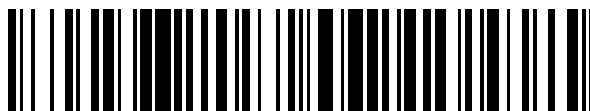


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 803**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011 E 11799019 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2585600**

54 Título: **Reducción del contenido de ácidos grasos saturados en semillas de plantas**

30 Prioridad:

24.06.2010 US 358314 P

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

04.05.2016

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268, US**

72 Inventor/es:

**MERLO, ANN OWENS;
GACHOTTE, DANIEL J;
THOMPSON, MARK A.;
WALSH, TERENCE A. y
BEVAN, SCOTT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 568 803 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

Reducción del contenido de ácidos grasos saturados en semillas de plantas

Campo técnico

5 Algunas formas de realización se refieren en general a ciertas enzimas delta-9 desaturasas, a los ácidos nucleicos que codifican estas enzimas, y a los métodos de expresar las mismas en una célula vegetal. Algunas formas de realización se refieren a la utilización de la actividad de ciertas enzimas delta-9 desaturasas para disminuir la composición porcentual de ácidos grasos saturados en materiales de plantas (por ejemplo, semillas) y aumentar la composición porcentual de ácidos grasos ω -7. También se describe en este documento plantas y materiales de plantas producidos por métodos en formas de realización particulares.⁷

10 Antecedentes de la invención

15 Los aceites derivados de vegetales han sustituido gradualmente a los aceites y grasas de origen animal como la principal fuente de ingesta de grasas en la dieta. Sin embargo la ingesta de grasas saturadas en los países más industrializados se ha mantenido en alrededor del 15% al 20% del consumo total de calorías. En sus esfuerzos para promover estilos de vida más saludables, el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha recomendado recientemente que las grasas saturadas sean menos del 10% de la ingesta calórica diaria. Para facilitar la concienciación del consumidor, las directrices de etiquetado actuales emitidas por el USDA requieren ahora que los niveles de ácidos grasos saturados totales sean inferiores a 1,0 gramos por 14 gramos de ingesta para recibir la etiqueta de "bajo-sat" y menos de 0,5 g por 14 gramos de ingesta para recibir la etiqueta "no-sat". Esto significa que el contenido de ácidos grasos saturados de aceites vegetales debe de ser menor del 7% y del 3,5% para recibir la etiqueta "bajo-sat" o "no-sat", respectivamente. Desde la emisión de estas directrices, se ha producido un aumento de la demanda de los consumidores por los aceites "bajo-sat" y "no-sat". Hasta la fecha, esta demanda se ha satisfecho principalmente con aceite de canola, y en un grado mucho menor con aceites de girasol y cártamo.

25 Mientras que las grasas insaturadas (monoinsaturadas y poliinsaturadas) son beneficiosas (especialmente cuando se consumen con moderación), las grasas saturadas y trans no lo son. Las grasas saturadas y las grasas trans elevan los niveles de colesterol LDL indeseable en la sangre. El colesterol de la dieta también eleva el colesterol LDL y puede contribuir a enfermedades cardíacas incluso sin elevar el LDL. Por tanto, es recomendable elegir alimentos bajos en grasas saturadas, grasas trans y colesterol como parte de una dieta saludable.

30 Las características de los aceites, tanto de origen vegetal como animal, están determinadas predominantemente por el número de átomos de carbono e hidrógeno en la molécula de aceite, así como el número y posición de los dobles enlaces comprendidos en la cadena del ácido graso. La mayoría de los aceites derivados de las plantas están compuestos de cantidades variables de los ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3). Convencionalmente, los ácidos palmítico y esteárico se designan como "saturados", porque sus cadenas de carbono están saturadas con átomos de hidrógeno, y por lo tanto no tienen dobles enlaces; contienen el número máximo de átomos de hidrógeno posibles. Sin embargo, los ácidos oleico, linoleico, y linolénico son cadenas de ácidos grasos de 18 carbonos que tienen uno, dos, y tres dobles enlaces, respectivamente, en la cadena. El ácido oleico se considera típicamente un ácido graso monoinsaturado, mientras que el ácido linoleico y linolénico se consideran ácidos grasos poliinsaturados. La definición del USDA de productos de aceite "no sat" como aquellos que tienen menos de 3,5% de contenido de ácidos grasos se calcula como el contenido de ácido graso saturado combinado contenido en peso (comparado con la cantidad total de ácidos grasos).

40 El aceite de canola tiene el nivel más bajo de ácidos grasos saturados de todos los aceites vegetales. "Canola" se refiere a la colza (*Brassica*) que tiene un contenido de ácido erúxico (C22:1) de a lo sumo 2% en peso, basado en el contenido de ácido graso total de la semilla (preferiblemente a lo sumo 0,5% en peso, y lo más preferiblemente esencialmente 0% en peso), y que produce, después de la molienda, una pasta secada al aire que contiene menos de 30 μ mol/g de pasta desgrasada (libre de aceite). Estos tipos de colza se distinguen por su calidad como comestibles en comparación con las variedades más tradicionales de la especie.

50 Se postula que, en semillas de plantas oleaginosas, la síntesis de ácidos grasos se produce principalmente en los plástidos. El producto principal de la síntesis de ácidos grasos es palmitato (16:0), que parece ser alargado de manera eficiente a estearato 18:0). Mientras que están aún en el plástido, los ácidos grasos saturados a continuación se pueden desaturar por una enzima conocida como acil-ACP delta-9 desaturasa, que introduce uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Específicamente, el estearato se puede desaturar rápidamente mediante una enzima delta-9 desaturada plastidial para producir oleato (18:1). De hecho, el palmitato también se puede desaturar a palmitoleato (16:1) por la delta-9 desaturasa del plástido, pero este ácido graso aparece sólo en cantidades traza (0-0,2%) en la mayoría de los aceites vegetales. Por lo tanto, los principales productos de la síntesis de ácidos grasos en el plástido son palmitato, estearato y oleato. En la mayoría de los aceites, el oleato es el principal ácido graso sintetizado, ya que los ácidos grasos saturados están presentes en proporciones mucho más bajas.

55 Los ácidos grasos sintetizados recientemente se exportan fuera del plástido al citoplasma. La desaturación subsiguiente de los ácidos grasos de las plantas en el citoplasma parece estar limitada al oleato, que se puede desaturar a linoleato (18:2) y linolenato (18:3) por desaturasas del microsoma que actúan sobre sustratos de oleoil o

lineoleoil esterificados por la fosfatidilcolina (PC). Además dependiendo de la planta, el oleato se puede modificar adicionalmente por alargamientos (a 20:1, 22:1, y/o 24:1), o por la adición de grupos funcionales. Estos ácidos grasos, junto con los ácidos grasos saturados, palmitato y estearato, se ensamblan después en triglicéridos en las membranas endorreticulares.

5 La enzima acil-ACP delta-9 desaturasa de las plantas es soluble. Está localizada en el estroma del plástido, y usa ácidos grasos sintetizados recientemente esterificados por ACP, predominantemente estearil-ACP, como sustratos. Esto es, diferente a las otras enzimas delta-9 desaturasas, que están localizadas en la membrana reticular endoplasmática (ER, o microsómica), usan ácidos grasos esterificados por Co-A como sustratos, y desaturan ambos ácidos grasos saturados, palmitato y estearato. Los documentos de patente de los Estados Unidos 5.723.595
10 y 6.706.950 se refieren a una desaturasa de una planta.

El gen de la delta-9 desaturasa de levadura se ha aislado de *Saccharomyces cerevisiae*, se ha clonado, y se ha secuenciado. Stukey *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264:16537-44; Stukey *et al.* (1990) J. Biol. Chem. 265:20144-9. Este gen de la levadura se ha introducido en el tejido de la hoja de tabaco (Polashok *et al.* (1991) FASEB J. 5:A1157; Polashok *et al.* (1992) Plant Physiol. 100:894-901), y al parecer se expresó en este tejido. Además, este gen de la levadura se ha expresado en el tomate. Véase Wang *et al.* (1996) J. Agric. Food Chem. 44:3399-402; y Wang *et al.* (2001) Phytochemistry 58:227-32. Si bien se informaron de algunos incrementos en ciertos ácidos grasos insaturados, de algunas disminuciones en ciertos ácidos grasos saturados, tanto para el tabaco como el tomate usando este gen de la delta-9 desaturasa de levadura, el tabaco y el tomate no son claramente cultivos de aceite. Este gen de levadura se introdujo también en *Brassica napus*. Documento de patente de Estados Unidos
15 5.777.201.

Una acil-CoA delta-9 desaturasa fúngica diferente de *Aspergillus nidulans* se ha introducido en canola, consiguiendo de esta manera concentraciones de ácidos grasos saturados reducidas en el aceite de las semillas. Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos US 2008/0260933 A1. La acil-CoA delta-9 desaturasa de *A. nidulans* proporcionó una mayor reducción de estearatos (61-90%) que de los ácidos grasos más abundantes de palmitato (36-49%) en el aceite de las semillas.
20

Descripción de la invención

Se divulga en este documento una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO:12, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótido que es al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, y SEQ ID NO:15.
30

También se divulgan métodos de expresión de al menos uno de los ácidos nucleicos y/o polipéptidos mencionados anteriormente en una célula vegetal. Formas de realización particulares se aprovechan de la actividad de una enzima delta-9 desaturasa, de manera que la composición por ciento de ácidos grasos saturados pueda disminuirse en una planta, material de la planta (*por ejemplo*, las semillas), y/o partes de la planta que comprenden las células de la planta, y/o un producto vegetal de los productos básicos producidos a partir de cualquiera de los anteriores. En ciertas formas de realización, los ácidos grasos ω -7 concomitantemente pueden ser aumentados en la planta, material vegetal, parte de la planta, y/o producto vegetal de productos básicos.
35

Algunas formas de realización incluyen un método para reducir la cantidad de ácidos grasos saturados en una planta, material de la planta, parte de la planta, y/o producto vegetal de productos básicos, el método comprende transformar una célula de una planta con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima delta-9 desaturasa de la invención, de manera que la cantidad de ácidos grasos saturados en la célula se reduzca. Algunas formas de realización incluyen un método para crear una planta genéticamente modificada que comprende reducir la cantidad de ácidos grasos saturados en la planta en comparación con una planta de tipo silvestre de la misma especie. Dicho método puede comprender la transformación de un material de la planta (o célula de la planta) con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima delta-9 desaturasa de la invención, y cultivar el material de la planta transformado (o célula de la planta) para obtener una planta. En ejemplos particulares, una célula de la planta y/o material de la planta de una especie de *Arabidopsis* puede ser transformado con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido delta-9 desaturasa de la invención.
40
45

Lo anterior y otras características se harán más aparentes a partir de la descripción detallada siguiente de varias formas de realización, que procede con referencia a las figuras adjuntas.
50

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 incluye un análisis filogenético esquemático de varias secuencias de proteína desaturasa de hongos. Las secuencias de proteína completas de las desaturasas descritas fueron alineadas usando ClustalX y se muestran usando MEGA.

55 Las Figs. 2(a-d) incluyen una alineación de secuencias de genes de delta-9 desaturasa de hongos. Las letras mayúsculas representan los nucleótidos conservados en esta alineación. La parte en sombra representa nucleótidos idénticos en esta alineación.

Las Figs. 3(a-b) incluyen una alineación de secuencias de polipéptidos de delta-9 desaturasa de hongos.

Las Figs. 4-18 incluyen mapas de plásmidos de ejemplo que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican delta-9 desaturasas de hongos que pueden ser útiles en algunas formas de realización. La Fig. 4 incluye específicamente mapas de plásmidos de ejemplo que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican LnD9DS-2 (Fig. 4a; pDAB110110) y que codifican HzD9DS (Fig. 4b; pDAB110112) que además comprenden la 5' UTR de PvPhas y 3' UTR de PvPhas.

La Fig. 19 incluye datos que muestran el contenido total de ácidos grasos saturados (%FAMES) de unos ejemplos de semillas *T₂ de Arabidopsis* a partir de plantas transformadas con ciertas secuencias de genes de delta-9 desaturasa de hongos de ejemplo.

La Fig. 20 incluye datos que muestran el contenido de ácido palmítico (C16:0) (%FAMES) de unos ejemplos de semillas *T₂ de Arabidopsis* a partir de plantas transformadas con ciertas secuencias de genes de delta-9 desaturasa de hongos de ejemplo.

La Fig. 21 incluye datos que muestran el contenido de ácido esteárico (C18:0) (%FAMES) de unos ejemplos de semillas *T₂ de Arabidopsis* a partir de plantas transformadas con ciertas secuencias de genes de delta-9 desaturasa de hongos de ejemplo.

La Fig. 22 incluye datos que muestran el contenido de ácido palmitoleico (C16:1) (%FAMES) de unos ejemplos de semillas *T₂ de Arabidopsis* a partir de plantas transformadas con ciertas secuencias de genes de delta-9 desaturasa de hongos de ejemplo.

La Fig. 23 incluye una representación gráfica de la acumulación de las transcripciones de ARNm de HzD9DS y LnD9DS-2 (en relación a las transcripciones de AnD9DS) en semillas en desarrollo de plantas de canola transformadas con pDAB7319 (AnD9DS v3 y LnD9DS-2 v2) o pDAB7324 (AnD9DS v3 y HzD9DS v2). El qRT-PCR $\Delta\Delta Ct$ de cada gen se determinó en relación con el nivel de transcripción de actina, y la cantidad de transcripción para HzD9DS y LnD9DS-2 se normalizó entonces al nivel de transcripción de AnD9DS en cada muestra.

Listado de secuencias

Las secuencias de ácidos nucleicos que figuran en la secuencia de acompañamiento se muestran usando las abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos, como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Sólo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero la cadena complementaria se entiende que está incluida mediante cualquier referencia a la hebra mostrada. En la lista de secuencias adjunta:

SEQ ID NO:1 muestra un cebador directo usado para amplificar por PCR un fragmento de un gen de acil-coA delta-9 desaturasa de *Magnaporthe grisea* (referido en algunos lugares como MgD9DS).

SEQ ID NO:2 muestra un cebador inverso usado para amplificar por PCR un fragmento de un gen de acil-CoA delta-9 desaturasa de *M. grisea* (referido en algunos lugares como MgD9DS).

SEQ ID NO:3 muestra un fragmento a modo de ejemplo de un gen de acil-coA delta-9 desaturasa de *M. grisea* (referido en algunos lugares como MgD9DS) que fue amplificado por PCR.

SEQ ID NO:4 muestra un clon MgD9DS sin intrón a modo de ejemplo.

SEQ ID NO:5 muestra una secuencia de ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica una primera acil-CoA delta-9 desaturasa de *Leptosphaeria nodorum*, se le refiere en algunos lugares como LnD9DS-1.

SEQ ID NOs:6 y 7 muestran secuencias de cebadores que pueden ser útiles en algunas formas de realización.

SEQ ID NO:8 muestra una secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda acil-CoA delta-9 desaturasa de ejemplo, de *L. nodorum*, se le refiere en algunos lugares como LnD9DS-2.

SEQ ID NO:9 muestra una región de codificación de un ejemplar nativo de un gen delta-9 desaturasa de *M. grisea* (etiquetado como MgD9DS v1).

SEQ ID NO:10 muestra una región de codificación de un ejemplar nativo de un gen delta-9 desaturasa de *Helicoverpa zea* (etiquetado como HzD9DS v1).

SEQ ID NO:11 muestra una región de codificación de un ejemplar nativo de un gen delta-9 desaturasa (LnD9DS-2 v1) de *L. nodorum*.

SEQ ID NO:12 muestra la secuencia de aminoácidos de un ejemplar de delta-9 desaturasa nativa de *M. grisea* (MgD9DS).

SEQ ID NO:13 muestra la secuencia de aminoácidos de un ejemplar de delta-9 desaturasa nativa de *H. zea* (HzD9DS).

- SEQ ID NO:14 muestra la secuencia de aminoácidos de una delta-9 desaturasa nativa de *L. nodorum* (LnD9DS-2) a modo de ejemplo.
- SEQ ID NO:15 muestra la secuencia de un gen delta-9 desaturasa de canola optimizado de *M. grisea* (MgD9DS v2) a modo de ejemplo.
- 5 SEQ ID NO:16 muestra la secuencia de un gen delta-9 desaturasa de canola optimizado de *H. zea* (HzD9DS v2) a modo de ejemplo.
- SEQ ID NO:17 muestra la secuencia de un gen delta-9 desaturasa de canola optimizado de *L. nodorum* (LnD9DS-2 v2) a modo de ejemplo.
- 10 SEQ ID NOs:18-39 muestran la secuencia de cebadores y sondas que pueden ser útiles en algunas formas de realización.
- SEQ ID NOs:40-43 muestra secuencias de Kozak alternativas a modo de ejemplo que pueden usarse para aumentar la expresión en algunas formas de realización.
- SEQ ID NO:44 muestra la secuencia de un ejemplo adicional de un gen delta-9 desaturasa de canola optimizado de *L. nodorum* (LnD9DS-2 v3).
- 15 SEQ ID NO:45 muestra la secuencia de un ejemplo adicional de un gen delta-9 desaturasa de canola optimizado de *H. zea* (HzD9DS v3).
- SEQ ID NO:46 muestra la secuencia de aminoácidos de una etiqueta Myc.
- SEQ ID NO:47 muestra la secuencia de aminoácidos de una etiqueta HA .
- SEQ ID NO:48 muestra una secuencia a modo de ejemplo de ácido nucleico que codifica una delta-9 desaturasa de *Aspergillus nidulans*, referido en algunos sitios como AnD9DS v2.
- 20 SEQ ID NO:49 muestra una segunda secuencia a modo de ejemplo de ácido nucleico que codifica una delta-9-desaturasa de *A. nidulans*, referida en algunos sitios como AnD9DS v3.
- SEQ ID NO:50 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por ácidos nucleicos como se ejemplifica por las SEQ ID NOs:48-49 (AnD9DS).
- 25 SEQ ID NO:51 muestra la secuencia de aminoácidos de otra desaturasa AnD9DS a modo de ejemplo.
- SEQ ID NO:52 muestra la secuencia de aminoácidos de una delta-9 desaturasa nativa (ScOLE1) de *Saccharomyces cerevisiae* a modo de ejemplo.
- SEQ ID NOs:53-66 muestran plásmidos que pueden ser útiles en algunas formas de realización.
- SEQ ID NOs:67-71 incluyen varios elementos de control de regulación de ácidos nucleicos que pueden ser útiles en algunas formas de realización.
- 30 SEQ ID NO:72 muestra los 68 residuos N-terminales (1-68) de una desaturasa AnD9DS a modo de ejemplo.
- SEQ ID NO:73 muestra los 175 residuos C-terminales (281-455) de una desaturasa AnD9DS a modo de ejemplo.
- SEQ ID NO:74 muestra un mapa del plásmido pDAB110110.
- SEQ ID NO:75 muestra un mapa del plásmido pDAB110112.
- 35 SEQ ID NO:76 muestra una secuencia a modo de ejemplo de ácido nucleico que codifica una acil-CoA delta-9 desaturasa de *M. grisea*, referida en algunos sitios como MgD9DS.
- SEQ ID NO:77 muestra una secuencia de aminoácidos comprendida dentro de la delta-9 desaturasa nativa de ejemplo de *L. nodorum* de la SEQ ID NO:14.
- SEQ ID NO:78 muestra una secuencia de aminoácidos comprendida dentro de la delta-9 desaturasa nativa de ejemplo de *H. zea* de la SEQ ID NO:13.
- 40 Modo(s) de llevar a cabo la invención

I. Descripción general de varias formas de realización

- Previamente hemos introducido una acil-CoA delta-9 desaturasa fúngica de *Aspergillus nidulans* en canola, consiguiendo de esta forma la reducción de los niveles de ácidos grasos saturados en el aceite de las semillas.
- 45 Publicación del documento de patente de Estados Unidos US 2008/0260933 A1. La delta-9 desaturasa de *A.*

nidulans proporcionó mayor reducción de estearato (61-90%) que de los ácidos grasos de palmitato (36-49%) más abundantes en el aceite de las semillas. Por lo tanto, la introducción conjunta de una delta-9 desaturasa que actúa preferentemente en los saturados de palmitato permitirá alcanzar una mayor reducción en los saturados totales complementando la actividad preferente de estearato de la delta-9 desaturasa de *A. nidulans*. En algunas formas de realización de la presente invención, se divulgan polipéptidos de delta-9 desaturasa de hongos que tienen un rango de especificidades de sustrato. Formas de realización particulares incluyen una delta-9 desaturasa que prefiere el palmitato (*es decir*, una enzima fúngica nativa como se divulga en este documento, o un equivalente funcional de la misma; y un polipéptido sintético diseñado para tener una preferencia por un sustrato de ácido palmítico).

Se divulgan en este documento moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:48, y SEQ ID NO:49. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico puede además comprender un elemento regulador del gen unido operativamente a la secuencia que codifica el polipéptido de delta-9 desaturasa. En formas de realización particulares, un elemento regulador del gen puede ser un promotor de faseolina, una región 5' no traducida de faseolina, una región 3' no traducida de faseolina, una región 3' no traducida de ORF1 de *Agrobacterium tumefaciens*, un promotor del virus del mosaico de las nervaduras de Cassava, una región de unión a la matriz RB7 de *Nicotiana tabacum*, una secuencia de borde de hebraT, un promotor LfKCS3, y un promotor FAE 1.

