asp Asp Lys  
 195 200 205

Thr Ala Asp Tyr Val Arg Ser Gly Leu Thr Pro Arg Trp Ser Asp Leu  
 210 215 220

Asp Val Asn Gln His Val Asn Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu  
 225 230 235 240

Glu Ser Ala Pro Val Gly Met Met Glu Ser Gln Lys Leu Lys Ser Met  
 245 250 255

Thr Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Gln Ser  
 260 265 270

Leu Thr Ala Val Ser Gly Cys Asp Ile Gly Ser Leu Gly Thr Ala Gly  
 275 280 285

Glu Val Glu Cys Gln His Leu Leu Arg Leu Gln Asp Gly Ala Glu Val  
 290 295 300

Val Arg Gly Arg Thr Glu Trp Ser Ser Lys Thr Ser Thr Thr Thr Trp  
 305 310 315 320

**Asp Ile Thr Pro**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 324 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:30:

Leu Leu Ala Ala Ile Thr Thr Ile Phe Leu Ala Ala Glu Lys Gln Trp  
 1 5 10 15

ES 2 533 860 T3

Met Met Leu Asp Trp Lys Pro Arg Arg Pro Asp Met Leu Ile Asp Pro  
 20 25 30

Phe Gly Ile Gly Lys Ile Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Glu Asn  
 35 40 45

Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Thr Ala Ser Ile  
 50 55 60

Glu Thr Val Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala Leu Asn His Val Lys  
 65 70 75 80

Ser Ala Gly Leu Leu Gly Asp Gly Phe Gly Ser Thr Pro Glu Met Cys  
 85 90 95

Lys Lys Asn Leu Ile Trp Val Val Thr Arg Met Gln Val Val Val Glu  
 100 105 110

Arg Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Ile Val Gln Val Asp Thr Trp Val Ser  
 115 120 125

Gly Ser Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp Leu Leu Arg Asp Ser  
 130 135 140

Lys Thr Gly Glu Ile Leu Thr Arg Ala Ser Ser Val Trp Val Met Met  
 145 150 155 160

Asn Lys Leu Thr Arg Arg Leu Ser Lys Ile Pro Glu Glu Val Arg Gln  
 165 170 175

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

Asn Arg Lys Leu Thr Lys Leu Asp Asp Asn Thr Ala Asp Tyr Ile Arg  
 195 200 205

Thr Gly Leu Ser Pro Arg Trp Ser Asp Leu Asp Ile Asn Gln His Val  
 210 215 220

Asn Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu Ser Ala Pro Gln Pro  
 225 230 235 240

Ile Leu Glu Ser His Glu Leu Ser Ser Met Thr Leu Glu Tyr Arg Arg  
 245 250 255

Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Asp Ser Leu Thr Ala Val Ser Gly  
 260 265 270

Ala Asp Met Gly Asn Leu Ala His Ser Gly His Val Glu Cys Lys His  
 275 280 285

Leu Leu Arg Leu Glu Asn Gly Ala Glu Ile Val Arg Gly Arg Thr Glu  
 290 295 300

Trp Arg Pro Lys Pro Val Asn Asn Phe Gly Val Val Asn Gln Val Pro  
 305 310 315 320