También se divulgan polipéptidos de delta-9 desaturasa que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:72, y SEQ ID NO:73, así como moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos de delta-9 desaturasa.

En algunas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos de delta-9 desaturasa pueden ser expresados en un material de planta, célula, tejido, o toda la planta, para reducir la cantidad de ácidos grasos saturados en el material de planta, célula, tejido, o toda la planta, en relación a la cantidad observada en una planta de tipo silvestre de la misma especie. Formas de realización alternativas de la invención incluyen métodos para reducir la cantidad de ácidos grasos saturados en el material de planta, célula, tejido, o de toda la planta. Tales métodos pueden comprender transformar un material de planta, célula, tejido, o de toda la planta con al menos una de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, de manera que se reduzca la cantidad de ácidos grasos saturados en el material de planta, célula, tejido, o de toda la planta. Formas de realización particulares incluyen métodos para reducir preferencialmente los ácidos grasos palmítico y/o esteárico en un material de planta, célula, tejido, o toda la planta.

Los métodos divulgados en este documento se pueden realizar, por ejemplo, en plantas, o materiales de plantas derivados de plantas (*por ejemplo*, plantas del género *Arabidopsis*, o canola). Una forma de realización particular señala a métodos para crear o regenerar una planta genéticamente modificada que comprende cantidades reducidas de ácidos grasos saturados en la planta en comparación con la cantidad observada en una planta de tipo silvestre de la misma especie, el método comprende transformar una célula o material de la planta con al menos una de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente; y cultivar el material de la planta transformada para obtener una planta. También se divulgan plantas, materiales de plantas, células de plantas, y semillas obtenidas por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

II. Abreviaturas

$x:y\Delta^z$ ácido graso que contiene x carbonos e y dobles enlaces en la posición z contando desde el extremo carboxílico

ACP proteína portadora de acilo

CoA coenzima A

FA ácidos grasos

FAM fluoresceína

FAS sintasa de ácidos grasos

FAME éster metílico de ácidos grasos

KASII sintasa II de ACP β -cetoacilo

MUFA ácido graso monoinsaturado

WT tipo silvestre

III. Términos

Ácidos grasos: como se usa en este documento, el término "ácido graso" se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanóicos) de diferentes longitudes de cadena, por ejemplo, desde aproximadamente C12 a C22, si bien se conocen tanto ácidos de cadena más larga como de cadena más corta. La estructura de un ácido graso se representa por la notación, $x:y\Delta^z$, donde "x" es el número total de átomos de carbono (C) en el ácido graso particular, e "y" es el número de doble enlaces en la cadena de carbono en la posición "z," como se cuenta desde el extremo carboxílico del ácido.

Vía metabólica: el término, "vía metabólica," se refiere a una serie de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula, catalizadas por enzimas, para lograr ya sea la formación de un producto metabólico, o la iniciación de otra vía metabólica. Una vía metabólica puede implicar varios o muchos pasos, y puede competir con una vía metabólica diferente para sustratos de reacción específicos. Del mismo modo, el producto de una vía metabólica puede ser un sustrato para todavía otra vía metabólica.

Ingeniería metabólica: para los propósitos de la presente invención, "ingeniería metabólica" se refiere al diseño racional de estrategias para alterar una o más vías metabólicas en una célula, de manera que se alcance la modificación paso a paso de una sustancia inicial en un producto que tiene la estructura química exacta deseada dentro del esquema general de todas las vías metabólicas operativas en la célula.

Desaturasa: tal como se usa en este documento, el término "desaturasa" se refiere a un polipéptido que puede desaturar (es decir, introducir un enlace doble) en uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso o precursor de interés. Una enzima desaturasa de ácido graso soluble en la planta puede introducir un doble enlace regioespecíficamente en un sustrato acil-ACP saturado. Las acil-CoA desaturasas introducen un doble enlace regioespecíficamente en un sustrato acil-CoA graso saturado. La reacción implica la activación del oxígeno molecular por un centro de dihierro reducido de dos electrones coordinado por un haz de cuatro hélices que forma el núcleo de la arquitectura de la desaturasa. De particular interés en algunas formas de realización son las acil-CoA delta-9 desaturasas.

La delta-9-18:0¹-ACP desaturasa es requerida en todas las plantas para el mantenimiento de la fluidez de la membrana. Mientras que esta enzima desatura principalmente estearoil-ACP, también es activa en un grado menor con palmitoil-ACP.

Desaturasa variante: como se usa en este documento, el término "desaturasa variante" abarca aquellas desaturasas que muestran perfiles de actividad específicos consistentes con un papel en la producción de ácidos grasos inusuales. Una desaturasa variante puede ser aislada de un organismo, creada con ingeniería por medio de un programa de evolución dirigida, o creada como una desaturasa sintética incorporando aminoácidos conservados de una o más desaturasas caracterizadas.

Planta de progenie: a los efectos de la presente invención, "planta de progenie", se refiere a cualquier planta, o material de planta obtenido a partir de la misma, que se pueda obtener por métodos de cultivo de plantas. Los métodos de cultivo de plantas son bien conocidos en la técnica, e incluyen la reproducción natural, cría artificial, cría selectiva que implica el análisis de los marcadores moleculares de ADN, transgénicos, y cría comercial.

Material de la planta: como se usa en este documento, el término "material de la planta" se refiere a cualquier célula o tejido obtenido de una planta.

Molécula de ácido nucleico: una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir tanto cadenas de sentido como cadenas de antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico, y formas sintéticas y polímeros mezclados de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido, o una forma modificada de ambos tipos de nucleótidos. Una "molécula de ácido nucleico" como se usa en este documento es sinónima con "ácido nucleico" y "polinucleótido." El término incluye formas de ADN de cadena sencilla y doble. Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno o ambos de nucleótidos naturales y nucleótidos modificados unidos por enlaces de nucleótidos tanto naturales como no naturales.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o bases de nucleótidos derivatizadas, como será fácilmente apreciado por los expertos en la técnica. Tal modificación incluye, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones de internucleótidos, tales como enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioles, fosforoditiolatos, etc.), restos pendientes (por ejemplo, péptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones de cadena sencilla, de cadena doble, parcialmente duplicada, triplicada, en forma de horquilla, circular y de candado.

Operativamente unido: una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está en una relación funcional con la

segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo un promotor está operativamente unido a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Cuando se produce de forma recombinante, secuencias de ácido nucleico unidas operativamente están generalmente contiguas y, cuando es necesario unen dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan estar contiguos para unirse operativamente.

Elemento regulador: como se usa en este documento, el término "elemento regulador" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene actividad reguladora de genes; es decir, una que tiene la habilidad de afectar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico transcribible unida operativamente. Los elementos reguladores tales como los promotores, líderes, intrones, y las regiones de terminación de la transcripción son moléculas no codificantes de ácido nucleico que tienen actividad reguladora de los genes que desempeñan un papel integral en la expresión global de los genes en las células vivas. Los elementos reguladores aislados que funcionan en las plantas son por lo tanto útiles para modificar fenotipos de plantas a través de las técnicas de ingeniería molecular. Por "elemento regulador", se indica una serie de nucleótidos que determina si, cuando y en qué nivel se expresa un gen particular. Las secuencias de ADN reguladoras interactúan específicamente con proteínas reguladoras u otras proteínas.

Como se usa en este documento, el término "actividad reguladora del gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de afectar a la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene actividad reguladora del gen puede proporcionar una expresión temporal o espacial o modular los niveles y tasas de expresión de la molécula de ácido nucleico unida operativamente. Una molécula de ácido nucleico que tiene actividad reguladora de genes puede comprender un promotor, intrón, líder o región 3' de terminación de la transcripción.

Promotores: tal como se utiliza en este documento, el término "promotor" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II u otras proteínas tal como los factores de transcripción (factores de proteínas que actúan en trans que regulan la transcripción) para iniciar la transcripción de un gen unido operativamente. Los promotores pueden ellos mismos contener subelementos, tales como elementos cis o dominios potenciadores que afectan a la transcripción de genes unidos operativamente. Un "promotor vegetal" es un promotor nativo o no nativo que es funcional en células vegetales. Un promotor vegetal puede usarse como un elemento 5' regulador para modular la expresión de un gen o genes operativamente unidos. Los promotores vegetales pueden ser definidos por su patrón de expresión temporal, espacial, o de desarrollo. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden comprender secuencias de ácidos nucleicos que comprenden promotores.

Identidad de secuencia: el término "identidad de secuencia" o "identidad", como se usa en este documento en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, puede hacer referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada.

Cuando se utiliza el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras, donde los residuos de aminoácidos están sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga, hidrofobicidad, o efectos estéricos), y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula.

Por lo tanto, cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, la identidad de secuencia en porcentaje puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución en el lugar del residuo no idéntico. Las secuencias que difieren por tales sustituciones conservadoras se dicen que tienen "similitud de secuencia" o "similaridad". Las técnicas para hacer este ajuste son bien conocidas por los expertos con conocimientos de la técnica. Normalmente, tales técnicas implican puntuar una sustitución conservadora como falta de coincidencia parcial, en lugar de completa, lo que aumenta el porcentaje de identidad de la secuencia. Por ejemplo, cuando se da a un aminoácido idéntico una puntuación entre 0 y 1, y a una sustitución no conservadora se le da una puntuación de 0, a una sustitución conservadora se le da una puntuación entre 0 y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras puede calcularse, por ejemplo, como se implementan en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, CA).

Como se utiliza en este documento, el término "porcentaje de identidad de secuencia" puede referirse al valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico sucede en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Posición análoga en una secuencia de aminoácido: el ácido nucleico y las secuencias de aminoácido pueden estar

alineadas por los métodos descritos en los párrafos siguientes. Cuando se alinean, una posición en una secuencia está en "una posición análoga" con una posición en la secuencia alineada si las posiciones son idénticas dentro de la secuencia de consenso.

5 Métodos para la alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. math. 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, Gene 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881-10890, 1988; Huang, et al., Computer Applications in the Biosciences 8:155-65, 1992; Pearson et al., Methods in Molecular Biology 24:307-31, 1994; Tatiana et al., FEMS Microbiol. Lett., 174:247-50, 1990. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990 (examen detallado de los métodos de alineación de secuencia y los cálculos de homología).

10 La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) está disponible en internet (en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), en conexión con los programas de análisis de secuencia, por ejemplo, blastp y blastn. Una descripción de como determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en internet a través del NCBI en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs.

15 Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, la función "Blast 2 sequences" del programa BLAST (bl2seq) se emplea utilizando los parámetros por defecto. Los parámetros específicos se pueden ajustar a la discreción del experto en la técnica, para por ejemplo, proporcionar una sanción por una falta de coincidencia o recompensa por una coincidencia.

20 Transformado: como se usa en este documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico ajeno, tal como una construcción. La molécula de ácido nucleico introducida puede ser integrada en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de forma que la molécula de polinucleótido introducido es heredada por la progenie posterior. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye la progenie de la célula u organismo y la progenie producida a partir de un programa de cría empleando dicha planta transgénica como padre en, por ejemplo, un cruzado y que presenta un fenotipo alterado como resultado de la presencia de una molécula de ácido nucleico ajeno.

IV. Enfoques de ingeniería metabólica para disminuir los ácidos grasos saturados en una célula tejido u organismo hospedante

30 A. Visión general

La invención presente incluye introducir una delta-9 desaturasa con preferencias específicas de acilCoA (por ejemplo, para ácido palmítico o esteárico) en semillas de plantas. La preferencia específica de acil-CoA de la delta-9 desaturasa permite la orientación de ciertas agrupaciones específicas de ácido graso saturado (por ejemplo, palmitato para la conversión a productos monoinsaturados). Se seleccionaron acil-CoA delta-9 desaturasas para reducir el contenido de ácido graso saturado en plantas, ya que no se producen normalmente en sistemas de plantas de una manera apreciable.

B. Polipéptidos

40 Los polipéptidos según algunas formas de realización de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que muestra identidades con porcentaje aumentado cuando se alinea con una secuencia que consiste de SEQ ID NO:12. Secuencias de aminoácidos específicos dentro de estas y otras formas de realización pueden comprender secuencias que tienen, por ejemplo, al menos aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o el 100% de identidad con las secuencias antes mencionadas. En muchas formas de realización, la secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia antes mencionada cuando se alinea con las secuencias anteriormente mencionadas codifica un péptido con actividad delta-9-18:0-ACP desaturasa enzimática, o parte de un tal péptido.

C. Ácidos nucleicos

50 Algunas formas de realización incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido descrito anteriormente. Por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos en algunas formas de realización muestran el aumento de porcentaje de identidad cuando se alinean con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:15. Secuencias de ácido nucleico específicas dentro de esta y otras formas de realización pueden comprender secuencias que tienen, por ejemplo, al menos aproximadamente el 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15. Se entiende por aquellos con conocimientos normales de la técnica que las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas sin sustancialmente cambiar la secuencia de aminoácidos de

un polipéptido codificado, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótido permisibles de acuerdo con la degeneración del codón.

En algunas formas de realización, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención comprenden un elemento de regulación de genes (es decir, un promotor). Los promotores pueden ser seleccionados sobre la base del tipo de célula en la que se insertará la construcción del vector. Los promotores que funcionan en bacterias, levaduras y plantas son bien conocidos en la técnica. Los promotores también pueden ser seleccionados sobre la base de sus características de regulación. Ejemplos de tales características incluyen la mejora de la actividad de transcripción, la capacidad de inducción, especificidad tisular, y la especificidad de la etapa de desarrollo. En las plantas, han sido descritos promotores que son inducibles, de origen vírico o sintético, constitutivamente activos, temporalmente regulados, espacialmente regulados. Véase, por ejemplo, Poszkowski et al. (1989) EMBO J. 3:2719; Odell et al. (1985) Nature 313:810; y Chau et al. (1989) Science 244:174-81).

Promotores inducibles útiles incluyen, por ejemplo, los promotores inducidos por el ácido salicílico o ácidos poliacrílicos inducidos por la aplicación de antidotos (herbicidas de bencenosulfonamidas sustituidas), promotores de choque térmico, un promotor inducible por nitrato derivado de la secuencia de la molécula de ácido nucleico transcribible por la nitrato reductasa de la espinaca, promotores inducibles por hormonas, y promotores inducibles por la luz asociados con la subunidad pequeña de las familias de RuBP carboxilasa y las familias de LHCP.

Ejemplos de promotores útiles específicos de tejidos regulados por el desarrollo incluyen el promotor 7S α de β -conglucina y promotores específicos de semillas. Promotores funcionales de plantas útiles para la expresión preferente en plástidos de semilla incluyen aquellos de proteínas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos en las semillas oleaginosas y de proteínas de almacenamiento de la planta. Ejemplos de tales promotores incluyen las regiones reguladoras 5' de dichas secuencias de moléculas de ácido nucleico transcribibles tales como faseolina, napina, zeína, el inhibidor de tripsina de soja, ACP, esteroil-ACP desaturasa, y oleosina. Otro promotor específico de tejido como ejemplo es el promotor de lectina, que es específico para el tejido de la semilla.

Otros promotores útiles incluyen los promotores de la nopalina sintasa, manopina sintasa, y octapina sintasa, que se llevan en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*; los promotores del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 19S y 35S; el promotor mejorado CaMV 35S; el promotor del virus del mosaico de Figwort 35S; el promotor inducible por la luz de la pequeña subunidad de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO); el promotor EIF-4A del tabaco (Mandel et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29:995-1004); la sintetasa de la sacarosa de maíz; la alcohol dehidrogenasa del maíz; complejo de antena de maíz; la proteína del shock de calor del maíz; el promotor de quitinasa de *Arabidopsis*; los promotores de LTP (proteína de transferencia de lípidos); la isomerasa de calcona de petunia; la proteína 1 rica en glicina de la judía; patatina de la patata; el promotor de ubiquitina; y el promotor de actina. Los promotores útiles son preferiblemente selectivos para la semilla, selectivos para el tejido, o inducibles. La regulación específica de semillas se discute en, por ejemplo, el documento de patente europea EP 0 255 378.

Para obtener mayor expresión de uno o más genes heterólogos, se puede preferir rediseñar el o los genes de modo que se expresen más eficientemente en la célula hospedante de expresión (por ejemplo una célula vegetal, por ejemplo, colza, arroz, tabaco, maíz, algodón y soja). Por lo tanto, un paso adicional opcional en el diseño de un gen que codifica una delta-9 desaturasa de expresión de la planta (o sea, además de la provisión de elementos reguladores de uno o más genes) es la reingeniería de una proteína de gen heterólogo que codifica la región para la expresión óptima. Formas de realizaciones particulares incluyen genes rediseñados que han sido optimizados para incrementar el nivel de expresión (es decir, producir más proteína) en una célula vegetal de canola transgénica o una célula vegetal de *Arabidopsis* en comparación con una célula vegetal de canola o una célula vegetal de *Arabidopsis* transformada con la secuencia génica heteróloga de origen natural.

Debido a la plasticidad otorgada por la redundancia/degeneración del código genético (es decir, algunos aminoácidos son especificados por más de un codón), la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos ha dado como resultado el uso diferencial de codones sinónimos. Este "sesgo de codón" se refleja en el promedio de composición de las bases de las regiones codificantes de proteínas. Por ejemplo, los organismos que tienen genomas con contenidos relativamente bajos de G+C utilizan más codones que tienen A o T en la tercera posición de codones sinónimos, mientras que los que tienen mayores contenidos de G+C utilizan más codones que tienen G o C en la tercera posición. Además, se cree que la presencia de codones "menores" dentro de un ARNm puede reducir la tasa de translación absoluta de ese ARNm, especialmente cuando la abundancia relativa del ARNt cargado que corresponde al codón de menor importancia es baja. Una extensión de este razonamiento es que la disminución de la tasa de translación de codones minoritarios individuales sería al menos aditiva para múltiples codones minoritarios. Por lo tanto, ARNms que tienen un contenido alto relativo de codones menores en un hospedante de expresión particular tendrían correspondientemente unas tasas de translación bajas. Estas tasas pueden ser reflejadas por los correspondientes niveles bajos de la proteína codificada.

Cuando se producen por ingeniería genética genes optimizados que codifican una delta-9 desaturasa para la expresión en canola o *Arabidopsis* (u otras plantas, tal como arroz, tabaco, maíz, algodón o soja), es útil haber determinado el sesgo de codones de la planta(s) hospedante(s) prospectiva(s). Existen varias bases de datos de secuencias de ADN disponibles al público en las que se puede encontrar información sobre la distribución de codones del genoma de las plantas o las regiones que codifican la proteína de varios genes de plantas.

El sesgo de códon es la distribución estadística de codones que el hospedante de expresión (o sea, una planta tal como canola o *Arabidopsis*) usa para codificar los aminoácidos de sus proteínas. El sesgo de códon puede ser calculado como la frecuencia a la que se usa un codón único con respecto a los codones para todos los aminoácidos. Alternativamente, el sesgo de códon puede calcularse como la frecuencia a la que se utiliza un solo codón para codificar un aminoácido particular, con respecto a todos los otros codones para ese aminoácido (codones sinónimos).

En el diseño de las regiones de codificación optimizadas para la expresión en plantas de los genes de delta-9 desaturasa, los codones primarios ("de primera elección") preferidos por la planta deben ser determinados, así como la segunda, tercera, cuarta, etc. opción de codones preferidos cuando múltiples opciones existen. Una nueva secuencia de ADN puede ser diseñada entonces que codifica la secuencia de amino del gen de la delta-9 desaturasa, en donde la nueva secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN nativa (que codifica la desaturasa) por la sustitución de la expresión de los codones preferidos del hospedante (de primera elección, de segunda elección, de tercera elección, o de cuarta elección, etc.) para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la secuencia de aminoácido. La nueva secuencia se analiza a continuación en cuanto a los lugares de enzimas de restricción que podrían haber sido creados por las modificaciones. Los lugares de restricción putativos identificados se modifican adicionalmente mediante la sustitución de estos codones con un codón preferido siguiente para eliminar el lugar de restricción. Otros lugares de la secuencia que pueden afectar a la transcripción o traducción de la secuencia heteróloga son intersecciones exón:intrón (5' o 3'), señales de adición de poli-A, y/o señales de terminación de ARN polimerasa. La secuencia puede ser analizada adicionalmente y modificada para reducir la frecuencia de dobletes TA o CG. Además de estos dobletes, bloques de secuencias que tienen más de aproximadamente seis nucleótidos G o C que son iguales también pueden afectar negativamente a la transcripción o traducción de la secuencia. Por lo tanto estos bloques se modifican ventajosamente mediante la sustitución de los codones de primera o segunda elección, etc. con el siguiente codón preferido.

El método descrito anteriormente permite a un experto en la técnica modificar el gen(es) que es(son) ajeno(s) a una planta particular de manera que los genes se expresen de manera óptima en las plantas. El método se ilustra en más detalle en la solicitud de patente internacional PCT del documento de patente internacional WO 97/13402. Así, los genes sintéticos optimizados que son funcionalmente equivalentes a los desaturasas/genes de algunas formas de realización se pueden utilizar para transformar a los hospedantes, incluyendo las plantas. Orientaciones adicionales en cuanto a la producción de genes sintéticos se pueden encontrar en, por ejemplo, el documento de patente de los Estados Unidos U.S. Patent 5.380.831.

Una vez que una secuencia de ADN optimizada para plantas se ha diseñado en papel o *in silico*, moléculas de ADN reales pueden ser sintetizadas en el laboratorio para que se correspondan en la secuencia precisamente con la secuencia diseñada. Tales moléculas de ADN sintéticas pueden ser clonadas y manipuladas de otra manera exactamente como si se derivaran de fuentes naturales o nativas.

D. Métodos para la transformación genética del material vegetal

Algunas formas de realización están dirigidas a un método para producir una célula transformada que comprende una o más molécula(s) de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:9. Tales moléculas de ácido nucleico pueden también comprender, por ejemplo, elementos regulatorios que no codifican, tal como promotores. Otras secuencias también pueden ser introducidas en la célula junto con elementos reguladores no codificantes y secuencias de moléculas de ácido nucleico transcribibles. Estas otras secuencias pueden incluir terminadores 3' de la transcripción, señales 3' de poliadenilación, otras secuencias no traducidas, secuencias de tránsito o de orientación, marcadores seleccionables, potenciadores y operadores.

Un método de transformación comprende generalmente las etapas de seleccionar una célula hospedante adecuada, transformar la célula hospedante con un vector de recombinación y obtener la célula hospedante transformada. La tecnología para la introducción de ADN en células es bien conocida por los expertos en la técnica. Estos métodos generalmente se pueden clasificar en cinco categorías: (1) métodos químicos (Graham y Van der Eb (1973) *Virology* 54(2):536-9; Zatloukal et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:136-53); (2) métodos físicos tales como la microinyección (Capechi (1980) *Cell* 22(2):479-88), electroporación (Wong y Neumann (1982) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 107(2):584-7; Fromm et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(17):5824-8; Documento de patente de Estados Unidos N° 5.384.253), y aceleración de partículas (Johnston y Tang (1994) *Methods Cell Biol.* 43(A):353-65; Fynan et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(24):11478-82); (3) vectores víricos (Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20(1):155-68; Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178(6):2089-96; Eglitis y Anderson (1988) *Biotechniques* 6(7):608-14); (4) mecanismos mediados por receptores (Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3(2):147-54; Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(13):6099-103); y (5) mecanismos mediados por bacterias, tales como *Agrobacterium*. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden ser introducidos directamente en el polen por inyección directa en los órganos reproductores de la planta. Zhou et al. (1983) *Methods in Enzymology* 101:433; Hess (1987) *Intern. Rev. Cytol.* 107:367; Luo et al. (1988) *Plant Mol. Biol. Reporter* 6:165; Pena et al. (1987) *Nature* 325:274. Otros métodos de transformación incluyen, por ejemplo, la transformación de protoplastos como se ilustra en el documento de patente de Estados Unidos 5.508.184. Las moléculas de ácido nucleico pueden también inyectarse en embriones inmaduros. Neuhaus et al. (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75:30.

Los métodos más comúnmente utilizados para la transformación de células de plantas son: el proceso de transferencia de ADN mediado por *Agrobacterium* (Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803) (como se ilustra en el documento de patente de Estados Unidos 5.824.877; documento de patente de Estados Unidos 5.591.616; documento de patente de Estados Unidos 5.981.840; y documento de patente de Estados Unidos 6.384.301) y el proceso mediado por bombardeo de biolísticos o microproyectiles (por ejemplo, la pistola de genes) (tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos 5.550.318; documento de patente de Estados Unidos 5.538.880; documento de patente de Estados Unidos 6.160.208; documento de patente de Estados Unidos 6.399.861; y documento de patente de Estados Unidos 6.403.865). Típicamente, se desea una transformación nuclear, pero cuando es deseable específicamente transformar plástidos, tales como cloroplastos o amiloplastos, pueden transformarse plástidos de plantas utilizando una entrega mediada por un microproyectil de la molécula deseada de ácido nucleico a ciertas especies de plantas, tales como por ejemplo, especies de *Arabidopsis*, tabaco, patata, y *Brassica*.

La transformación mediada por *Agrobacterium* se consigue mediante el uso de una bacteria del suelo modificada genéticamente que pertenece al género *Agrobacterium*. Varias especies de *Agrobacterium* median la transferencia de un ADN específico conocido como "ADN-T", que puede ser modificado genéticamente para llevar cualquier pieza deseada de ADN a muchas especies de plantas. Los principales acontecimientos que marcan el proceso de patogénesis mediada por ADN-T son: inducción de genes de virulencia, y el procesamiento y transferencia de ADN-T. Este proceso es el tema de muchas revisiones. Véase, por ejemplo, Ream (1989) Ann. Rev. Phytopathol. 27:583-618; Howard y Citovsky (1990) Bioassays 12:103-8; Kado (1991) Crit. Rev. Plant Sci. 10:1-32; Zambryski (1992) Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:465-90; Gelvin (1993) en Transgenic Plants, Kung y Wu editores, Academic Press, San Diego, CA, páginas 49-87; Binns y Howitz (1994) en Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals, Dang, editor, Berlin: Springer Verlag., páginas 119-38; Hooykaas y Beijersbergen (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32:157-79; Lessl y Lanka (1994) Cell 77:321-4; y Zupan y Zambryski (1995) Annual Rev. Phytopathol. 27:583-618.

Para seleccionar o puntuar las células vegetales transformadas independientemente de la metodología de transformación, el ADN introducido en la célula puede contener un gen que funciona en un tejido vegetal regenerable para producir un compuesto que confiere al tejido vegetal resistencia a un compuesto de otro modo tóxico. Genes de interés para uso como un marcador seleccionable, rastreable, o puntuable incluyen, pero no se limitan a, β -glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, y genes tolerantes a los antibióticos o herbicidas. Ejemplos de genes resistentes a los antibióticos incluyen genes que confieren resistencia a las penicilinas, kanamicina (y neomicina, G418, bleomicina); metotrexato (y trimetoprim); cloranfenicol; y tetraciclina. Por ejemplo, puede conferirse resistencia al glifosato por un gen resistente al herbicida. Della-Cioppa et al. (1987) Bio/Technology 5:579-84. También se pueden implementar otros dispositivos de selección, incluyendo por ejemplo y sin limitación, tolerancia a la fosfotricina, bialafos, y mecanismos positivos de selección (Joersbro et al. (1998) Mol. Breed. 4:111-7), y son considerados dentro del alcance de las formas de realización de la presente invención.

Las células transformadas, identificadas por selección o cribado y cultivadas en un medio apropiado que apoya la regeneración, pueden entonces dejarse madurar como plantas.

Los métodos divulgados en el presente documento pueden usarse con cualquier célula o tejido vegetal transformable. Las células y tejidos transformables, como se usan en el presente documento, incluyen pero no están limitados a aquellas células o tejidos que son capaces de propagación adicional para dar lugar a una planta. Los expertos en la técnica reconocerán que hay un número de células o tejidos vegetales que son transformables en los que después de la inserción del ADN exógeno y condiciones de cultivo apropiadas las células o tejidos vegetales se pueden convertir en una planta diferenciada. Los tejidos adecuados para estos propósitos pueden incluir pero no están limitados a embriones inmaduros, tejido escutelar, cultivos celulares en suspensión, inflorescencias inmaduras, brotes de meristemo, explantes nodales, tejido de callo, tejido de hipocótilo, cotiledones, raíces, y hojas.

La regeneración, desarrollo, y cultivo de plantas a partir de protoplastos de planta o explantes de planta transformados se conocen en la técnica. Weissbach y Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, (editores) Academic Press, Inc., San Diego, CA; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-31. Este proceso de regeneración y crecimiento típicamente incluye las etapas de selección de las células transformadas y cultivo de esas células a través de las etapas habituales de desarrollo embrionario a través de la etapa de plántula enraizada. Los embriones y semillas transgénicas se regeneran de manera similar. En este método, los transformantes son generalmente cultivados en presencia de un medio selectivo que selecciona las células exitosamente transformadas e induce la regeneración de los brotes de planta. Fraley et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803. Estos brotes se obtienen típicamente de dos a cuatro meses. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento de plantas adecuado tal como tierra. Las células que sobreviven a la exposición a un agente selectivo, o las células que han puntuado como positivas en un ensayo de cribado, pueden ser cultivadas en un medio que apoye la regeneración de las plantas. Los brotes pueden entonces transferirse a un medio inductor de raíces apropiado que contiene el agente selectivo y un antibiótico para prevenir el crecimiento bacteriano. Muchos de los brotes desarrollarán raíces. Estos después se trasplantan a tierra u otros medios para permitir el desarrollo continuo de las raíces. El método, como se describe anteriormente, generalmente variará dependiendo de la cepa vegetal particular de la planta empleada, y los detalles de la metodología están por lo tanto dentro de la discreción del experto en la técnica.

Las plantas regeneradas transgénicas pueden ser auto polinizadas para que proporcionen plantas transgénicas homocigóticas. Alternativamente, se puede cruzar el polen obtenido de las plantas regeneradas transgénicas con plantas no transgénicas, preferiblemente líneas endogámicas de especies agrónomicamente importantes. Por el contrario, polen de plantas no transgénicas puede usarse para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

- 5 La planta transgénica puede pasar a su progenie la secuencia de ácido nucleico transformada. La planta transgénica es preferiblemente homocigótica para la secuencia de ácido nucleico transformada y transmite esa secuencia a toda su progenie con, y como resultado de, la reproducción sexual. La progenie puede ser cultivada a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales pueden ser entonces auto polinizadas para generar una verdadera línea de reproducción de plantas.
- 10 La progenie de estas plantas puede ser evaluada, entre otras cosas, en cuanto a la expresión génica. La expresión génica se puede detectar por varios métodos comunes tales como la transferencia western, transferencia northern, inmunoprecipitación, y ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). Las plantas transformadas se pueden también analizar para la presencia del ADN introducido y el nivel de expresión y/o perfil de ácidos grasos conferido por las moléculas de ácido nucleico y moléculas de aminoácidos de la presente invención. Los expertos en la técnica son conscientes de los numerosos métodos disponibles para el análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para el análisis de las plantas incluyen, pero no están limitados a, transferencia Southern o transferencia northern, enfoques basados en PCR, ensayos bioquímicos, métodos de selección fenotípica, evaluaciones de campo, y pruebas inmunodiagnósticas.

20 Los métodos para transformar específicamente las dicotiledóneas son bien conocidos para los expertos en la técnica. La transformación y regeneración de plantas usando estos métodos se han descrito para una serie de cultivos incluyendo, pero no limitados a, miembros del género *Arabidopsis*, algodón (*Gossypium hirsutum*), soja (*Glycine max*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), y miembros del género *Brassica*. Métodos para transformar dicotiledóneas, principalmente con el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, y la obtención de plantas transgénicas se han publicado para el algodón (documento de patente de Estados Unidos 5.004.863; documento de patente de Estados Unidos 5.159.135; documento de patente de Estados Unidos 5.518.908); soja (documento de patente de Estados Unidos 5.569.834; documento de patente de Estados Unidos 5.416.011; McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923; Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-4); *Brassica* (documento de patente de Estados Unidos 5.463.174); cacahuete (Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-7; McKentley et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 14:699-703); papaya; y guisante (Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-8).

30 Los métodos para transformar monocotiledóneas son también bien conocidos en la técnica. La transformación y regeneración de la planta usando estos métodos se ha descrito para un número de cultivos incluyendo, pero no limitados a, la cebada (*Hordeum vulgare*); maíz (*Zea mays*); avena (*Avena sativa*); pasto ovillo (*Dactylis glomerata*); arroz (*Oryza sativa*, incluyendo las variedades indica y japonica); sorgo (*Sorghum bicolor*); caña de azúcar (especies de *Saccharum*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); especies de césped (por ejemplo, *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*); trigo (*Triticum aestivum*); y alfalfa (*Medicago sativa*). Es evidente para los expertos en la técnica que pueden usarse y modificarse varias metodologías de transformación en la producción de plantas transgénicas estables para cualquier número de cultivos diana de interés.

40 Cualquier planta puede escogerse para uso con los métodos divulgados en el presente documento. Plantas preferidas para su modificación según la presente invención incluyen, por ejemplo y sin limitación, las plantas de semillas oleaginosas, *Arabidopsis thaliana*, la borraja (especies de *Borago*), canola (especies de *Brassica*), ricino (*Ricinus communis*), grano de cacao (*Theobroma cacao*), maíz (*Zea mays*), algodón (especies de *Gossypium*), especies de *Crambe*, especies de *Cuphea*, lino (especies de *Linum*), especies de *Lesquerella* y *Limnanthes*, Linola, nasturtium (especies de *Tropaeolum*), especies de *Oenothera*, olivo (especies de *Olea*), palma (especies de *Elaeis*), cacahuete (especies de *Arachis*), colza, cártamo (especies de *Carthamus*), soja (especies de *Glycine* y *Soja*), girasol (especies de *Helianthus*), tabaco (especies de *Nicotiana*), especies de *Vernonia*, trigo (especies de *Triticum*), cebada (especies de *Hordeum*), arroz (especies de *Oryza*), avena (especies de *Avena*) sorgo (especies de *Sorghum*), y centeno (especies de *Secale*) u otros miembros de las *Gramíneas*.

Es evidente para los expertos en la técnica que pueden usarse y modificarse varias metodologías de transformación en la producción de plantas transgénicas estables a partir de cualquier número de cultivos diana de interés.

50 E. Semillas transgénicas

En algunas formas de realización, una semilla transgénica puede comprender un polipéptido de delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:72, y SEQ ID NO:73. En estas y otras formas de realización, la semilla transgénica puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:48, y SEQ ID NO:49. En ciertas formas de realización, una semilla transgénica puede presentar niveles reducidos de ácidos grasos saturados (por ejemplo, ácido graso palmítico y/o ácido graso esteárico). Las semillas de una planta fértil

transgénica pueden ser cosechadas, y pueden usarse para cultivar generaciones de progenie de plantas transformadas, incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico como se ha expuesto anteriormente, y opcionalmente al menos un gen o construcción de ácido nucleico de interés adicionales.

- 5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o formas de realización específicas. Estos ejemplos no se deben interpretar como limitativos de la invención a las características y/o formas de realización específicas descritas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de acil-CoA delta-9 desaturasas y caracterización funcional en levadura deficiente en *ole1*

10 Clonación de *Magnaporthe grisea* acil-CoA delta-9 desaturasas

El gen de *Magnaporthe grisea* acil-CoA delta-9 desaturasa (MgD9DS) se aisló a partir de ADN genómico usando cebadores basados en una secuencia publicada por NCBI/Broad Institute originalmente anotada como una "proteína hipotética", y que tenía un 55,4% de identidad a nivel de nucleótido con la acil-CoA delta-9 desaturasa de (*S. cerevisiae* o sea, *OLE1*). Se diseñaron cebadores directos e inversos, cada uno de 41 pares de bases de longitud. El
15 cebador directo, MgΔ9F (SEQ ID NO:1), incluía un lugar *EcoRI* en el extremo 5'. El cebador inverso, Mg9ΔR (SEQ ID NO:2), contenía codones de terminación en cada uno de tres marcos de lectura y un lugar *XhoI* terminal.

El gen MgD9DS se amplificó por PCR usando el kit Takara EZ Taq™ PCR kit (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón) siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron 94° C durante 1 minuto, seguido de 30
20 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 60 segundos, y una extensión a 72° C durante 90 segundos. Una etapa de extensión final se realizó a 72° C durante 10 minutos. El producto esperado de PCR de 1425 pares de bases se escindió de un gel de agarosa y se purificó usando columnas de giro Montage según las recomendaciones del fabricante (Millipore, Billerica, MA). El fragmento purificado se clonó en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción de TOPO se transformó en células químicamente competentes de *E. coli* Top
25 10 según las condiciones de los proveedores. Se aislaron las colonias bacterianas que contenían el clon putativo. Se preformaron preparaciones de mini-plásmidos con un kit de aislamiento de ADN de Macherey-Nagel Nucleospin (Macherey-Nagel, Neumann-Neander-Strasse, Düren, Alemania), y se digirió el ADN con enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Se identificaron los clones positivos que contenían el fragmento génico esperado de MgD9DS de 1425 pares de bases. Se obtuvo la secuencia del nucleótido por medio de reacciones de secuenciación. La secuencia del fragmento amplificado por PCR se muestra como SEQ ID NO:3.

30 El análisis de la secuencia reveló un pequeño (90 pares de bases) intrón situado en el extremo 5' del gen MgD9DS. El intrón se eliminó usando Splice PCR de extensión por solapamiento. El amplicón resultante de la PCR se purificó en gel, se clonó en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO®, y se transformó en células Top 10 de *E. coli*. Se identificaron varios clones por medio del análisis de los productos de digestión con las enzimas de restricción del ADN purificado a partir de colonias transformantes individuales. Estos clones se secuenciaron para confirmar la
35 presencia de un clon de MgD9DS sin intrón. La secuencia resultante se presenta como SEQ ID NO:4.

Los genes MgD9DS, con y sin intrón, fueron cada uno subclonado como un fragmento de *EcoRI/XhoI* en un vector de expresión de levadura. Este vector de expresión de levadura contiene un gen de delta-9 desaturasa (AnD9DS) de *Aspergillus nidulans* flanqueado por el promotor de delta-9 desaturasa y 3'UTR/terminador de delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae*. El gen de delta-9 desaturasa de *Aspergillus nidulans* se escindió de un fragmento *EcoRI/XhoI*, que
40 fue sustituido ya fuera con el fragmento que contenía el gen MgD9DS o el fragmento que contenía el gen MgD9DS sin intrón. Dos clones que contenían el gen MgD9DS (uno con un intrón, y uno sin un intrón) se avanzaron para la transformación de *S. cerevisiae*.

Se transformó una cepa deficiente en delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae* (OFY093), que se mantiene en un medio de levadura de peptona dextrosa (YPD) con Tween® 80, usando el kit de transformación de levadura de cationes de
45 álcali (Qbiogene, Montreal, Canadá). Se identificaron cepas complementadas por crecimiento en medio que no contenía Tween® 80 (suplemento de ácidos grasos monoinsaturados) o uracilo (Dropout Base con Agar con SC-URA). Las cepas complementadas eran de una sola colonia purificada en medios selectivos tres veces. Las cepas complementadas se verificaron adicionalmente por amplificación por PCR del gen de delta-9 desaturasa, y la secuenciación del producto de PCR. Además, las cepas que contenían el clon MgD9DS se revertieron a dependencia de ácido graso y uracilo pasando la cepa al menos tres veces en medio de YPD + Tween 80®, y después parcheando las cepas en medios DOBA SC-URA menos Tween® 80.
50

La expresión de la secuencia de codificación MgD9DS que contenía el intrón no tuvo éxito, indicando que el intrón no se empalmó con la maquinaria de la levadura. La especificidad de sustrato de la cepa de levadura que contenía la secuencia de codificación MgD9DS sin intrón se caracterizó adicionalmente por análisis de FAME.

55 Clonación de acil-CoA delta-9 desaturasas de *Leptosphaeria nodorum*

Se identificaron dos *Leptosphaeria nodorum* secuencias EST (1246 y 429 pares de bases, respectivamente) de una

colección de *L. nodorum* ESTs usando una búsqueda BlastN como que compartían altos niveles de identidad de secuencia (54,0% y 54,2% respectivamente) con la acil-CoA delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae* (*OLE1*). Cuando se alinearon, estas secuencias fueron 64,6% idénticas entre sí, sugiriendo la presencia de dos *Leptosphaeria nodorum* acyl-CoA delta-9 desaturasas distintas. Se aisló un gen An LnD9DS-1 (SEQ ID NO:5) mediante cribado de una biblioteca de ADNc de *L. nodorum* con la sonda del gen de 1246 pares de bases. Se obtuvo la secuencia de este gen, y se aisló la secuencia de codificación. Se aisló la secuencia completa de un gen LnD9DS-2 por primer búsqueda de BLAST de la secuencia genómica de *Leptosphaeria nodorum* publicada por el Broad Institute con la EST de 429 pares de bases. Esta búsqueda identificó a supercóntigo Ln 1.4 como que contenía un gen con 100% de homología con el fragmento de 429 pares de bases, dicho gen se anotó como que codificaba una "proteína hipotética". A continuación, se clonó el gen LnD9DS-2 de una biblioteca de ADNc de *Leptosphaeria nodorum* usando cebadores de PCR basados en la secuencia supercóntigo Ln1.4. Las secuencias de los cebadores usados fueron Lnd9FAD2F (SEQ ID NO:6) y Lnd9FAD2R (SEQ ID NO:7). El cebador directo se diseñó con un lugar 5' *BamHI*, y el cebador inverso contenía codones de parada en tres marcos de lectura y un lugar *NcoI* terminal.