Ala Glu Ser Thr

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1674 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:31:

```

GCACGAGCTC GTGCCGAATT CGGCACGAGC GGCACGAGGA AAATACAGAG AGACAAATTT      60
AAAACAAAAC GAAAGGAGAT CGAGAGAGGA GAGAGGCGCA CACACACACA CACAAAGGAG      120
AACTTTAGGG TTTGGGGAGA CTCCGAAGAG ATTGGCGTAA CACTTCTGTC TTTGAACGCT      180
TATCTTCTCT GTCATGGTGG CTACTTGCGC TACGTCGTCG TTTTTCATG TTCCATCTTC      240
TTCTCGCTT GATACGAATG GGAAGGGGAA CAGAGTTGGG TCCACTAATT TTGCTGGACT      300
TAACTCAACG CCAAGCTCTG GGAGGATGAA GGTAAAGCCA AACGCTCAGG CTCCACCCAA      360
GATCAACGGG AAGAAAGCTA ACTTGCCTGG CTCTGTAGAG ATATCAAAGG CTGACAACGA      420
GACTTCGCAG CCCGCACACG CACCGAGGAC GTTATCAAC CAGCTGCCTG ACTGGAGTAT      480
GCTGCTTGCT GCTATAACTA CCATTTTCTT GGCAGCGGAG AAACAGTGA TGATGCTTGA      540
CTGGAAACCG AGGCGTTCTG ATATGATTAT GGATCCTTTT GGTTAGGGA GAATGTTC      600
GGATGGTCTT GTGTTCCGTC AGAATTTTTC CATTAGGTCT TATGAAATAG GTGCTGATCG      660
CTCTGCGTCT ATAGAACTG TCATGAATCA TTTACAGGAA ACGGCGCTTA ATCATGTGAA      720
GTCTGCCGGA CTGCTGAAA ATGGGTTTGG GTCCACTCCT GAGATGTTTA AGAAGAATTT      780
GATATGGGTC GTTGCTCGTA TGCAGGTTGT CGTTGATAAA TATCCTACTT GGGGAGATGT      840
TGTGGAAGTG GATACTGGG TTAGTCAGTC TGGAAAGAAT GGTATGCGTC GTGATTGGCT      900
AGTTCGGGAT TGCAATACTG GAGAAATTGT AACGCGAGCA TCAAGTTTGT GGGTGATGAT      960
GAATAAATC ACAAGGAGAT TGTCAAAGAT TCCTGAAGAG GTTCGAGGGG AAATAGAGCC     1020
TTATTTTGTG AACTCTGATC CTGTCATTGC CGAAGACAGC AGAAAGTTAA CAAAATTGA     1080
TGACAAGACT GCTGACTATG TTCGTTCTGG TCTCACTCCG AGGTGGAGTG ACTTGGATGT     1140
TAACCAGCAT GTTAACAATG TAAAGTACAT TGGGTGGATA CTGGAGAGTG CTCCAGCAGG     1200
    
```

GATGCTGGAG AGTCAGAAGC TGAAAAGCAT GACTCTGGAG TATCGCAGGG AGTGCGGGAG 1260  
 AGACAGTGTG CTTCAGTCTC TCACCGCAGT CTCTGGATGT GATGTCGGTA ACCTCGGGAC 1320  
 AGCCGGGGAA GTGGAGTGTG AGCATTGCT TCGACTCCAG GATGGAGCTG AAGTGGTGAG 1380  
 AGGAAGAACA GAGTGGAGCT CCAAGACAGG AGCAACAAC TGGGACACTA CTACATCGTA 1440  
 AACATTGGTC CTTTGGTTCC TTTGTAAAAC TGTACCTGCT GCTACCTTCT TGCAACCACC 1500  
 ACCTTTGTAT ATTTCTTCTT TTTTGTITTT TATTTTGCTT CAATGGAGAT ATATTATTAT 1560  
 TTATTTAATC TTTCTATTTT TTTTGTITTC TTATGGGAAA TGGGTGTATT ATGTGATATA 1620  
 TTATTGTAAC CCCATGTGCC AGGGCAAGGC AATAACTTTC TTATCAAAAA AAAA 1674

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 415 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