Se diluyó una alícuota de la biblioteca de ADNc de *Leptosphaeria nodorum* 1/10 para proporcionar 400 ng de molde de ADN para la reacción de PCR. Se realizó la amplificación de PCR usando un kit Takara EZ Taq™ PCR siguiendo las condiciones de amplificación recomendadas de 94° C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 60 segundos, y extensión a 72° C durante 90 segundos. Una etapa de extensión final se realizó a 72° C durante 10 minutos. El producto esperado de 1370 pares de bases se escindió de un gel de agarosa, y se purificó usando columnas de giro de Montage según las recomendaciones del fabricante. El fragmento purificado se clonó en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO®. La reacción de ligación se transformó en células químicamente competentes Top 10 de *E. coli* según el protocolo recomendado por el fabricante. Se aislaron colonias que contenían un clon putativo. Se preformaron preparaciones de mini plásmidos con columnas de Macherey-Nagel Nucleospin, y se digirió el ADN con enzimas de restricción *BamHI* y *NcoI*. Clones LnD9DS-2 putativos se identificaron y secuenciaron.

Tras la secuenciación, se confirmó un clon de LnD9DS-2 (SEQ ID NO:8) por comparación con la secuencia de la "proteína hipotética". Se identificó un cambio conservador en la secuencia de LnD9DS-2. El codón TGC (cisteína) fue cambiado a AGC (serina) por sustitución de una adenina por una timidina en la posición de base 271, dicho codón se traduce en el aminoácido 89 de la secuencia publicada. Este es un cambio conservador, y como se sabe que la cisteína no es un aminoácido muy conservado entre muchos hongos filamentosos, no se intentó ninguna corrección.

Los genes LnD9DS-1 y LnD9DS-2 de las SEQ ID NOs:5 y 8, respectivamente, se clonaron en un vector de expresión de levadura. Se confirmaron los clones que contenían cualquiera de las secuencias de codificación LnD9DS-1 y LnD9DS-2 por análisis de enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

Se transformó una cepa deficiente en delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae* (OFY093), que se mantiene en un medio de levadura de peptona dextrosa YPD con Tween® 80, usando el kit de transformación de levadura de cationes de álcali de Qbiogene. Se identificaron cepas complementadas por crecimiento en medio que no contenía Tween® 80 (suplemento de ácidos grasos monoinsaturados) o uracilo (DOBA sc-ura). Las cepas complementadas eran de una sola colonia purificada en medios selectivos tres veces. Las cepas complementadas se verificaron adicionalmente por amplificación por PCR del gen de delta-9 desaturasa, y la secuenciación del producto de PCR. Además, las cepas que contenían un clon LnD9DS-2 se revertieron a dependencia de ácido graso y uracilo pasando cada cepa al menos tres veces en medio de YPD + Tween 80®, y después parcheando las cepas en medios DOBA SC-URA menos Tween® 80. Las especificidades de sustrato de las cepas de levadura que contenían o bien la secuencia de codificación LnD9DS-1 o LnD9DS-2 se caracterizaron adicionalmente por análisis de FAME.

Clonación y transformación de *S. cerevisiae* deficiente en delta-9 desaturasa con el gen HzD9DS

Un gen sintético optimizado para plantas que codifica la acil-CoA delta-9 desaturasa de *Helicoverpa zea* (HzD9DS) (identificado como HzPGDS2 en Rosenfield et al. (2001) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31(10):949-64) se escindió de DASPICO89 (descrito a continuación) en un fragmento de *BamHI/XhoI* y se purificó en gel usando columnas giratorias de Montage. Este fragmento se ligó en los lugares de enzimas de restricción correspondientes de un vector de expresión de levadura descrito anteriormente y se transformó en la cepa DH5α de *E. coli* usando técnicas ordinarias de biología molecular y los protocolos del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tras el análisis de restricción y secuenciación de ADN, se seleccionó un clon que contenía el gen HzD9DS para su transformación en la cepa OFY093 deficiente en delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae*. La cepa OFY093, que se mantiene en medios YPD con Tween® 80, fue transformada usando el kit de transformación de levaduras de catión alcalino (Alkali-Cation Yeast Transformation Kit) de Qbiogene. Cepas complementadas se identificaron por crecimiento en medios que no contenían Tween® 80 (suplemento de ácidos grasos) y uracilo (DOBA SC-URA). Cepas complementadas putativas se purificaron como colonias únicas en medios selectivos tres veces. Cepas complementadas se verificaron adicionalmente por: i) extracción del ADN del plásmido, usando el kit de purificación del plásmido de levadura de Qbiogene (Yeast plasmid purification kit), seguido de amplificación por PCR usando cebadores específicos del gen HzD9DS; ii) secuenciación del producto de PCR específico del gen HzD9DS; y iii) reversión de la cepa a dependencia de ácidos grasos y URA-3 pasando la cepa al menos tres veces en medios YPD

+ Tween[®] 80, y después parcheando las cepas a medios DOBA SC-URA menos Tween[®] 80. La especificidad de sustrato de una cepa de levadura complementada verificada se caracterizó adicionalmente por análisis de FAME.

Análisis de LnD9DS-1, LnD9DS-2, MgD9DS, y HzD9DS expresados en cepas de levaduras deficientes en OLE1

- 5 Como se ha indicado anteriormente, se clonaron tres genes ejemplares de acil-CoA delta-9 desaturasa (D9DS) de los hongos vegetales patógenos, *Magnaporthe grisea* (MgD9DS) y *Leptosphaeria nodorum* (LnD9DS-1 y LnD9D-2). Estos genes y sus proteínas codificadas no han sido caracterizados anteriormente. Las acil-CoA delta-9 desaturasas catalizan la formación de un doble enlace cis entre los átomos de carbono 9 y 10 de los carbonos 14-, 16-, y 18- de los acil tioésteres de coenzima A grasos, lo que resulta en la producción del ácido miristoleico (14:1), palmitoleico (16:1), u oleico (18:1), respectivamente. Los efectos relacionados con la biología específica del organismo se eliminan mediante la expresión de los diferentes genes fúngicos de acil-CoA delta-9 desaturasa en el mismo contexto biológico. La expresión de los genes fúngicos de acil-CoA delta-9 desaturasa fue conducida usando el gen promotor endógeno *ole1* con una cepa de levadura OFY093 deficiente en palmitoil-stearoil CoA desaturasa (OLE1). De este modo, las diferencias en la especificidad de los sustratos de ácido graso observadas en este sistema son atribuibles a la delta-9 desaturasa fúngica específica expresada en la cepa complementada de *S. cerevisiae*.
- 10
- 15 Las especificidades de sustrato de las CoA desaturasas MgD9DS, LnD9DS-1 y LnD9DS-2 expresadas en las cepas complementadas OYF093 se caracterizaron y compararon con OFY093 complementado con la AnD9DS (*sdeA*) descrita en el documento de patente internacional WO/1999/050430. Un constructo de expresión de levadura que contenía el gen AnD9DS, cuya expresión es impulsada por el promotor génico *ole1*, se transformó en la cepa OFY093 de *S. cerevisiae* y se expresó usando el protocolo descrito anteriormente.
- 20 Las cepas complementadas de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en medio mínimo sin suplementos de ácidos grasos a 30° C durante 24 horas. Se realizó análisis cuantitativo de FAME en sedimentos de células lavadas y liofilizadas. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 1. LnD9DS-2 promueve la formación de C14:1 y C16:1, mientras que LnD9DS-1 y MgD9DS tienen preferencia por C18:0, como se indica por la relación de ácidos grasos C16:1/18:1 en los análisis de composición de ácidos grasos de la levadura.
- 25 Tabla 1: Comparación de la composición de ácidos grasos de levaduras deficientes en *ole1* que expresan cuatro desaturasas fúngicas diferentes

Desaturasa	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C16:1/ 16:0	C18:1/ 18:0	C16:1/ 18:1
LnD9DS-1	1,5	0,0	36,5	8,7	1,8	51,5	0,2	28,2	0,17
LnD9DS-2	1,0	0,1	26,6	38,1	6,3	27,9	1,4	4,4	1,37
AnD9DS	0,5	0,0	26,3	7,8	2,0	63,4	0,3	31,7	0,12
MgD9DS	0,5	0,0	22,7	9,1	1,8	65,9	0,4	37,0	0,14
levadura tipo silvestre	0,6	0,0	9,6	38,6	6,9	44,3			
<i>ole1</i> -null + Tween [®] 80	2,6	0,4	38,0	10,9	7,8	40,4			
vector vacío + Tween [®] 80	2,2	0,3	40,3	8,7	8,7	39,8			

- 30 Las nuevas desaturasas se compararon adicionalmente a la desaturasa natural estearoil-CoA delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae* (*ole1*) transferida al mismo medio de expresión recombinante. Se construyó un vector de expresión de levadura que contenía la secuencia de nucleótido de *S. cerevisiae* descrita en el documento de patente internacional WO/2000/011012. El constructo de expresión de levadura que contenía la desaturasa natural estearoil-CoA delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae* se transformó en la cepa OFY093 de *S. cerevisiae* y se expresó usando el protocolo descrito anteriormente. Otra acil-CoA delta-9 desaturasa no fúngica de la especie de insecto, *Helicoverpa zea* (HzD9DS), se evaluó también en estos experimentos.
- 35 Cepas complementadas de *S. cerevisiae* que contenían uno de los genes MgD9DS, LnD9DS-2 y HzD9DS se cultivaron en medio Drop Out Broth SC-URA. Una cepa de control, pDAB467EV-1 (pDAB467B/N transformada en OFY093 por metodología de transformación de levaduras descrita anteriormente), se cultivó en DOB SC-URA + Tween[®] 80, y la cepa madre OFY093 deficiente en delta-9 desaturasa de *S. cerevisiae*, se cultivó en DOB scAA + Tween[®] 80. Los cultivos se inocularon con un asa de células de una placa recientemente sembrada en el mismo medio que contenía 1,5% de agar. Las cepas se cultivaron a 30° C durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron a
- 40

6.000 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos se lavaron con agua, se centrifugaron de nuevo a 6.000 rpm durante 10 minutos, y después se congelaron a -20° C hasta que se realizó el análisis de FAME. Se analizaron tres conjuntos de cultivos de expresión.

5 Los sedimentos de levadura liofilizados se saponificaron en metanol que contenía 10% (p/v) de NaOH. Se eliminaron los contaminantes lípidos no saponificables (esteroles) con hexano. La fracción de metanol se acidificó por adición de H₂SO₄, y los ácidos grasos protonados se extrajeron con hexano. La fracción de hexano aislada se secó, y los ácidos grasos se metilaron con MeOHCl 0,5 N a 80° C durante 30 minutos. Los FAMEs resultantes se extrajeron con hexano que contenía el éster de metilo de undecanoato como un estándar interno. Los extractos de FAME se analizaron con un cromatógrafo de gases HP6890 con detector de ionización de llama (Santa Clara, CA) equipado con una columna capilar BPX 70 (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm) de SGE (Austin, TX). Se separaron los FAMEs con un gradiente de temperatura usando helio como el vehículo gaseoso. Cada especie de FAME se identificó por el tiempo de retención, y se cuantificó mediante la inyección de una mezcla de referencia de FAMEs de aceite de colza de Matreya, LLC (Pleasant Gap, PA), como patrón de calibración.

15 La Tabla 2 muestra la composición de ácidos grasos (como % de FAMEs) de células de levadura OFY093 deficientes de ole1 que expresan varias acil Co-A delta-9 desaturasas de ejemplo. Todas las cepas crecieron bien y fueron totalmente complementadas por las desaturasas introducidas sin ningún requerimiento de MUFAs (ácidos grasos monoinsaturados) exógenos.

Tabla 2: Composición de ácidos grasos (como % de FAMEs totales) de la cepa de levadura OFY093 deficiente en ole1 que expresa acil Co-A delta-9 desaturasas. (La desviación estándar se indica entre paréntesis).

Desaturasa	n	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1
LnD9DS-2	7	1,4 (0,7)	1,4 (1,0)	26,6 (4,5)	38,8 (2,8)	6,0 (1,3)	25,4 (4,4)
HxD9DS	6	2,6 (1,3)	0,9 (0,5)	34,7 (6,8)	37,5 (4,2)	6,0 (1,1)	18,4 (4,1)
ole1	6	1,1 (0,4)	0,6 (0,4)	14,4 (2,6)	49,2 (1,6)	5,6 (1,1)	24,0 (1,1)
AnD9DS	8	0,5 (0,3)	0,2 (0,2)	23,5 (2,2)	9,3 (3,0)	2,1 (0,5)	64,6 (3,2)
MgD9DS	2	0,9 (0,0)	0,1 (0,0)	21,2 (0,2)	12,1 (0,1)	1,6 (0,1)	64,2 (0,3)

20 Estos datos muestran que la composición de ácidos grasos de las cepas de levadura complementadas varía según el gen introducido. LnD9DS-2 produce cantidades relativamente altas de C16:1, al igual que HxD9DS y ole1, mientras que AnD9DS y MgD9DS producen cantidades relativamente altas de C18:1.

25 La diferencia de nivel de conversión basado en la longitud de cadena se puede demostrar aún más mediante el cálculo de la proporción de ácidos grasos monoinsaturados con respecto a los ácidos grasos totales para cada longitud de la cadena de ácidos grasos; C14, C16, o C18. Estos datos muestran la relativa alta conversión a C16:1 para LnD9DS-2 y HxD9DS, y a C18:1 para AnD9DS y MgD9DS. Tabla 3. Las cuatro filas inferiores representan las muestras de control complementadas con tergitol añadido, ácidos grasos insaturados, o Tween®. Las muestras con letras diferentes son significativamente diferentes, tal como se determina mediante la prueba de Tukey-Kramer realizada con el paquete de software estadístico JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Tabla 3: Proporción de MUFA de los ácidos grasos totales para cada longitud de cadena (Cxx:1/(Cxx:0 + Cxx:1)).

Desaturasa	C14	C16*	C18
LnD9DS-2	0,49	0,60 (b)	0,81 (b)
HxD9DS	0,30	0,52 (b)	0,75 (c)
ole1	0,34	0,79 (a)	0,81 (b)
AnD9DS	0,25	0,28 (c)	0,97 (a)

Desaturasa	C14	C16*	C18
MgD9DS	0,07	0,36 (c)	0,98 (a)
Ninguna + tergitol	0,06	0	0
Ninguna + tergitol + ricinoleico	0,07	0	0,01
Ninguna + tergitol + linoleico	0	0	0,04
Ninguna + tween	0,65	0,23	0,87

* C16 MUFA incluye ácido cis-vacénico (C18:1 Δ 11), ya que se deriva del alargamiento del ácido palmitoleico (C16:1 Δ 9).

Filogenia de acil-CoA desaturasas de hongos

El análisis filogenético de múltiples secuencias de aminoácido de acil-CoA delta-9 desaturasa de hongos sugiere que LnD9DS-2 es distinta de las delta-9 desaturasas que prefieren 18:0. Por lo tanto, presentamos la hipótesis de que la caracterización de otras delta-9 desaturasas de hongos estrechamente asociadas ya sea con las delta-9 desaturasas, que prefieren 18:0 o con LnD9DS-2, puede identificar desaturasas con una gama de actividades 18:0 o 16:0. Nuestra hipótesis predice que una delta-9 desaturasa de hongos que está más estrechamente asociada con LnD9DS-2 tendrá actividad 16:0 aumentada.

Una búsqueda en las bases de datos de secuencias de ADN públicas (Broad Institute, NCBI, etc.) no identificó ninguna secuencias de genes anotados específicamente como de delta-9 desaturasas en *Magnaporthe grisea* o *Leptosphaeria nodorum*. El análisis Pfam de las secuencias del instituto Broad que fueron identificadas dentro de esta descripción indica que estas proteínas contienen citocromo B5 y motivos de desaturasa que se encuentran también en otras acil-CoA delta-9 desaturasas de hongos. Sin embargo, las proteínas no habían sido identificadas previamente como acil-CoA delta-9 desaturasas. Hemos demostrado esta función de estas proteínas por complementación en levaduras, estudios inversos, y análisis de secuencia del ADN.

Las relaciones de varias secuencias de genes de desaturasas fúngicas se analizaron filogenéticamente utilizando el método de unión al vecino a través del paquete de software MEGA. Tamura et al. (2007) Mol. Biol. and Evolution 24:1596-9. La Fig. 1 ilustra este análisis filogenético de las secuencias de desaturasas fúngicas. Estas secuencias se recuperaron mediante búsquedas BlastN de las bases de datos de secuencias NCBI usando las secuencias de aminoácidos AnD9DS (sdeA). LnD9DS-1 y MgD9DS comparten altos niveles de identidad de secuencia entre sí, comparados con LnD9DS-2. Además, una alineación ClustalW de LnD9DS-1, LnD9DS-2, y MgD9DS muestra la divergencia de LnD9DS-2 de LnD9DS-1 y MgD9DS. Figura 2. Las secuencias de nucleótidos de LnD9DS-1 y MgD9DS comparten un mayor número de pares de bases en común.

La tabla 4 y la figura 3 ilustran adicionalmente la relación filogenética de las proteínas identificadas nuevamente, LnD9DS-1, LnD9DS-2, y MgD9DS, así como AnD9DS y la desaturasa de levadura, ScOLE1. Las secuencias de aminoácidos de LnD9DS-1, MgD9DS, y AnD9DS (sdeA) comparten un mayor porcentaje de identidad entre sí en comparación con LnD9DS-2. La conservación de la identidad de los aminoácidos nos permite predecir que la especificidad del sustrato de 18:0 acil-CoA es dependiente de la secuencia conservada compartida entre LnD9DS-1, MgD9DS, y AnD9DS (sdeA). En comparación, la especificidad del sustrato de la acil-CoA de LnD9DS-2 es preferente para 16:0 como resultado de su secuencia de aminoácidos divergentes.

Tabla 4: Identidad de aminoácidos de varias secuencias de desaturasa fúngicas alineadas utilizando ClustalW.

	LnD9DS-1	LnD9DS-2	MgD9DS	LevaduraOLE1
AnD9DS (sdeA)	81%	61%	75%	49%
LnD9DS-1	--	61%	75%	47%
LnD9DS-2	61%	--	62%	49%
MgD9DS	75%	62%	--	49%

Ejemplo 2: Diseño y síntesis de genes delta-9 desaturasa optimizados de *Magnaporthe grisea*, *Helicoverpa zea*, y *Leptosphaeria nodorum*

- 5 Para obtener una mayor expresión de genes de delta-9 desaturasa de hongos en canola, hemos diseñado estos genes de modo que se expresan de manera más eficiente en las células de canola transgénica que contienen el gen heterólogo. Análisis extensivos de la secuencia de ADN de las regiones de codificación de la delta-9 desaturasa de *Magnaporthe grisea*, *Helicoverpa zea* y *Leptosphaeria nodorum* nativas descritas en este documento como SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11, respectivamente, reveló la presencia de varios motivos de secuencia que se piensan que son perjudiciales para la expresión óptima en la plantas, así como una composición de codón no óptima para dicha expresión en la planta. Para diseñar genes optimizados que codifican una proteína delta-9 desaturasa, generamos secuencias de ADN *in silico* que son más "como-la planta" (y específicamente, más "como-canola") en la naturaleza, en las que las modificaciones de las secuencias no obstaculizan la traducción o crean inestabilidad del ARNm.
- 10
- 15 Para diseñar genes optimizados de plantas que codifican una delta-9 desaturasa, se diseñaron secuencias de ADN para codificar las secuencias de aminoácidos de las desaturasa de proteínas, utilizando un código genético redundante establecido a partir de una tabla de sesgo de codones compilada a partir de las secuencias de codificación de la proteína para las plantas hospedantes particulares (es decir, canola). Los usos preferidos del codón para la canola se muestran en la tabla 5. Las columnas C y G de la Tabla 5 presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones para ese aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en las regiones de codificación de *Brassica napus*. Es evidente que algunos codones sinónimos para algunos aminoácidos se encuentran solamente raramente en genes de plantas (por ejemplo, CGG en canola). Se consideró que un codón rara vez se usaba si estaba representado aproximadamente 10% o menos de las veces para codificar el aminoácido relevante en los genes de cualquier tipo de planta (indicado por "DNU" en las columnas D y H de la tabla 5). Para equilibrar la distribución de las opciones de los codones restantes para un aminoácido, se calculó una representación media ponderada para cada codón, usando la fórmula:
- 20
- 25

$$\text{Promedio ponderado \% de C1} = 1/(\%C1+\%C2+\%C3+ \text{etc}) \times \%C1 \times 100,$$

- 30 donde C1 es el codón en cuestión y %C2, %C3, etc. representa el promedio de los valores de % para *Brassica napus* de los codones sinónimo remanentes (valores de % promedio para codones relevantes se toman de las columnas C y G) de la tabla 5.

El valor % del promedio ponderado para cada codón se da en las columnas D y H de la tabla 5.

Tabla 5: Representación de los codones sinónimo en las regiones de codificación de los genes de la canola (*B. napus*) (Columnas C y G). Valores para una representación de sesgo equilibrado de codones establecida para un diseño de genes sintéticos optimizado para las plantas están en las columnas D y H.

A	B	C	D	E	F	G	H
Aminoácido	Codón	Canola %	Promedio ponderado	Aminoácido	Codón	Canola %	Promedio ponderado
ALA (A)	GCA	23,3	23,3	LEU (L)	CTA	10,1	DNU
	GCC	21,2	21,2		CTC	22,8	28,5
	GCG	14,2	14,2		CTG	11,6	14,6
	GCT	41,3	41,3		CTT	25,2	31,6
ARG (R)	AGA	31,8	43,8	LYS (K)	TTA	10,1	DNU
	AGG	22,1	30,5		TTG	20,2	25,3
	CGA	9,9	DNU	MET (M)	AAA	44,6	44,6
	CGC	8,9	DNU		AAG	55,4	55,4
	CGG	8,6	DNU	PHE (F)	ATG	100,0	100,0
	CGT	18,6	25,7		TTC	58,6	58,6
ASN (N)	AAC	62,6	62,6	PRO (P)	TTT	41,4	41,4
	AAT	37,4	37,4		CCA	29,6	29,6
ASP (D)	GAC	42,5	42,5	SER (S)	CCC	14,6	14,6
	GAT	57,5	57,5		CCG	18,4	18,4
CYS (C)	TGC	49,2	49,2		CCT	37,3	37,3
	TGT	50,8	50,8	AGC	16,0	17,9	
END	TAA	38,5	DNU	AGT	14,1	15,8	
	TAG	22,1	DNU	TCA	18,2	20,4	
	TGA	39,4	100,0	TCC	16,7	18,7	
GLN (Q)	CAA	50,0	50,0	TCG	10,7	DNU	
	CAG	50,0	50,0	TCT	24,3	27,2	
GLU (E)	GAA	43,6	43,6	THR (T)	ACA	26,3	26,3
	GAG	56,4	56,4		ACC	26,9	26,9

A	B	C	D	E	F	G	H
Aminoácido	Codón	Canola %	Promedio ponderado	Aminoácido	Codón	Canola %	Promedio ponderado
GLY (G)	GGA	36,4	36,4		ACG	16,9	16,9
	GGC	16,2	16,2		ACT	30,0	30,0
	GGG	15,2	15,2	TRP (W)	TGG	100,0	100,0
	GGT	32,1	32,1	TYR (Y)	TAC	59,4	59,4
HIS (H)	CAC	49,6	49,6		TAT	40,6	40,6
	CAT	50,4	50,4	VAL (V)	GTA	10,8	DNU
ILE (I)	ATA	21,1	21,1		GTC	24,1	27,0
	ATC	42,7	42,7		GTG	28,3	31,7
	ATT	36,2	36,2		GTT	36,8	41,3
**NA = No Aplicable							
***DNU = No utilizar							

- 5 Se diseñaron nuevas secuencias de ADN que codifican esencialmente la secuencia de aminoácidos de las delta-9 desaturasas de la SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14, de *Magnaporthe grisea*, *Helicoverpa zea*, y *Leptosphaeria nodorum* respectivamente, para la expresión óptima en canola utilizando una distribución de codones de primera y segunda elección de los codones frecuentemente usados encontrados en los genes de canola. Las nuevas secuencias de ADN se diferencian de las secuencias de ADN nativas que codifican las proteínas de delta-9 desaturasas por la sustitución de codones preferidos de la planta (o sea, el primer preferido, segundo preferido, tercer preferido, o cuarto preferido) para especificar un aminoácido apropiado en cada posición dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína.
- 10 El diseño de las secuencias de ADN optimizadas para la planta se inició por traducción inversa de las secuencias de proteínas de SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:14, usando una tabla de sesgo de codón de canola construida desde la tabla 5 columnas D y H. Las secuencias iniciales fueron después modificadas compensando los cambios de codón (mientras que se retiene la representación total del promedio ponderado del codón) para eliminar los lugares de reconocimiento de las enzimas de restricción, eliminar las estructuras secundarias intrahebra altamente estables, y eliminar otras secuencias que pudieran ser perjudiciales para las manipulaciones de la clonación o expresión del gen construido por ingeniería en las plantas. Las secuencias de ADN fueron entonces reanalizadas para lugares de reconocimiento de las enzimas de restricción que podrían haber sido creados por las modificaciones. Los lugares identificados fueron después adicionalmente modificados por reemplazamiento de los codones relevante con codones preferidos de primera, segunda, tercera, o cuarta elección. Las secuencias modificadas fueron analizadas adicionalmente y modificadas adicionalmente para reducir la frecuencia de los dobles TA y CG, y aumentar la frecuencia de dobles TG y CT. Además de estos dobles, bloques de secuencias que tenían más de alrededor de seis residuos consecutivos de [G+C] o [A+T] fueron modificados mediante la sustitución de los codones de primera elección o segunda elección, etc. con otros codones preferidos de elección. Codones utilizados raramente no se incluyeron en un grado sustancial en el diseño de genes, y se utilizaron solo cuando fue necesario para dar cabida a un criterio de diseño diferente de la composición del codón *per se* (por ejemplo, adición o delección de los lugares de reconocimiento de las enzimas de restricción). Las secuencias del ADN de las desaturasas sintéticas optimizadas de canola de ejemplo diseñadas por este procedimiento se listan en la SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:17.
- 20
- 25
- 30 Las secuencias resultantes de ADN, tal como se representan por la SEQ ID NOs: 15-17, tienen un mayor grado de diversidad de codones y una composición de bases deseable. Además, estas secuencias contienen estratégicamente colocados lugares de reconocimiento de enzimas de restricción y no tienen secuencias que puedan interferir con la transcripción del gen, o la traducción de ARNm del producto. Las tablas 6-8 presentan una

comparación de las composiciones de los codones de las regiones de codificación para las proteínas de delta-9 desaturasa como se encuentran en los genes nativos, y en las versiones optimizadas para las plantas, y compara ambas a las recomendaciones de composición del codon para una secuencia optimizada para la planta como se calcula a partir de las columnas D y H de la tabla 5.

Tabla 6: Composiciones de codones de las regiones de codificación para una proteína de MgD9DS. La región de codificación de la desaturasa de *M. grisea* nativa se compara a una versión optimizada para plantas.

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. planta	Aminoácido de	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. planta
ALA (A)	GCA	4	10,5	10	26,3	23,3	LEU (L)	CTA	0	0,0	0	0,0	0,0
	GCC	18	47,4	8	21,1	21,2		CTC	11	28,9	11	28,9	28,5
	GCG	3	7,9	4	10,5	14,2		CTG	11	28,9	5	13,2	14,6
	GCT	13	34,2	16	42,1	41,3		CTT	12	31,6	12	31,6	31,6
ARG (R)	AGA	2	9,5	10	47,6	43,8		TTA	0	0,0	0	0,0	0,0
	AGG	1	4,8	6	28,6	30,5		TTG	4	10,5	10	26,3	25,3
	CGA	2	9,5	0	0,0	0,0	LYS (K)	AAA	1	3,4	13	44,8	44,6
	CGC	12	57,1	0	0,0	0,0		AAG	28	96,6	16	55,2	55,4
	CGG	0	0,0	0	0,0	0,0	MET (M)	ATG	7	100	7	100	100,0
	CGT	4	19,0	5	23,8	25,7	PHE (F)	TTC	17	89,5	11	57,9	58,6
ASN (N)	AAC	23	100,0	14	60,9	62,6		TTT	2	10,5	8	42,1	41,4
	AAT	0	0,0	9	39,1	37,4	PRO (P)	CCA	0	0,0	6	28,6	29,6
ASP (D)	GAC	17	68,0	11	44,0	42,5		CCC	9	42,9	3	14,3	14,6
	GAT	8	32,0	14	56,0	57,5		CCG	5	23,8	4	19,0	18,4

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. planta	Aminoácido de	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. planta
CYS (C)	TGC	2	66,7	1	33,3	49,2		CCT	7	33,3	8	38,1	37,3
	TGT	1	33,3	2	66,7	50,8	SER (S)	AGC	3	10,7	5	17,9	17,9
END	TAA	0	0,0	0	0,0	0,0		AGT	0	0,0	4	14,3	15,8
	TAG	0	0,0	0	0,0	0,0		TCA	5	17,9	7	25,0	20,4
GLN (Q)	TGA	1	100,0	1	100,0	100,0		TCC	9	32,1	4	14,3	18,7
	CAA	2	9,5	11	52,4	50,0		TCG	9	32,1	0	0,0	0,0
GLU (E) 16	CAG	19	90,5	10	47,6	50,0		TCT	2	7,1	8	28,6	27,2
	GAA	1	6,7	7	46,7	43,6	THR (T)	ACA	4	16,7	6	25,0	26,3
GLY (G)	GAG	14	93,3	8	53,3	56,4		ACC	15	62,5	7	29,2	26,9
	GGA	8	19,5	15	36,6	36,4		ACG	1	4,2	4	16,7	16,9
HIS (H)	GGC	13	31,7	7	17,1	16,2		ACT	4	16,7	7	29,2	30,0
	GGT	19	46,3	13	31,7	32,1	TRP (W)	TGG	21	100	21	100	100,0
HIS (H)	CAC	19	95,0	10	50,0	49,6	TYR (Y)	TAC	16	94,1	10	58,8	59,4
	CAT	1	5,0	10	50,0	50,4	VAL (V)	TAT	1	5,9	7	41,2	40,6
								GTA	1	2,5	0	0,0	0,0

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. planta
ILE (I)	ATA	1	4,2	5	20,8	21,1		GTC	21	52,5	11	27,5	27,0
	ATC	15	62,5	10	41,7	42,7		GTG	4	10,0	13	32,5	31,7
	ATT	8	33,3	9	37,5	36,2		GTT	14	35,0	16	40,0	41,3
	Totales	232		232				Totales	244		244		

Tabla 7: Composiciones de codones de las regiones de codificación para la proteína HzD9DS. La región codificante de la desaturasa nativa *H. zea* se compara con una versión optimizada para la planta.

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. planta
ALA (A)	GCA	4	11,4	9	25,7	23,3	LEU (L)	CTA	2	5,9	0	0,0	0,0
	GCC	7	20,0	7	20,0	21,2		CTC	8	23,5	10	29,4	28,5
	GCG	8	22,9	4	11,4	14,2		CTG	14	41,2	6	17,6	14,6
	GCT	16	45,7	15	42,9	41,3		CTT	6	17,6	10	29,4	31,6
ARG (R)	AGA	1	7,7	6	46,2	43,8		TTA	2	5,9	0	0,0	0,0
	AGG	5	38,5	4	30,8	30,5		TTG	2	5,9	8	23,5	25,3
	CGA	2	15,4	0	0,0	0,0	LYS (K)	AAA	11	44,0	10	40,0	44,6
	CGC	5	38,5	0	0,0	0,0		AAG	14	56,0	15	60,0	55,4
	CGG	0	0,0	0	0,0	0,0	MET (M)	ATG	8	100	8	100	100,0
	CGT	0	0,0	3	23,1	25,7	PHE (F)	TTC	20	83,3	14	58,3	58,6
ASN (N)	AAC	13	72,2	11	61,1	62,6		TTT	4	16,7	10	41,7	41,4
	AAT	5	27,8	7	38,9	37,4	PRO (P)	CCA	1	6,3	5	31,3	29,6
ASP (D)	GAC	16	64,0	12	48,0	42,5		CCC	5	31,3	3	18,8	14,6
	GAT	9	36,0	13	52,0	57,5		CCG	2	12,5	2	12,5	18,4
CYS (C)	TGC	1	100,0	0	0,0	49,2		CCT	8	50,0	6	37,5	37,3

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. planta
	TGT	0	0,0	1	100,0	50,8	SER (S)	AGC	2	12,5	3	18,8	17,9
END	TAA	1	100,0	0	0,0	0,0		AGT	1	6,3	3	18,8	15,8
	TAG	0	0,0	0	0,0	0,0		TCA	1	6,3	3	18,8	20,4
	TGA	0	0,0	1	100,0	100,0		TCC	6	37,5	3	18,8	18,7
GLN (Q)	CAA	2	33,3	3	50,0	50,0		TCG	3	18,8	0	0,0	0,0
	CAG	4	66,7	3	50,0	50,0		TCT	3	18,8	4	25,0	27,2
GLU (E)	GAA	7	63,6	5	45,5	43,6	THR (T)	ACA	3	16,7	5	27,8	26,3
16	GAG	4	36,4	6	54,5	56,4		ACC	7	38,9	5	27,8	26,9
GLY (G)	GGA	8	40,0	9	45,0	36,4		ACG	4	22,2	3	16,7	16,9
	GGC	6	30,0	4	20,0	16,2		ACT	4	22,2	5	27,8	30,0
	GGG	2	10,0	3	15,0	15,2	TRP (W)	TGG	14	100	14	100	100,0
	GGT	4	20,0	4	20,0	32,1	TYR (Y)	TAC	12	80,0	9	60,0	59,4
HIS (H)	CAC	11	73,3	8	53,3	49,6		TAT	3	20,0	6	40,0	40,6
	CAT	4	26,7	7	46,7	50,4	VAL (V)	GTA	0	0,0	0	0,0	0,0
ILE (I)	ATA	3	15,0	4	20,0	21,1		GTC	5	26,3	5	26,3	27,0
	ATC	10	50,0	9	45,0	42,7		GTG	13	68,4	6	31,6	31,7

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. planta
	ATT	7	35,0	7	35,0	36,2		GTT	1	5,3	8	42,1	41,3
	Totales	165		165				Totales	189		189		

Tabla 8: Composiciones de codones de las regiones de codificación para una proteína LnD9DS-2. La región de codificación de la *L. nodorum* desaturasa nativa se compara con una versión optimizada para plantas.

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. planta	Optim. de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. planta	Recom. optim. de planta
ALA (A)	GCA	3	9,4	7	21,9	23,3		LEU (L)	CTA	7	15,6	0	0,0	0,0	
	GCC	9	28,1	7	21,9	21,2			CTC	14	31,1	13	28,9	28,5	
	GCG	12	37,5	5	15,6	14,2			CTG	7	15,6	7	15,6	14,6	
	GCT	8	25,0	13	40,6	41,3			CTT	5	11,1	14	31,1	31,6	
ARG (R)	AGA	4	13,8	13	44,8	43,8			TTA	3	6,7	0	0,0	0,0	
	AGG	3	10,3	9	31,0	30,5			TTG	9	20,0	11	24,4	25,3	
	CGA	7	24,1	0	0,0	0,0		LYS (K)	AAA	9	45,0	9	45,0	44,6	
	CGC	8	27,6	0	0,0	0,0			AAG	11	55,0	11	55,0	55,4	
	CGG	5	17,2	0	0,0	0,0		MET (M)	ATG	9	100	9	100	100,0	
	CGT	2	6,9	7	24,1	25,7		PHE (F)	TTC	16	80,0	12	60,0	58,6	
ASN (N)	AAC	6	50,0	8	66,7	62,6			TTT	4	20,0	8	40,0	41,4	
	AAT	6	50,0	4	33,3	37,4		PRO (P)	CCA	3	16,7	5	27,8	29,6	
ASP (D)	GAC	16	66,7	10	41,7	42,5			CCC	8	44,4	3	16,7	14,6	
	GAT	8	33,3	14	58,3	57,5			CCG	2	11,1	3	16,7	18,4	
CYS (C)	TGC	4	80,0	2	40,0	49,2			CCT	5	27,8	7	38,9	37,3	

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. planta	Optim. de	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. planta	Recom. optim. de planta
	TGT	1	20,0	3	60,0	50,8		SER (S)	AGC	8	27,6	5	17,2	17,9	
END	TAA	0	0,0	0	0,0	0,0			AGT	6	20,7	5	17,2	15,8	
	TAG	1	100,0	0	0,0	0,0			TCA	1	3,4	6	20,7	20,4	
	TGA	0	0,0	1	100,0	100,0			TCC	6	20,7	5	17,2	18,7	
GLN (Q)	CAA	10	55,6	10	55,6	50,0			TCG	7	24,1	0	0,0	0,0	
	CAG	8	44,4	8	44,4	50,0			TCT	1	3,4	8	27,6	27,2	
GLU (E)	GAA	5	33,3	7	46,7	43,6		THR (T)	ACA	11	44,0	7	28,0	26,3	
16	GAG	10	66,7	8	53,3	56,4			ACC	5	20,0	7	28,0	26,9	
GLY (G)	GGA	13	34,2	14	36,8	36,4			ACG	7	28,0	4	16,0	16,9	
	GGC	16	42,1	6	15,8	16,2			ACT	2	8,0	7	28,0	30,0	
	GGG	6	15,8	6	15,8	15,2		TRP (W)	TGG	19	100	19	100	100,0	
	GGT	3	7,9	12	31,6	32,1		TYR (Y)	TAC	11	64,7	10	58,8	59,4	
HIS (H)	CAC	12	66,7	9	50,0	49,6			TAT	6	35,3	7	41,2	40,6	
	CAT	6	33,3	9	50,0	50,4		VAL (V)	GTA	6	17,6	0	0,0	0,0	
ILE (I)	ATA	4	18,2	5	22,7	21,1			GTC	10	29,4	9	26,5	27,0	
	ATC	9	40,9	10	45,5	42,7			GTG	12	35,3	11	32,4	31,7	

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. Optim. de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen optim. para planta	%Gen optim. para planta	Recom. optim. de planta
	ATT	9	40,9	7	31,8	36,2		GTT	6	17,6	14	41,2	41,3
	Totales	214		214				Totales	236		236		

La síntesis de fragmentos de ADN que comprenden la SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:17 fue realizada por proveedores comerciales (PicoScript, Houston, TX y Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). Estas secuencias de canola optimizadas fueron etiquetadas como versión 2 (v2). Los fragmentos de ADN sintéticos fueron después clonados en vectores de expresión y se transformaron en *Agrobacterium* y canola como se describe en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 3: Construcción de los plásmidos

Los siguientes plásmidos se construyeron usando técnicas de biología molecular estándar. Los fragmentos de polinucleótido que contenían unidades de transcripción de la planta (que comprendían un promotor unido a un gen de interés, terminado por un 3' UTR), o "PTUs", fueron construidas y combinadas con unidades de transcripción de la planta adicionales dentro de la región de la hebra-T de un vector binario.

Descripción de pDAB7318: pDAB7318 (Fig. 6; SEQ ID NO: 58) se construyó utilizando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene dos secuencias de PTU desaturasa. La primera PTU desaturasa contiene el promotor de *Phaseolus vulgaris*, faseolina (promotor PvPhas v2 (SEQ ID NO:67); Genbank: J01263), la región 5' no traducida de *Phaseolus vulgaris* (5' UTR de PvPhas (SEQ ID NO:68); Genbank: J01263), el gen AnD9DS v3 (SEQ ID NO:49), la región 3' no traducida de *Phaseolus vulgaris* (3' UTR de PvPhas v1 (SEQ ID NO:69); Genbank: J01263) y la región de unión a la matriz de *Phaseolus vulgaris* (3' MAR de PvPhas v2 (SEQ ID NO:70); Genbank: J01263). La segunda PTU desaturasa contiene el promotor PvPhasv2, la 5' UTR de PvPhas, LnD9DS-2 v2 (SEQ ID NO:17), y la región 3' no traducida de ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (3' UTR AtuORF23 (SEQ ID NO:71); Huang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22).