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

ES 2 533 860 T3

Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Ser Ala Ser Ile  
 145 150 155 160  
 Glu Thr Val Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala Leu Asn His Val Lys  
 165 170 175  
 Ser Ala Gly Leu Leu Glu Asn Gly Phe Gly Ser Thr Pro Glu Met Phe  
 180 185 190  
 Lys Lys Asn Leu Ile Trp Val Val Ala Arg Met Gln Val Val Val Asp  
 195 200 205  
 Lys Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Val Val Glu Val Asp Thr Trp Val Ser  
 210 215 220  
 Gln Ser Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp Leu Val Arg Asp Cys  
 225 230 235 240  
 Asn Thr Gly Glu Ile Val Thr Arg Ala Ser Ser Leu Trp Val Met Met  
 245 250 255  
 Asn Lys Leu Thr Arg Arg Leu Ser Lys Ile Pro Glu Glu Val Arg Gly  
 260 265 270  
 Glu Ile Glu Pro Tyr Phe Val Asn Ser Asp Pro Val Ile Ala Glu Asp  
 275 280 285  
 Ser Arg Lys Leu Thr Lys Leu Asp Asp Lys Thr Ala Asp Tyr Val Arg  
 290 295 300  
 Ser Gly Leu Thr Pro Arg Trp Ser Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val  
 305 310 315 320  
 Asn Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu Ser Ala Pro Ala Gly  
 325 330 335  
 Met Leu Glu Ser Gln Lys Leu Lys Ser Met Thr Leu Glu Tyr Arg Arg  
 340 345 350  
 Glu Cys Gly Arg Asp Ser Val Leu Gln Ser Leu Thr Ala Val Ser Gly  
 355 360 365  
 Cys Asp Val Gly Asn Leu Gly Thr Ala Gly Glu Val Glu Cys Gln His  
 370 375 380  
 Leu Leu Arg Leu Gln Asp Gly Ala Glu Val Val Arg Gly Arg Thr Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Ser Ser Lys Thr Gly Ala Thr Thr Trp Asp Thr Thr Thr Ser  
 405 410 415

## REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una palmitoil-ACP tioesterasa de plantas en donde (i) dicha secuencia exhibe más de 90% de identidad global con la secuencia de DNA que codifica la proteína funcional madura codificada por los nucleótidos 506 a 1477 de SEQ ID NO: 1 y en donde (ii) dicha tioesterasa codificada cataliza la hidrólisis de palmitoil-, estearoil- y oleoil-ACP tioésteres, con escisión hidrolítica del enlace tioéster carbono-azufre en el grupo prostético pantoteno de la proteína portadora de palmitoil-acilo como su reacción preferida.
2. Un fragmento de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de nucleótidos se define por los nucleótidos 1 a 1688 de SEQ ID NO: 1 y codifica la palmitoil-ACP tioesterasa de la semilla de soja.
3. Un fragmento de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha secuencia de nucleótidos está definida por los nucleótidos 506 a 1477 de SEQ ID NO: 1 y codifica la palmitoil-ACP tioesterasa de la semilla de soja catalíticamente activa.
4. Un gen quimérico capaz de transformar una célula de planta de una especie productora de aceite que comprende el fragmento de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 enlazado operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación antisentido, que producen inhibición antisentido de la palmitoil-ACP tioesterasa de semillas, en donde dicha inhibición da como resultado niveles inferiores de ácidos grasos saturados.
5. Un gen quimérico capaz de transformar una célula de planta de una especie productora de aceite que comprende el fragmento de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 enlazado operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación de sentido, produciendo elevación de sentido o cosupresión de la palmitoil-ACP tioesterasa de semillas en donde dicha inhibición da como resultado niveles inferiores de ácidos grasos saturados.
6. Un gen quimérico de la reivindicación 4 en donde dicho fragmento de ácido nucleico es el fragmento de ácido nucleico de la reivindicación 2, enlazado operativamente a una secuencia reguladora adecuada, en orientación de sentido, produciendo inhibición antisentido de la palmitoil-ACP tioesterasa de semillas.
7. Un gen quimérico de la reivindicación 5 en donde dicho fragmento de ácido nucleico es el fragmento de ácido nucleico de la reivindicación 2, enlazado operativamente a una secuencia reguladora adecuada, en orientación de sentido, produciendo elevación de sentido o cosupresión de la palmitoil-ACP tioesterasa de semillas.
8. El gen quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en donde dicha célula de planta de una especie productora de aceite se selecciona del grupo constituido por soja, colza, girasol, algodón, cacao, cacahuete, cártamo, y maíz.
9. Una célula de planta transformada con el gen quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
10. La célula de planta, como se describe en la reivindicación 9, en donde la célula de planta se selecciona del grupo constituido por soja, colza, girasol, algodón, cacao, cacahuete, cártamo, y maíz.
11. Un método de producción de aceite de semillas de plantas que contiene niveles inferiores de los ácidos palmítico y esteárico, que comprende:
  - (a) transformar una célula de planta con un gen quimérico seleccionado de
    - (i) el gen quimérico de la reivindicación 4 ó 6,
    - (ii) un gen quimérico que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica una palmitoil-ACP tioesterasa de plantas como se define en la reivindicación 1, 2 ó 3 para producir inhibición antisentido de la palmitoil-ACP tioesterasa de semillas, estando dicha parte enlazada operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación antisentido.
    - (iii) un gen quimérico de la reivindicación 5 ó 7 en donde dicho gen quimérico produce cosupresión de palmitoil-ACP tioesterasa de semillas o
    - (iv) un gen quimérico que comprende una parte de la secuencia de nucleótidos que codifica una palmitoil-ACP tioesterasa de plantas como se define en la reivindicación 1, 2 ó 3 para producir cosupresión de la palmitoil-ACP tioesterasa de semillas, estando dicha parte enlazada operativamente a secuencias reguladoras adecuadas, en orientación de sentido,
  - (b) dejar crecer plantas fértiles a partir de dichas células de plantas transformadas,
  - (c) someter a cribado semillas de la progenie de dichas plantas fértiles respecto a los niveles deseados de ácidos palmítico y esteárico, y