Los elementos en las PTU desaturadas están conectados por secuencias cortas adicionales intervinientes. Las dos secuencias de PTU desaturadas están flanqueadas por lugares de recombinación Gateway[®] de Invitrogen, que se utilizan para facilitar la transferencia de estas casetes de expresión de PTU en el plásmido de transformación de *Agrobacterium*. Adicionalmente, el plásmido contiene un origen de replicación, y un marcador seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7319: pDAB7319 (Fig. 7; SEQ ID NO: 60) se construyó por medio de recombinación por Gateway[®] entre pDAB7318 y pDAB7309 (Fig. 5; SEQ ID NO:53). Este plásmido contiene las dos secuencias de PTU desaturasa establecidas en el anterior apartado "Description de pDAB7318". Estas PTUs se orientaron en una orientación cabeza a cola dentro de las regiones del margen de la hebra T del ADN del vector binario de transformación de plantas, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU fosfinotricinacetil transferasa, que consiste en el promotor del virus del mosaico de la vena de Cassava (promotor CsVMV v2; Verdaguer et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39); fosfinotricin acetil transferasa (PAT v5; Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37); y la región 3' no traducida de ORF1 de *Agrobacterium tumefaciens* (3' UTR de AtuORF1 v4; Huang et al. (1990), *supra*), en adición a otros elementos reguladores tales como la región de unión a la matriz RB7 de *Nicotiana tabacum* (RB7 MAR v2; Genbank: U67919), Overdrive (Toro et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(22):8558-62), y las secuencias de borde de la hebra T (T-DNA Border A and T-DNA Border B; Gardner et al. (1986) Science 231:725-7, y documento de patente internacional PCT No. WO2001/025459A1). Los plásmidos que contienen las PTUs descritas anteriormente fueron aislados y confirmados por medio de la digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

Descripción de pDAB7320: pDAB7320 (Fig. 8; SEQ ID NO: 55) se construyó usando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene una secuencia de PTU desaturasa. La PTU desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, 5' UTR de PvPhas, LnD9DS-2 v2 (SEQ ID NO:17), y la 3' UTR de AtuORF23. Los elementos en las PTU desaturadas están conectados por secuencias intervinientes cortas adicionales. La secuencia de PTU desaturasa también está flanqueada por lugares de recombinación Gateway[®] de Invitrogen para facilitar su transferencia a un plásmido de transformación de *Agrobacterium*. Adicionalmente, el plásmido contiene un origen de replicación y un marcador seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7321: pDAB7321 (Fig. 9; SEQ ID NO:61) se construyó por medio de recombinación con Gateway[®] entre pDAB7320 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia de PTU desaturasa establecida en el apartado precedente "Descripción de pDAB7319". Esta PTU fue orientada en una orientación cabeza-cola en las regiones de margen del ADN de la hebra T del vector binario de transformación de la planta, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU acetiltransferasa de fosfinotricina: promotor CsVMV v2; PAT v5; y 3' UTR de AtuORF1 v4, en adición a otros elementos reguladores tales como Overdrive y secuencias de borde de la hebra T (T-DNA border A y T DNA border B). Los plásmidos que contienen la PTU descrita anteriormente fueron aislados y confirmados por medio de la digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

Descripción de pDAB7323: pDAB7323 (Fig.10; SEQ ID NO: 56) se construyó usando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene dos secuencias de PTU desaturasa. La primera PTU desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, 5' UTR de PvPhas, AnD9DS v3 (SEQ ID NO:47), 3' UTR de PvPhas, y 3' MAR de PvPhas v2. La segunda PTU desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, 5' UTR de PvPhas, HzD9DS v2 (SEQ ID NO:16), y 3' UTR de AtuORF23. Los elementos en las PTU desaturadas están conectados por secuencias intervinientes cortas adicionales. Las dos secuencias de PTU desaturadas están flanqueadas por lugares de recombinación Gateway[®] de

Invitrogen para facilitar su transferencia a un plásmido de transformación de *Agrobacterium*. Adicionalmente, el plásmido contiene un origen de replicación y un marcador seleccionable de kanamicina.

5 Descripción de pDAB7324: pDAB7324 (Fig.11; SEQ ID NO:62) fue construido por medio de recombinación por Gateway® entre pDAB7323 y pDAB7309. Este plásmido contiene las dos secuencias de PTU desaturasa establecidas en el epígrafe precedente "Descripción de pDAB7323". Estas PTUs se orientaron en una orientación cabeza a cola dentro de las regiones de borde de la hebra T de ADN del vector binario de transformación de plantas, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU fosfotricina acetiltransferasa: promotor CsVMV v2; PAT v5; y 3' UTR de AtuORF1 v4, además de otros elementos reguladores tales como Overdrive y secuencias de borde de hebra T (T-ADN Border A y T-ADN Border B). Los plásmidos que contenían las PTUs descritas anteriormente fueron aislados y confirmados por medio de la digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

10 Descripción de pDAB7325: pDAB7325 (Fig.12; SEQ ID NO: 57) se construyó usando técnicas estándar de biología molecular. Este plásmido contiene una secuencia de PTU desaturasa. Esta PTU desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, 5' UTR de PvPhas, HzD9DS v2 (SEQ ID NO:16), y 3' UTR de AtuORF23. Los elementos en la PTU desaturasa están conectados por secuencias intervinientes cortas adicionales, y la secuencia PTU desaturasa está flanqueada por lugares de recombinación por Gateway® de Invitrogen para facilitar su transferencia a un plásmido de transformación de *Agrobacterium*. Adicionalmente, el plásmido contiene un origen de replicación y un marcador seleccionable de kanamicina.

15 Descripción de pDAB7326: pDAB7326 (Fig.13; SEQ ID NO:63) se contruyó por medio de recombinación Gateway® entre pDAB7325 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia de PTU desaturasa establecida en el epígrafe precedente "Descripción de pDAB7325". La PTU fue orientada en la orientación cabeza cola dentro de las regiones de borde de la hebra T del ADN del vector binario de transformación, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU fosfotricina acetiltransferasa: promotor CsVMV v2; PAT v5; y 3' UTR de AtuORF1 v4, además de otros elementos reguladores tales como Overdrive y secuencias de borde de hebra T (T-ADN Border A y T-ADN Border B). Los plásmidos que contenían la PTU descrita anteriormente fueron aislados y confirmados por medio de la digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

20 Descripción de pDAB7327: pDAB7327 (Fig. 14; SEQ ID NO: 58) se construyó utilizando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene una secuencia de PTU desaturasa. La PTU desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, 5' UTR de PvPhas, gen AnD9DS v3 (SEQ ID NO:49), y 3' UTR de AtuORF23. Los elementos en la PTU desaturasa están conectados por secuencias intervinientes cortas adicionales. La secuencia de PTU desaturasa también está flanqueada por lugares de recombinación de Gateway® de Invitrogen para facilitar su transferencia a un plásmido de transformación *Agrobacterium*. Adicionalmente, el plásmido contiene un origen de replicación y un marcador seleccionable de kanamicina.

25 Descripción de pDAB7328: pDAB7328 (Fig.15; SEQ ID NO: 64) fue construido por medio de recombinación Gateway® de pDAB7327 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia de la PTU desaturasa establecida en el epígrafe precedente "Description de pDAB7327". La PTU fue orientada en la orientación cabeza cola dentro de las regiones de borde de la hebra T del ADN del vector binario de transformación, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU de fosfotricina acetiltransfera: promotor CsVMV v2; PAT v5; y 3' UTR de AtuORF1 v4, además de otros elementos reguladores tales como Overdrive y secuencias de borde de hebra T (T-ADN Border A y T-ADN Border B). Los plásmidos que contenían la PTU descrita anteriormente fueron aislados y confirmados por medio de la digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

30 Descripción de pDAB7329: pDAB7329 (Fig.16; SEQ ID NO: 59) fue construido usando técnicas estándar de biología molecular. Este plásmido contiene una secuencia de PTU desaturasa, que contiene el promotor PvPhas v2, 5' UTR de PvPhas, MgD9DS v2 (SEQ ID NO:15), y 3' UTR de AtuORF23. Los elementos en esta PTU desaturasa están conectados por secuencias intervinientes cortas adicionales. La secuencia de PTU desaturasa está flanqueada por lugares de recombinación de Gateway® de Invitrogen para facilitar su transferencia a un plásmido de transformación de *Agrobacterium*. Adicionalmente, el plásmido contiene un origen de replicación y un marcador seleccionable de kanamicina.

35 Descripción de pDAB7330: pDAB7330 (Fig.17; SEQ ID NO: 65) fue construido por medio de Gateway® por recombinación entre pDAB7329 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia de PTU desaturasa establecida en el epígrafe precedente "Descripción de pDAB7325". Esta PTU fue orientada en la orientación cabeza cola dentro de las regiones de borde de la hebra T del ADN del vector binario de transformación, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU de fosfotricina acetiltransfera: promotor CsVMV v2; PAT v5; y 3' UTR de AtuORF1 v4, además de otros elementos reguladores tales como Overdrive y secuencias de borde de hebra T (T-ADN Border A y T-ADN Border B). Los plásmidos que contenían la PTU descrita anteriormente fueron aislados y confirmados por medio de la digestión con enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

40 Descripción de pDAB7331: además de los anteriores, se construyó un plásmido de control que no contenía una PTU desaturasa (SEQ ID NO: 66). Fig.18. Esta construcción sólo contenía una PTU de fosfotricina acetil transferasa, además de los otros elementos reguladores descritos en pDAB7309.

Ejemplo 4: Transformación de *Agrobacterium*

Se prepararon células de *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes (tabla 9) usando un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002) "How to Transform *Arabidopsis*", capítulo 5, en *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 50 µl de células competentes de *Agrobacterium* fueron descongeladas sobre hielo, y fueron transformadas usando de 300 a 400 ng de ADN del vector plásmido binario. La mezcla de células se sometió a electroporación en presencia de ADN, utilizando cubetas de electroporación anteriormente refrigeradas (0,2 cm), y un electroporador Bio-Rad Gene Pulser® (Hercules, California) en las siguientes condiciones: voltaje: 2,5 kV, longitud del pulso: 5 milisegundos, salida de la capacitancia 25 µF, resistencia 200 Ω. Después de la electroporación, se añadió a cada cubeta 1 ml de caldo YEP (extracto de levadura (10 g/l), peptona (10 g/l), y NaCl (5 g/l)), y la suspensión de células YEP se transfirió a un tubo de cultivo de 15 ml. Las células fueron incubadas a 28° C con agitación suave durante 4 horas, después de ello el cultivo se sembró en placas de agar + YEP con la selección apropiada según la tabla 9. Las placas se incubaron durante de 2-4 días a 28° C, y las colonias fueron seleccionadas y sembradas en placas de YEP + agar con selección de antibióticos e incubadas a 28° C durante de 1-3 días. Las colonias fueron verificadas como de *Agrobacterium* usando el test de cetolactosa, y las colonias positivas a cetolactosa fueron aisladas a continuación usando dos pases de aislamiento de una única colonia. Se hizo una placa de parche final de las colonias después de que el aislamiento de la colonia única se completara.

Tabla 9. Cepas de *Agrobacterium* y selección de antibióticos.

Cepa	Selección genómica	Selección de AyudanteTi	Selección del vector binario
Z707S	Estreptomicina	Kanamicina	Espectinomicina
DA2569	Eritromicina	Kanamicina	Espectinomicina
EHA105	Estreptomicina	no disponible	Espectinomicina
DA2552	Eritromicina	ninguno	Espectinomicina

Validación de la colonia de *Agrobacterium*: se usó análisis de digestión por restricción para verificar la presencia del plásmido intacto utilizando enzimas de digestión por restricción específicas para el vector. Se usó el kit de ADN de plásmidos de Macherey-Nagel NucleoBond® según las recomendaciones del protocolo recomendado por el fabricante para purificar el ADN del plásmido de las colonias de *Agrobacterium* transformadas seleccionadas. El ADN del plásmido del vector binario usado en la transformación del *Agrobacterium* fue incluido como control. Se realizaron cuatro reacciones separadas de digestión utilizando de 0,75-1 µg de ADN. La reacción se dejó funcionar durante de 1-2 horas, y luego se analizó por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Se seleccionaron las colonias para las que los productos de digestión de todas las enzimas fueran idénticas al plásmido de control y coincidían con los tamaños de las bandas esperados.

Se usó *A. tumefaciens* cepa LBA404 (Invitrogen Carlsbad, California) para la transformación de *Arabidopsis*, y *A. tumefaciens* cepa Z707S (Hepburn et al. (1985) J. Gen. Microbiol. 131:2961-9) para la transformación de canola.

Ejemplo 5: Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium*

Transformación de Arabidopsis: *Arabidopsis* se transformó usando un método de inmersión floral basado en el método de Clough y Bent (1998) Plant J. 16:735-743. Se usó una colonia seleccionada de *Agrobacterium* para inocular uno o más de precultivos de 30 ml de caldo YEP que contenían los antibióticos apropiados para la selección. El (los) cultivo(s) se incubaron durante la noche a 28° C con agitación constante a 220 rpm. Cada precultivo se usó para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP que contenían los antibióticos para la selección, y los cultivos se incubaron durante la noche a 28° C con agitación constante. Después las células se colocaron en placas a aproximadamente 8700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante resultante se desechó. El sedimento celular se resuspendió suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contenía: 1/2 de sales de Murashige y Skoog/vitaminas B5 de Gamborg's, 10% (p/v) de sacarosa, 0,044 µM de bencilaminopurina (10 µl/litro de solución madre de 1 mg/ml en DMSO), y 300 µl/litro Silwet® L-77. Se sumergieron plantas de aproximadamente 1 mes de edad en el medio durante 15 segundos, teniendo cuidado de sumergir la inflorescencia más nueva. Las plantas se colocaron entonces de lado en posición horizontal, y se cubrieron (cubierta transparente u opaca) durante 24 horas, después se lavaron con agua, y se colocaron en posición vertical. Las plantas se cultivaron a 22° C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se recogieron las semillas de las plantas.

Condiciones de cultivo de *Arabidopsis thaliana*: las semillas recién recogidas se secaron durante 7 días a temperatura ambiente en presencia de un desecante. Después del secado, las semillas se suspendieron en una

solución al 0,1% de agarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las semillas suspendidas se almacenaron a 4° C durante 2 días para completar los requisitos de latencia y asegurar la germinación sincronizada de las semillas (estratificación). Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) se cubrió con vermiculita fina y se subirrigó con solución de Hoaglan hasta la humidificación. La mezcla de tierra se drenó durante 24 horas. Las semillas estratificadas se sembraron en la vermiculita y se cubrieron con bóvedas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días. Se germinaron las semillas, y las plantas se cultivaron en un controlador Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a una intensidad de la luz de 120-150 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$ segundo a temperatura (22° C) y humedad (40-50%) constantes. Las plantas se regaron inicialmente con una solución de Hoaglan, y después con agua desionizada a fin de mantener el suelo húmedo pero no seco. Cerca de la cosecha de las semillas (1-2 semanas antes de la cosecha) las plantas se secaron.

Selección de plantas T₁ transformadas: las semillas de T₁ se sembraron en bandejas de germinación de 10,5" x 21" (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) como se describió anteriormente y se cultivaron en las condiciones señaladas. Las bóvedas se eliminaron de 5-6 días después de la siembra, 5 días después de la siembra, y de nuevo 10 días después de la siembra, y se rociaron las plántulas con una solución de herbicida de glufosinate al 0,20% (Liberty) en un volumen de pulverización de 10 ml/bandeja (703 l/ha) usando una boquilla de pulverización de aire comprimido DeVilbiss para ofrecer una tasa efectiva de 280 g/ha de glufosinato por aplicación. 10 ml de la solución herbicida de glufosinato se pipeteó en un vial de centelleo de 20 ml para cada bandeja a pulverizar. La pulverización se aplicó usando un patrón de aplicación horizontal y vertical. Después de cada pulverización, se añadió una etiqueta de pulverización con el nombre del herbicida, tasa de aplicación, y fecha de aplicación a cada bandeja de selección. De 4 a 7 días después de la segunda pulverización, se identificaron las plantas resistentes al herbicida y se trasplantaron a macetas preparadas con la mezcla Sunshine LP5. Las plantas trasplantadas se colocaron en un invernadero en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. De seis a ocho semanas después del trasplante, las semillas de cada planta se recogieron y se almacenaron por separado con un número de identificación único.

Ejemplo 7: Transformación de canola mediada por *Agrobacterium*

Preparación de *Agrobacterium*: cepas de *Agrobacterium* que contenían ya sea pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, pDAB7330 o pDAB7331 se usaron para inocular en surcos placas de YEP (Bacto Peptona (20,0 g/l) y extracto de levadura (10,0 g/l)) que contenían estreptomina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml), y se incubaron durante 2 días a 28° C. Un asa de la placa de surco de 2 días se inoculó con 150 ml de YEP líquido modificado con estreptomina (100 mg/ml) y espectinomicina (50 mg/ml) en frascos Erlenmeyer estériles de 500 ml y los frascos se agitaron a 200 rpm a 28° C. Los cultivos se resuspendieron en medio M (sales LS; 3% glucosa; vitaminas B5 modificadas; kinetina 1 μM ; 2,4-D 1 μM ; pH 5,8), y se diluyeron hasta la densidad apropiada (50 unidades de Klett), antes de la transformación de los hipocótilos de canola.

Transformación de canola:

Germinación de las semillas: semillas de canola (variedad Nexera 710) se esterilizaron en la superficie con 10% de lejía (Clorox) durante 10 minutos, y después se enjuagaron en coladores de acero tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se plantaron para su germinación en medio de Canola ½ MS (1/2 MS, 2% sacarosa, 0,8% Agar) contenido en bandejas Phytatrays (25 semillas por Phytatray). Las bandejas se colocaron en una cámara de crecimiento de medio ambiente (Percival Scientific, Inc., Perry, IA) con un régimen de crecimiento establecido a 25° C y un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, y se germinaron durante 5 días.

Pre-tratamiento: En el día 5, segmentos de ~3 mm de hipocótilo se extirparon asépticamente, desechando las secciones de raíz y tallos (el secado de los hipocótilos se evitó colocándolos en 10 ml de agua milliQ estéril durante el proceso de extirpación). Los segmentos de hipocótilo se colocaron horizontalmente en papel de filtro estéril en un medio de inducción de callo, MSK1D1 (MS; kinetina 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l; 3% sacarosa; 0,7% Phytagar) durante 3 días de pretratamiento en una cámara de crecimiento de medio ambiente establecida a 22-23° C y un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

Cultivo conjunto con Agrobacterium: el día antes del tratamiento con *Agrobacterium*, se inocularon frascos de medio YEP que contenían los antibióticos apropiados. Se transfirieron los segmentos de hipocótilo desde el papel de filtro a placas petri vacías de 100 x 25 mm que contenían 10 ml de medio líquido M para prevenir que los segmentos de hipocótilo se secaran. Se usó una espátula en esta etapa para sacar y transferir los segmentos. El medio líquido M se eliminó con una pipeta, y se añadió 40 ml de suspensión de *Agrobacterium* a la placa petri (500 segmentos con 40 ml de solución de *Agrobacterium*). Los segmentos se trataron durante 30 minutos con agitación periódica de la placa petri a fin de que los hipocótilos permanecieran inmersos en la solución de *Agrobacterium*. Al final del periodo de tratamiento, la solución de *Agrobacterium* se pipeteó en un vaso de precipitado de residuos, se sometió a autoclave, y se desechó (la solución de *Agrobacterium* se eliminó completamente para prevenir el crecimiento excesivo de *Agrobacterium*). Los hipocótilos tratados se transfirieron con forceps de vuelta a las placas originales que contenían MSK1D1 con papel de filtro, teniendo cuidado de que los segmentos no se secaran. Los segmentos de hipocótilo, junto con los segmentos de control, se devolvieron a una cámara de crecimiento de medio ambiente con intensidad de luz reducida (por medio del recubrimiento de las placas con papel de aluminio), y los hipocótilos

tratados se cultivaron conjuntamente con *Agrobacterium* durante 3 días.

Inducción de callo en medio de selección: después de 3 días de cultivo conjunto, los segmentos de hipocótilo se transfirieron individualmente con unas pinzas sobre medio de inducción de callo, MSK1D1H1 (MS; kinetina 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l; MES 0,5 g/l; AgNO₃ 5 mg/l; Timentina 300 mg/l; Carbenicilina 200 mg/l; Herbiace 1 mg/l; 3% sacarosa; 0,7% Phytagar). Los segmentos de hipocótilos fueron anclados sobre el medio, pero no fueron embebidos en el medio.

Selección y regeneración de brotes: después de 7 días en medio de inducción de callos, los segmentos de hipocótilos de formación de callos se transfirieron al medio de regeneración Shoot 1 con selección, MSB3Z1H1 (MS; BAP 3 mg/l; Zeatina 1 mg/l; MES 0,5 g/l; AgNO₃ 5 mg/l; Timentina 300 mg/l; Carbenicilina 200 mg/l; Herbiace 1 mg/l; 3% sacarosa; 0,7% Phytagar). Después de 14 días, los hipocótilos con brotes se transfirieron al medio de regeneración 2 con un aumento de la selección, MSB3Z1H3 (MS; BAP 3 mg/l; Zeatina 1 mg/l; MES 0,5 g/l; AgNO₃ 5 mg/l; Timentina 300 mg/l; Carbenicilina 200 mg/l; Herbiace[®] 3 mg/l; 3% sacarosa; 0,7% Phytagar).

Alargamiento del brote: Después de 14 días, los segmentos con brotes se transfirieron al medio de alargamiento de brotes, MSMESH5 (MS; Timentina 300 mg/l; Herbiace[®] 5 mg/l; 2% sacarosa; 0,7% TC Agar). Los brotes que ya se habían alargado fueron aislados y transferidos a MSMESH5. Después de 14 días, los brotes remanentes que no se habían alargado en la primera vuelta fueron colocados en MSMESH5, y transferidos a un medio de selección fresco de la misma composición. En este estado, todos los segmentos de hipocótilo remanentes fueron descartados.

Los brotes que se alargaron en medio MSB3Z1H3 después de 2 semanas fueron aislados y transferidos a medio MSMESH5. Los brotes remanentes que no se habían alargado en la primera vuelta en MSMESH5 fueron aislados, y transferidos a medio fresco de selección de la misma composición. En este estado todos los segmentos de hipocótilo remanentes fueron descartados.

Inducción de raíces: Después de 14 días, los brotes fueron transferidos a medio MSMEST (MS; MES 0,5 g/l; Timentina 300 mg/l; 2% sacarosa; 0,7% TC Agar) para inducción de las raíces. Los brotes que no formaron raíces en la primera transferencia en medio MSMEST fueron transferidos para un segundo o tercer ciclo en medio MSMEST hasta que se obtuvieron las plantas enraizadas. Los brotes que no elongaron/enraizaron en la primera transferencia en medio MSMEST fueron transferidos para un segundo o tercer ciclo en medio MSMEST hasta que se obtuvieron plantas enraizadas. Las plantas que enraizaron en MSMESH5 o MSMEST y fueron PCR-positivas fueron enviadas para trasplante en suelo. Después de la cosecha, las plantas de canola T₀ fueron posteriormente analizadas para eventos que contuvieran casetes de PTU transgénicas. Las plantas fueron después transferidas a un invernadero, cultivadas hasta madurez, y la semilla fue recogida para análisis adicionales.

Ejemplo 8: Análisis de ADN de tejido de hoja de *Arabidopsis* T₁ y de tejido de hoja de canola T₀

Las plantas de canola T₀ y *Arabidopsis* T₁ se analizaron para identificar plantas que contenían casetes de expresión de PTU. Se realizaron ensayos de Invader[®] para cribar inicialmente muestras de plantas supuestamente transformadas, e identificar eventos que contenían una sola copia de la PTU de *pat*. Eventos que se identificaron como eventos de copia única se mantuvieron y se analizaron adicionalmente para la presencia de PTU(s) desaturasa(s) a través de PCR. Eventos que fueron positivos en la PCR para la casete de expresión de las PTU(s) desaturadas se analizaron adicionalmente mediante análisis de transferencia Southern. El análisis de transferencia Southern se completó para confirmar que las plantas contenían la expresión de PTU del gen del vector binario usado para transformar las plantas. Se seleccionaron para seguimiento los eventos de copia única que contenían todo de los PTUs.

Aislamiento del ADN: el ADN genómico total (gADN) fue extraído del tejido de hoja liofilizado utilizando el kit DNeasy[®] de Qiagen de 96 plantas (Qiagen, Valencia, California). Este ADN_g se diluyó después a 10 ng/μl (canola) o 0,7 ng/μl (*Arabidopsis*) para uso en ensayos de PCR y Invader[®] para número de copia.

Análisis de Invader[®]: el análisis del número de copia del marcador seleccionable, *pat*, fue completado usando el ensayo de Invader[®] (Third Wave Technologies, Madison, WI). El ADN genómico fue desnaturalizado a 95° C durante 10 minutos, congelado en hielo, y mezclado con una mezcla maestra de los reactivos que contenía sondas de oligonucleótido, moléculas de tinte capaz de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), y la enzima cleavase, según el protocolo recomendado por el fabricante. Las reacciones contenían sondas para los genes de referencia internos. El gen *1-desoxixilulosa-5 fosfato reductoisomerasa (DXR1)* se usó como gen de referencia interna para las reacciones de ensayo Invader[®] de *Arabidopsis*, y el gen de la *proteína del grupo de alta movilidad (HMGa)* se usó como gen de referencia interna para las reacciones de ensayo Invader[®] de canola. Además, las placas contenían 1 copia, 2 copias, y 4 copias de estándar, así como muestras de control de tipo silvestre y pocillos en blanco que no contenían muestras. Toda la reacción se cubrió con aceite mineral antes de la incubación en un termociclador a 63° C durante 1,5 horas. La reacción resultante se leyó en un lector de placas fluorométrico (Synergy[™] 2, BioTek Instruments, Winooski, VT). Se recogieron las lecturas tanto en el canal FAM (λ 485-528 nm) como el RED (λ 560-620 nm). A partir de éstas, se determinó el cero de pliegue (es decir, el fondo) para cada canal para cada muestra dividiendo la señal en bruto de la muestra por la señal sin ninguna plantilla. A partir de estos datos, se construyó una curva estándar, y se determinó el mejor ajuste por análisis de regresión

lineal. Usando estos parámetros identificados del ajuste, se determinó el número de copia *pat* aparente para cada muestra.

5 Análisis de PCR: el análisis de PCR se completó usando cebadores que amplificaban cada unidad de transcripción de la planta. Estos cebadores estaban situados en el promotor (Faseolina) y el 3' UTR (Faseolina u ORF23). Estos
 10 mismos grupos de cebadores se usaron para el análisis de PCR de ambos, canola y *Arabidopsis*. Para el análisis de PCR de los eventos pDAB7319 y pDAB7324, se utilizaron los cebadores MAS414 (SEQ ID NO: 18) y MAS415 (SEQ ID NO: 19) para amplificar la primera PTU. Esta PTU consistía en el promotor de Faseolina, un equivalente funcional de un gen acil-CoA delta-9 desaturasa de *Aspergillus nidulans* (AnD9DS v3; SEQ ID NO:49), y el terminador de 3' UTR de faseolina. Para la amplificación por PCR de la segunda PTU en el constructo pDAB7319, se usaron los
 15 cebadores MAS415 y MAS413 (SEQ ID NO: 20). Esta PTU consiste en el promotor de faseolina, un equivalente funcional de un gen acil-CoA delta-9 desaturasa de *Leptosphaeria nodorum* (LnD9DS-2 v2; SEQ ID NO:17), y la 3' UTR de ORF23. Los pares de cebadores MAS415 y MAS413 también se utilizaron para amplificar la segunda PTU de eventos generados por la transformación con pDAB7324 (promotor de faseolina, un equivalente funcional de un gen de acil-CoA delta-9 desaturasa v2 de *Helicoverpa zea* (HzD9DS v2; SEQ ID NO:16), y la 3' UTR de ORF23). Además, los pares de cebadores MAS415 y MAS413 se usaron para amplificar las PTUs en los constructos pDAB7321 y pDAB7326.

20 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 25 µl usando 20 ng de ADN genómico, 5 unidades Ex Taq (Takara), tampón de reacción 1x, 0,2 µM de cada dNTP, y 0,8 µM de cada cebador. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un ciclador térmico DNA Engine Tetrad[®] 2 (BioRad, Hercules, CA). Se usaron las siguientes condiciones de ciclación para los cebadores MAS413 y MAS415: 3 minutos a 94° C; seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 63° C, y 3 minutos a 72° C; y una extensión final de 10 minutos a 72° C. Las condiciones de ciclación usadas para los cebadores MAS414 y MAS415 fueron las mismas con la única diferencia de que la temperatura de hibridación se redujo de 63° C a 60° C. Los productos de reacción se desarrollaron en un gel de 1% agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio, y se visualizaron en un Gel-Doc[™].

25 Análisis de la transferencia Southern: se usó el análisis de transferencia Southern para establecer el patrón de integración de los eventos de canola. Estos experimentos generaron datos que demostraron la integración e integridad del transgén de desaturasa dentro del genoma de canola. Eventos seleccionados se caracterizaron como un evento simple de integración de larga duración, que contenía una sola copia del transgén de desaturasa a partir del vector binario usado para la transformación de la planta.

30 Se llevó a cabo un análisis detallado de transferencia Southern usando sondas específicas para los genes de desaturasa y enzimas de restricción descriptivas, que escinden en sitios localizados dentro del plásmido. Estos productos de digestión producen fragmentos de hibridación internos al plásmido, o fragmentos que puentean la unión del plásmido con ADN genómico de canola (fragmentos de borde). Los tamaños moleculares indicados de la hibridización Southern para la combinación de los enzimas de restricción y las sondas fueron únicos para cada
 35 evento. Estos análisis también mostraron que el fragmento de plásmido se había insertado en el ADN genómico de canola sin reordenamientos de la hebra T del ADN.

40 Para el análisis de transferencia Southern, se extrajeron 100 mg de tejido de hoja de canola usando el Plant Mini Kit (Qiagen). Se digirieron cinco microgramos (5 µg) de ADN_g por muestra simultáneamente con endonucleasas de restricción *SpeI* y *PacI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) para obtener fragmentos que contenían ya sea las PTUs de interés, y/o el marcador seleccionable (PAT), para determinar el número de copia. El ADN digerido se separó en un gel de agarosa al 0,8%.

45 En pocas palabras, después de la separación electroforética y visualización de los fragmentos de ADN, los geles se despurinaron con HCl 0,25 N durante aproximadamente 20 minutos, y después fueron expuestos a una solución desnaturalizante durante aproximadamente 30 minutos, seguido de una solución neutralizante durante al menos 30 minutos. Se realizó la transferencia Southern durante la noche sobre membranas de nylon (Millipore, Billerica, MA) usando un sistema de mecha con 10× SSC. Después de la transferencia, se lavaron las membranas con una solución 2x SSC, y el ADN se unió a la membrana mediante reticulación con UV. Este proceso produjo membranas de transferencia Southern listas para la hibridación.

50 Se generaron las sondas y se amplificaron los fragmentos de PCR a partir de ADN plásmido y se purificaron por medio de extracción por gel usando el kit QIAquick[®] Gel Extraction kit (Qiagen). Los cebadores usados para crear la sonda LnD9DS fueron arw008 (SEQ ID NO:21) y arw009 (SEQ ID NO:22). Los cebadores usados para crear la sonda HzD9 fueron arw010 (SEQ ID NO:23) y arw011 (SEQ ID NO:24). Las condiciones de PCR para todas las tres reacciones consistieron en 35 ciclos con una temperatura de hibridación de 63° C y un tiempo de extensión de 1 minuto. Los fragmentos de PCR fueron marcados con ³²P usando el kit de marcar Prime-it[®] RmT Random Primer Labeling kit (Stratagene, La Jolla, CA).
 55

La etapa de hibridación se condujo a aproximadamente 65° C durante la noche en el horno de hibridación. Las transferencias en membrana de nylon se enjuagaron, y la transferencia se expuso en una pantalla de imagen de fósforo durante la noche, y se escaneó en un escaneador Storm[™] 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Ejemplo 9: Composición de ácidos grasos de las semillas de *Arabidopsis* transgénico que contenía una acil-CoA delta-9 desaturasa

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con vectores de *Agrobacterium* que contenían genes para LnD9DS-2 v2 (pDAB7321; SEQ ID NO:61), HzD9DS v2 (pDAB7326; SEQ ID NO:63) o MgD9DS v2 (pDAB7330; SEQ ID NO:65). Las plantas fueron también transformadas con un vector que contenía un gen AnD9DS (pDAB7328; SEQ ID NO:64). Un vector vacío que contenía solo el gen del marcador seleccionable *pat* (pDAB7331; SEQ ID NO:66) se usó como control negativo. Las transformaciones se realizaron también usando dos desaturasas en combinación, a fin de combinar una desaturasa que prefería estearoilo (AnD9DS) con una desaturasa que prefería palmitoilo, o LnD9DS-2 (pDAB7319; SEQ ID NO:60), o HzD9DS (pDAB7324; SEQ ID NO:62). En todos los casos, los genes de desaturasa fueron conducidos por el promotor específico para las semillas PvPhas (documento de patente de Estados Unidos N° 5.504.200). Semillas a granel T₂ fueron cosechadas de plantas resistentes a los herbicidas T₁ en las que se confirmó que contenían el gen *pat* por análisis de ensayo Invader[®] y la PTU de desaturasa por análisis de PCR.

Las muestras de semillas se homogeneizaron en triheptadecanoína que contenía heptano (Nu-Chek prep, Elysian, MN) como sustituto usando una bola de acero y molino de bolas. Antes de la homogeneización, se añadió una solución de MeONa (Sigma) en MeOH 0,25 M recientemente preparada a la muestra. La reacción se condujo bajo calor suave (40° C) y agitación constante. La reacción se verificó por la recuperación del sustituto metilado. La extracción de FAMES se repitió tres veces, y todas las capas de heptano se combinaron antes del análisis. La integridad de la extracción se verificó mediante la comprobación de la presencia de FAMES en una cuarta extracción/derivatización. Las FAMES resultantes se analizaron por GC-FID usando una columna capilar BPX 70 de SGE (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Cada FAME se identificó por su tiempo de retención, y se cuantificó por la inyección de una muestra de referencia de aceite de colza de Matreya, LLC (Pleasant Gap, PA), como estándar de calibración.

Análisis FAME de las semillas T₂ de los eventos transgénicos mostraron que la expresión de cada una de las desaturasas tuvo un efecto significativo en la reducción del contenido total de ácidos grasos en las semillas, como se determina por el promedio del contenido de cada conjunto de eventos. Tabla 10 y Fig. 19. En esta tabla y las tablas siguientes, los valores no conectados por la misma letra son significativamente diferentes, como se determina usando la prueba de Tukey-Kramer HSD realizada en el paquete de software estadístico JMP[®] (SAS Institute Inc., Cary, NC). Las combinaciones de AnD9DS con LnD9DS-2 o HzD9DS produjeron el promedio de contenido total de ácidos grasos saturados más bajo.

Tabla 10: Contenido total de ácidos grasos saturados de semillas T₂ de *Arabidopsis*

Gen	Número de muestras T2				Promedio de ácidos grasos saturados totales
Control	204	A			13,49
WT	60	A			13,16
MgD9DS v2	42		B		10,26
LnD9DS-2 v2	49		B		10,00
HzD9DS v2	70		B		9,58
AnD9DS v3	32			C	8,73
AnD9DS v3 + HzD9DS v2	39			C	8,23
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	51			C	8,09

Aunque todas las desaturasas redujeron el contenido total de ácidos grasos saturados en las semillas de *Arabidopsis*, tuvieron efectos diferentes en el contenido de los ácidos grasos palmítico y esteárico, como se predijo a partir de los experimentos de levadura. La Tabla 11 y Fig. 20 muestran el promedio de contenido de ácido palmítico para cada conjunto de eventos. La Tabla 12 y la Fig. 21 muestran el promedio de contenido de ácido esteárico de semillas T₂ para cada conjunto de eventos.

Tabla 11: Contenido de ácido palmítico de las semillas T₂ de *Arabidopsis*

Gen				Promedio de ácido palmítico
Control	A			7,72
WT	A			7,54
MgD9DS v2		B		7,19
AnD9DS v3			C	6,02
LnD9DS-2 v2			C	5,98
HzD9DS v2			D	5,57
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2			D	5,54
AnD9DS v3 + HzD9DS v2			D	5,41

Tabla 12: Contenido de ácido esteárico de las semillas T₂ de *Arabidopsis*

Gen				Promedio de ácido esteárico
Control	A			2,96
WT	A			2,94
LnD9DS-2 v2		B		2,09
HzD9DS v2		B		2,04
MgD9DS v2			C	1,53
AnD9DS v3 + HzD9DS v2			C	1,42
AnD9DS v3			C	1,35
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2			C	1,28

- 5 AnD9DS y MgD9DS tuvieron mayor efecto en el contenido de ácido esteárico que LnD9DS-2 y HzD9DS. Por el contrario, LnD9DS-2 y HzD9DS tuvieron mayor efecto en el contenido de ácido palmítico que AnD9DS y MgD9DS. Las combinaciones de las desaturasas tienen el mayor efecto en ambos ácidos grasos. Estos resultados se observaron también en el efecto de las desaturasas en el aumento del contenido en las semillas del ácido palmítico, que es el producto primario de la delta-9 desaturación del ácido palmítico. Tabla 13 y Fig. 22.

Tabla 13: Contenido de ácido palmitoleico de las semillas T₂ de *Arabidopsis*

Gen						Promedio de ácido palmitoleico
AnD9DS v3 + HzD9DS v2	A					3,32
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	A					2,93
HzD9DS v2		B				2,48
AnD9DS v3		B	C			2,10
LnD9DS-2 v2			C			1,91
MgD9DS v2				D		1,40
Control					E	0,31
WT					E	0,30

5

Hubo una variación esperada en el efecto de las desaturasas en el contenido de ácidos grasos saturados en todos los eventos analizados, debido a los efectos de posición y número de copias. Una comparación del perfil completo de ácidos grasos de los eventos con el contenido total más bajo de ácidos grasos saturados (promedio de los cinco eventos más bajos) se muestra en la Tabla 14 junto con el perfil de las semillas de tipo silvestre y plantas de control transformadas.

Tabla 14: perfil de ácidos grasos de *Arabidopsis* T₂ transgénica con el contenido total de ácidos grasos saturados más bajo. Las desviaciones estándar están en paréntesis.

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	Vacc.*
WT	0,08 (0,02)	7,54 (0,41)	0,31 (0,05)	2,94 (0,19)	14,91 (1,44)	1,47 (0,10)
Control	0,08 (0,02)	7,72 (0,05)	0,32 (0,04)	2,96 (0,34)	14,20 (2,04)	1,46 (0,11)
AnD9DS v3	0,07 (0,01)	5,10 (0,38)	2,92 (0,55)	0,72 (0,03)	20,52 (2,12)	1,72 (0,26)
HzD9DS v2	0,06 (0,00)	4,13 (0,23)	4,11 (0,47)	1,26 (0,08)	19,34 (1,01)	1,94 (0,25)
LnD9DS-2 v2	0,05 (0,00)	4,68 (0,30)	3,49 (0,69)	1,53 (0,12)	19,35 (0,81)	2,05 (0,21)
MgD9DS v2	0,08 (0,02)	6,64 (0,26)	1,60 (0,54)	1,05 (0,20)	18,01 (1,86)	1,60 (0,16)
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	0,06 (0,00)	4,41 (0,17)	3,71 (0,35)	0,97 (0,33)	19,60 (0,88)	2,03 (0,21)

ES 2 568 803 T3

AnD9DS v3 +	0,08	4,86	4,09	1,01	18,10	2,03
HzD9DS v2	(0,02)	(0,35)	(0,65)	(0,22)	(2,40)	(0,31)

* Vacc = ácido cis-vaccénico (18:1 n = 7)

	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C24:0
WT	28,72 (0,97)	17,85 (0,81)	2,06 (0,16)	20,11 (0,90)	1,78 (0,15)	0,34 (0,10)	1,68 (0,19)	0,21 (0,10)
Control	29,28 (1,29)	18,07 (1,35)	2,08 (0,16)	19,62 (1,23)	1,85 (0,17)	0,39 (0,13)	1,70 (0,04)	0,27 (0,14)
AnD9DS v3	29,64 (1,34)	17,59 (1,28)	0,44 (0,04)	18,26 (0,83)	1,42 (0,15)	0,24 (0,16)	1,26 (0,09)	0,10 (0,05)
HzD9DS v2	29,31 (0,94)	17,26 (0,39)	0,81 (0,06)	18,39 (0,66)	1,47 (0,10)	0,18 (0,05)	1,50 (0,04)	0,23 (0,03)
LnD9DS-2 v2	27,72 (0,18)	17,46 (0,55)	1,00 (0,11)	19,33 (0,46)	1,45 (0,11)	0,32 (0,14)	1,48 (0,10)	0,10 (0,09)
MgD9DS v2	29,76 (1,10)	17,98 (0,84)	0,63 (0,63)	19,19 (0,86)	1,60 (0,09)	0,26 (0,20)	1,44 (0,09)	0,16 (0,03)
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	29,17 (0,31)	18,84 (0,41)	0,59 (0,27)	17,65 (0,23)	1,40 (0,04)	0,39 (0,03)	1,13 (0,06)	0,03 (0,02)
AnD9DS v3 + HzD9DS v2	29,28 (1,78)	18,83 (1,69)	0,65 (0,21)	17,88 (1,90)	1,55 (0,20)	0,20 (0,12)	1,33 (0,24)	0,11 (0,08)

- 5 Además de reducir el contenido de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, y aumentar el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (palmitoleico y oleico), la presencia de las desaturasas también redujo la cantidad de ácido araquídico (C20:0) en las semillas. Esto es presumiblemente porque este ácido graso se deriva del alargamiento de los ácidos esteárico y palmítico. No pareció haber ninguna desaturación directa de C20:0 por las desaturasas introducidas, como no hay un aumento concomitante en el ácido eicosenoico (C20:1) como C20:1Δ9.

Ejemplo 10: Preparación de anticuerpos a delta-9 desaturasa

- 10 Herramientas de diagnóstico tales como los anticuerpos son deseables en la caracterización de la expresión de la proteína transgénica delta-9 desaturasa en las plantas. Debido a que las acil-CoA delta-9 desaturasas son proteínas unidas a la membrana, la sobreexpresión rutinaria en *Escherichia coli* es difícil. Sin embargo, se generaron anticuerpos con éxito por sobreexpresión de un fragmento C-terminal de cada proteína delta-9 desaturasa que no incluye ninguno de los dominios transmembrana de la proteína.

- 15 Reacciones en cadena de polimerasa: se diseñaron cebadores de PCR para amplificar un fragmento C-terminal equivalente para cada desaturasa. El 3' cebador fue diseñado para codificar un fragmento de proteína con una etiqueta C-terminal 6x His. Se incorporaron lugares de restricción *NdeI* y *BamHI* en los 5' y 3' cebadores, respectivamente, para facilitar la clonación. Las secuencias de los cebadores se dan a continuación en la Tabla 15. Los productos de amplificación esperados eran 659 pb para LnD9DS-2, 683 pb para MgD9DS, y 335 pb para HzD9DS. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el kit Takara Ex Taq™ PCR (Clontech, Mountain View, CA) usando las condiciones del proveedor. El volumen total de reacción de PCR fue de 50 µl. Cada reacción contenía 200 ng de plásmido de ADN y 50 pmoles de cada cebador. El ADN fue desnaturalizado a 94° C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 1 minuto, y 72° C durante 30 segundos.
- 20

Se llevó a cabo una extensión final a 72° C durante 10 minutos. Cada producto de PCR se llevó a cabo en dos pocillos de un gel de 0,75% de agarosa estéril, y el ADN se purificó en un gel usando columnas de giro de Montage y se eluyó en 15 µl de tampón TE.