(d) triturar dichas semillas de la progenie para obtener dicho aceite de semillas de la planta que contiene niveles inferiores de ácidos palmítico y esteárico.

12. Un método de producción de aceites a partir de semillas de plantas, que contienen niveles superiores de ácidos palmítico y esteárico, que comprende:

5 (a) transformar una célula de planta de una especie productora de aceite con un gen quimérico de la reivindicación 5 ó 7, en donde dicho gen quimérico produce aumento de la palmitoil-ACP tioesterasa de plantas,

(b) dejar crecer plantas fértiles y sexualmente maduras a partir de dichas células de plantas transformadas de una especie productora de aceite,

10 (c) someter a cribado semillas de la progenie de dichas plantas fértiles respecto a los niveles deseados de ácidos palmítico y esteárico, y

(d) triturar dichas semillas de la progenie para obtener dicho aceite que contiene niveles superiores de los ácidos palmítico y esteárico.

13. El método de la reivindicación 11 en donde dicha planta es soja y dicho gen quimérico es el gen quimérico de la reivindicación 6.

15 14. El método de la reivindicación 12 en donde dicha planta es soja y dicho gen quimérico es el gen quimérico de la reivindicación 7.

15. El método de la reivindicación 11 ó la reivindicación 12, en donde dicha célula de planta de una especie productora de aceite se selecciona del grupo constituido por soja, colza, girasol, algodón, cacao, cacahuete, cártamo, y maíz.

20 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde dicho paso de transformación se realiza por un proceso seleccionado del grupo constituido por infección con *Agrobacterium*, electroporación, y bombardeo balístico a alta velocidad.

17. Un fragmento de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, en donde dicha palmitoil-ACP tioesterasa de planta codificada es una acil-ACP tioesterasa conforme a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

25 18. Uso del fragmento de ácido nucleico de la reivindicación 1 o una parte de la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1 y como se define en la reivindicación 11, para reducir el nivel de palmitoil-ACP tioesterasa en una planta transgénica que contiene un gen endógeno que tiene más de 90% de identidad global con la región codificante de dicho fragmento.