5 Tabla 15: Secuencias de los cebadores de oligonucleótidos usados en las amplificaciones de PCR de fragmentos C-terminal procedentes de LnD9DS-2, MgD9DS, y HzD9DS.

Cebador	Secuencia	Propósito
AntiLnD9DS2F	SEQ ID NO:25	Directo
	CATATGTTTCGACGACAGACGCACGCCTCGAGAC	
AntiLnD9DS2Rh	SEQ ID NO:26	Cebador inverso para el C-terminal de LnD9DS2
	GGATCCGCAGCCACAGCCCCCTCAACCAACCTCTC	
AntiMgD9DSF	SEQ ID NO:27	Cebador directo para el C-terminal de MgD9DS
	CATATGTTTCGACGATCGCAACTCGCCGCGTGATCAC	
AntiMgD9DSRh	SEQ ID NO:28	Cebador inverso para el C-terminal de MgD9DS
	GGATCCGCGGCCTGAGCACCCGGAACAGGCTG	
AntiHzD9DSF	SEQ ID NO:29	Cebador directo para el C-terminal de HzD9DS
	CATATGTATGACAAGTCCATCAAGCCTTCC	
AntiHzD9DSRh	SEQ ID NO:30	Cebador inverso para el C-terminal de HzD9DS
	GGATCCTCGTCTTTAGGGTTGATCCTAATGGCTGC	

10 Clonación de TOPO: Los fragmentos C-terminal purificados fueron clonados en TA con vectores TOPO® pCR®2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y transformados en células Top 10 de *E. coli* siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se seleccionaron las transformaciones, y se purificó el ADN plásmido usando columnas NucleoSpin® (Macherey-Nagel GmbH & Co, Duren, Alemania). Se digirieron tres microlitros (3 µl) de ADN con *NdeI* y *BamHI* en un volumen total de 20 µl durante 90 minutos a 37° C, y se desarrollaron en un gel de 0,8% de agarosa. En cada caso, un fragmento específico del gen (más una banda de vector TOPO® de 3,9 kb) fue visible. Se eligieron tres clones positivos para cada gen clonado y se secuenciaron para confirmar que el fragmento amplificado por PCR estaba libre de errores. Cada uno de los clones de MgD9DS contenía una mutación puntual silenciosa en el par de bases 45, indicando o bien un solo polimorfismo de nucleótido entre la secuencia publicada y la plantilla de PCR, o un error de PCR silencioso. Dado que la mutación fue silenciosa, ninguna corrección fue necesaria, y se escogió un clon para la subclonación.

20 Preparación de los plásmidos de expresión del fragmento C-terminal de la delta-9 desaturasa: los fragmentos de delta-9 desaturasa amplificados por PCR se digirieron con enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y se ligaron en los lugares de restricción correspondientes dentro del vector de expresión pET30b(+). La etapa de clonación dio como resultado la adición de 15 aminoácidos C-terminales, constituyendo una etiqueta C-terminal 6x His para facilitar la purificación de la proteína de longitud completa. No se esperaba que estos aminoácidos adicionales afectaran la expresión de la proteína. Se obtuvieron y confirmaron los clones positivos por medio de digestión con enzimas de restricción y reacciones de secuenciación.

25 Expresión de fragmentos peptídicos C-terminales de delta-9 desaturasa en *E. coli*: los plásmidos de expresión de delta-9 desaturasa/pET30b(+) se transformaron en células BL21(DE3) de *E. coli* según el protocolo recomendado por el fabricante (Novagen, Madison, WI). Las células se sembraron en placas LA que contenían kanamicina (50 µg/ml) y glucosa (1,25 M). Las placas se incubaron durante la noche a 37° C. Se raspó de las placas un bucle completo de células, y se inocularon en frascos de 500 ml que contenían 250 ml de LB y kanamicina (50 µg/ml) con el inductor isopropil-P-D-tiogalactósido (0,75 mM). Se probaron tres condiciones de inducción. Los cultivos se

30

indujeron a temperaturas diferentes, y se cosecharon en momentos diferentes como sigue: durante la noche (~18 horas) a 28° C; durante la noche a 16° C; o 4 horas a 37° C. Las células se cosecharon por centrifugación en frascos de 250 ml a 6.000 rpm durante 15 minutos, y después se congelaron a -20° C.

5 Purificación de proteína de fragmentos peptídicos C-terminales de delta-9 desaturasa: se descongelaron las pelets celulares de cultivos de 250 ml y se volvieron a suspender en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 10% de glicerol y 0,5 ml de cocktail inhibidor de proteasa (Sigma, St. Louis, MO) usando un homogenizador de mano. Las células se rompieron con hielo durante aproximadamente 10 minutos usando un Sonificador de Branson Modelo 450 (Danbury, CT). Los cuerpos de inclusión se sedimentaron por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos, y se extrajeron de 2-3 veces con PBS que contenía 0,5% de Triton X-100 hasta que la concentración de proteína del sobrenadante alcanzó la línea de base, como se mide por un ensayo de proteína de Bradford. Los cuerpos de inclusión recuperados se solubilizaron en una solución de PBS que contenía Urea 6 M y DTT 5 mM a temperatura ambiente con agitación durante aproximadamente 1 hora. Las proteínas solubilizadas se separaron de los materiales insolubles por centrifugación a 30.000 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante retenido se aplicó a una columna de afinidad de Ni de 5 ml (GE Healthcare, HiTrap Chelating, Piscataway, NJ). Las etiquetas de histidina de los péptidos C-terminales de delta-9 desaturasa unidos a la resina metálica, y cada fragmento se eluyeron con un gradiente de 50-200 mM de imidazol usando un Akta® Explorer 100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se recogieron fracciones (de 3 ml cada una) y se reunieron, y los picos eluidos se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían los péptidos C-terminales de delta-9 desaturasa se reunieron y se concentraron usando un dispositivo de filtración Amicon® Ultra 10,000 MWCO (Millipore, Billerica, MA) a menos de 5 ml de volumen. A continuación, se inyectó la muestra de proteína en una columna de exclusión de tamaño Hi Load™ XK16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), y se equilibró con urea 6 M en Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, y DTT 1 mM. Las fracciones del pico (de 4 ml cada una) que contenían péptidos C-terminales de delta-9 desaturasa puros se guardaron (después de validación por análisis de SDS-PAGE y otras caracterizaciones bioquímicas) y se usaron para la producción de anticuerpos. Se produjeron los péptidos con los tamaños esperados de 27 kDa para el péptido LnD9DS-2, 15 kDa para el péptido HzD9DS, y 28 kDa para el péptido MgD9DS. Las condiciones de inducción produjeron suficiente proteína para visualización por el tñido de Coomassie de geles de SDS-PAGE.

30 Producción de anticuerpos policlonales: Una compañía de contrato de servicio (Strategic BioSolutions, Newark, DE) produjo anticuerpos de conejo frente a cada uno de los péptidos C-terminales de delta-9 desaturasa. Siguiendo sus procedimientos estándar, se obtuvieron antisueros de alto título (validados mediante ELISA) para cada uno de los tres fragmentos de proteína. Cada péptido C-terminal de delta-9 desaturasa purificado se diluyó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, tampón DTT 1 mM, y con una concentración final de urea de 2-3 M, para mantener a la proteína en solución. Se envió aproximadamente 10 mg de proteína a Strategic BioSolutions para generación de un anticuerpo policlonal. Se escogieron dos conejos para cada inmunógeno, y se usaron protocolos estándar (70 días de inmunización). Fue adquirido un nuevo adyuvante llamado TiterMax® Gold para la preparación de la emulsión. Se realizó también titulación de ELISA durante la inmunización y al final del protocolo para asegurar el éxito de la producción de anticuerpo. Los antisueros se entregaron en dos puntos de tiempo separados; uno del procedimiento estándar de 2 meses, y el otro en la exsanguinación.

40 Para aislar IgG total a partir de los sueros de conejo, se aplicaron aproximadamente de 20-30 ml de antisuero de título alto a una columna tolerante al álcali de 5 ml de Proteína A (GE Healthcare, HiTrap™ MabSelect SuRe™, N° de catálogo 11-0034-94). Después de un lavado estándar con tampón de PBF, se eluyó la IgG unida a la resina mediante una exposición corta a citrato sódico 0,1 M, NaCl 0,3 M, pH 3,3, y se neutralizó inmediatamente con la adición de 1/10 volumen de tampón de Tris-HCl 2 M, pH 9 a cada fracción. La columna de afinidad se sanitizó mediante el tratamiento con NaOH 0,5 N siguiendo el procedimiento estándar de limpieza in situ para evitar la contaminación cruzada de la IgG. La IgG final recuperada de cada muestra se dializó frente a 50 volúmenes de PBS a 4° C durante la noche, y la concentración de proteína se determinó por el ensayo de Bradford usando el estándar de BSA (Pierce, N° de producto 23208). Se transfirieron alícuotas de un ml a tubos individuales y se almacenaron a -80° C.

50 Estos anticuerpos son herramientas de diagnóstico que se usaron para medir la expresión de proteína de desaturasa en material vegetal transgénico. Los anticuerpos se usaron para desarrollar correlaciones entre los cambios de fenotipo de aceite bajo en ácidos grasos saturados y el nivel de expresión de proteínas de delta-9 desaturasa.

Ejemplo 11: Niveles de proteína acil-CoA delta-9 desaturasa en semillas T₂ de *Arabidopsis*

55 Se detectaron polipéptidos de delta-9 desaturasa en muestras de semillas transgénicas maduras por transferencia Western. Se prepararon las semillas para análisis rompiendo las semillas secas con bolas de acero inoxidable en un Kleco™ Bead Beater (Garcia Machine, Visalia, CA). Se añadió tampón de extracción (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, 2% SDS), y los tubos de muestras se agitaron suavemente durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 3.000 rcf. Después se recogió el sobrenadante y se usó para el análisis. Se determinó la cantidad total de proteína soluble en el extracto de semillas por el ensayo de Lowry (BioRad, Hercules, CA). Las muestras se normalizaron a 1,55 mg/ml de proteína total soluble y se prepararon en tampón de muestra LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) con DTT 40 mM, para una carga normalizada de 20 µg de proteína total soluble por carril. La

muestras se sometieron a electroforesis en de 4-12% Bis-Tris geles (Invitrogen), y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las transferencias se bloquearon en tampón de bloqueo, y se sondearon con anticuerpos frente a cuatro diferentes polipéptidos de delta-9 desaturasa (AnD9DS, LnD9DS-2, HzD9DS, y MgD9DS) (véase el Ejemplo 10).

- 5 En todos los casos, se desarrollaron anticuerpos policlonales en los conejos contra el fragmento de péptido C-terminal con etiqueta His purificado de las desaturasas individuales como se describió anteriormente. Los fragmentos C-terminales purificados se usaron como antígenos de referencia para la cuantificación de transferencias Western. Un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con fluorescencia (Goat Anti-Rabbit AF 633; Invitrogen) se usó para la detección. Las transferencias se visualizaron en un generador de imágenes de fluorescencia Typhoon™ Trio Plus (GE Healthcare). Se generaron curvas estándar con ajuste de curva cuadrática, y se usó regresión lineal para cuantificar la expresión.

15 Las transferencias Western en SDS-PAGE de extractos de semillas maduras T₂ de eventos de *Arabidopsis* mostraron bandas del tamaño apropiado cuando se sondearon con antisueros específicos. Estas bandas se cuantificaron frente a antígenos de referencia específicos. Transferencias Western cuantitativas de extractos de semillas de *Arabidopsis* T₂ con los antisueros apropiados indicaron que se detectó un promedio de 63 ng de LnD9DS-2/mg de proteína total (pt) (max. 228 ng/mg pt) en semillas maduras, y para HzD9DS, se detectó un promedio de 34 ng/mg pt (máximo de 100 ng/mg pt). Para MgD9DS, se detectó un promedio de 58 ng/mg pt (máximo de 1179 ng/mg pt) en semillas T₂. Para los eventos AnD9DS, se detectó un promedio de 625 ng/mg pt (máximo de 1,5 µg/mg pt) en semillas T₂ maduras. Por lo tanto, hubo de 10-18 veces menos desaturasas que preferían palmitoilo, LnD9DS-2 y HzD9DS, expresadas en las semillas transgénicas, en relación a AnD9DS. Niveles de expresión más altos de estas desaturasas por lo tanto conducirían a reducciones adicionales en los saturados, especialmente en ácido palmítico.

Ejemplo 12: Expresión de genes de delta-9 desaturasa en canola

25 Se obtuvo una serie de eventos transgénicos de canola a partir de las transformaciones realizadas con pDAB7321 (SEQ ID NO:61) y pDAB7326 (SEQ ID NO:63) (que contenían genes LnD9DS-2 y HzD9DS, respectivamente, conducidos por el promotor específico para las semillas PvPhas). Se identificaron treinta y nueve eventos pDAB7321 que contenían el gen LnD9DS-2 por análisis de PCR de ADN genómico, y se cultivaron en el invernadero para producir semillas T₁. Del mismo modo, se identificaron 80 eventos pDAB7326 que contenían el gen HzD9DS, y se produjeron semillas T₁. Canola se transformó también con pDAB7319 (SEQ ID NO:60) o pDAB7324 (SEQ ID NO:62), que contenían un gen AnD9DS acoplado con los genes LnD9DS-2 o HzD9DS, todos conducidos por el promotor PvPhas. Se recuperaron 44 y 76 eventos, respectivamente, que se confirmó contenían ambos genes de desaturasa por análisis de PCR, y se cultivaron en el invernadero para producir semillas T₁.

35 Análisis FAME de muestras de semillas T₁ de eventos transformados con pDAB7321 (LnD9DS-2 v2) o pDAB7326 (HzD9DS v2) no mostró una reducción significativa en niveles de ácidos grasos saturados en comparación con plantas de canola no transformadas o plantas transformadas con un vector de control vacío. Transferencia Western de las semillas T₁ no mostró niveles detectables de las proteínas de delta-9 desaturasa. Además, no se detectó ninguna proteína detectable para LnD9DS-2 o HzD9DS en semillas T₁ de plantas transformadas con pDAB7319 (AnD9DS v3 y LnD9DS-2 v2) o pDAB7324 (AnD9DS v3 y HzD9DS v2), mientras que la proteína AnD9DS se pudo detectar fácilmente. En estos eventos, se observó una reducción de ácidos grasos saturados en relación a plantas de control, pero esto es atribuible a la expresión de AnD9DS.

45 Para evaluar los niveles relativos de ARNm de los genes de delta-9 desaturasa, se extrajo el ARN total de semillas de canola en desarrollo de eventos transformados con constructos de desaturasa dobles (pDAB7319 y pDAB7324) y se analizó por PCR cuantitativa en tiempo real. Las semillas se cosecharon sobre hielo seco en los días 20, 25, 29, 32, 39, o 41 después de la polinización de varias plantas de canola y se almacenaron a -80° C. Se preparó el ARN total a partir de 50 mg de semillas congeladas agrupadas usando un kit de extracción de ARN Plant RNeasy® (Qiagen) según el protocolo recomendado por el fabricante. El ARN extraído se usó como una plantilla para la síntesis de ADNc usando el SuperScript® III First Strand Synthesis Supermix para qRT-PCR (Invitrogen) según el protocolo recomendado por el fabricante.

50 Se diseñaron ensayos de RT-PCR frente a las dianas de desaturasa usando el centro de Diseño de Ensayos de Roche (Roche Assay Design Center) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los cebadores usados en el ensayo se describen en la Tabla 16. Los ensayos diana utilizaron sondas UPL etiquetadas con FAM (Roche Diagnostics). Estos ensayos se realizaron en reacciones dúplex con un ensayo de referencia de *actina* para canola marcada con Rojo de Texas sintetizado por Integrated DNA Technologies.

Tabla 16: detalles del ensayo q-RT-PCR

Diana	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
AnD9Ds	SEQ ID NO:31 GGACTTCTCTACTCTCACCTTGGA	SEQ ID NO:32 TCCGATCCTCTTTGGGTCT	UPL #9
HxD9Ds	SEQ ID NO:33 GACCCACACAATGCAACG	SEQ ID NO:34 CCTAACAGAAGCCAGCCAAT	UPL #143
LnD9Ds	SEQ ID NO:35 GTTCTGACTGCGTTGGTCAC	SEQ ID NO:36 CGGAACTCATGGTGAAGT	UPL #7
Actin	SEQ ID NO:37 CTACTGGTATTGTCTCGACT	SEQ ID NO:38 CTCTCTCGGTGAGAATCTTCAT	SEQ ID NO:39 CACGCTATCCTCCGTCTCGATC

Diana	Etiqueta
AnD9Ds	FAM
HxD9Ds	FAM
LnD9D5	FAM
Actina	Tx-Red

5 Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en un ciclador térmico de PCR en tiempo real LightCycler® 480II (Roche). Los datos de los ensayos diana UPL se recogieron usando un filtro de emisión de 533 nm y una señal de excitación de 483 nm. Los datos para los ensayos de referencia de actina se recogieron usando un filtro de 610 nm y una señal de excitación de 558 nm. Los valores de tiempo del ciclo y las relaciones de referencia diana fueron calculados automáticamente usando el software LC480II de flujo de análisis "Advanced Relative Quantification". La acumulación relativa de los niveles de transcripción de la desaturasa en cada muestra fue calculada usando el método estándar $\Delta\Delta Ct$ (Roche).

10 Para cada muestra de semilla de canola de pDAB7319 (AnD9DS v3 y LnD9DS-2 v2) y pDAB7324 (AnD9DS v3 y HxD9DS v2), la acumulación de la transcripción de los transgenes HxD9DS o LnD9DS-2 fue significativamente más baja que la transcripción de AnD9DS en los mismos eventos. Las diferencias observadas en la acumulación de transcripción variaron entre 3 y 20 veces menor. Fig. 23. Por lo tanto, la expresión insuficiente de HxD9DS y LnD9DS-2 puede dar cuenta de la falta de detección del polipéptido y la ausencia de fenotipo atribuible a estos genes.

Ejemplo 13: Expresión de la PTUs de delta-9 desaturasa por promotores alternativos.

20 El uso de regiones reguladoras de la transcripción adicionales para expresar el gen(es) de codificación LnD9DS-2, HxD9DS, y la proteína MgD9DS pueden aumentar aún más el contenido de estas delta-9 desaturasas en canola. La identificación y el uso de regiones reguladoras de la transcripción que se expresan más temprano en el desarrollo, y por periodos más largos de tiempo, pueden aumentar los niveles de las delta-9 desaturasas heterólogas en las semillas de canola mediante la promoción de la transcripción específica de un gen heterólogo en semillas robustas en los estadios más tempranos del desarrollo de la semilla. Ejemplos de tales regiones reguladoras de transcripción incluyen, pero no se limitan, al promotor LfKCS3 (documento de patente de los Estados Unidos 7.253.337) y el promotor FAE 1 (documento de patente de los Estados Unidos 6.784.342). Estos promotores se usan individualmente, o en combinación, para conducir a la expresión de las casetes de expresión LnD9DS-2, HxD9DS, y MgD9DS, por ejemplo, a través de uniones operables con genes tal como los previamente descritos en los plásmidos, pDAB7319; pDAB7321; pDAB7324; pDAB7326; pDAB7328; y pDAB7330. Métodos para reemplazar las regiones reguladoras de la transcripción dentro de un plásmido son bien conocidos en la técnica. Como tal, un fragmento de polinucleótido que comprende el promotor PvPhas es eliminado de pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, o pDAB7330 (o los plásmidos anteriores utilizados para construir pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, o pDAB7330), y reemplazado con una región de promotor o bien LfKCS3 o FAE 1. Los plásmidos de nueva construcción se utilizan para transformar de manera estable plantas de canola, según los procedimientos establecidos en los ejemplos anteriores. Las plantas de canola transgénicas se aíslan y caracterizan molecularmente. La acumulación de la delta-9 desaturasa resultante se determina, y las plantas de canola que expresan fuertemente la delta-9 desaturasa se identifican.

Otras modificaciones de las regiones reguladoras de la transcripción para aumentar la expresión de una delta-9

desaturasa incluyen la sustitución de la secuencia de Kozak existente con cualquiera de las secuencias descritas en la Tabla 17. La ingeniería de secuencias alternativas de Kozak aguas arriba del sitio de inicio de una delta-9 desaturasa se completa usando técnicas de biología molecular estándar. Los fragmentos de polinucleótidos sintéticos se sintetizan y se clonan aguas arriba de una secuencia codificante de una delta-9 desaturasa usando técnicas conocidas en el campo. El contexto del codón de inicio tiene un fuerte efecto sobre el nivel de expresión de un transgén. La modificación de la secuencia de Kozak a una de las enumeradas en la Tabla 17 aumenta los niveles de expresión de la delta-9 desaturasa heteróloga.

Tabla 17: secuencias de Kozak que se incorporan aguas arriba de un gen de una delta-9 desaturasa heteróloga para aumentar la expresión.

Secuencia de Kozak	SEQ ID NO:	Secuencia
Kozak número 1	SEQ ID NO:40	GGATCCAACAATG
Kozak número 2	SEQ ID NO:41	ACAACCAAAAATG
Kozak número 33	SEQ ID NO:42	ACAACCAACCTACCATGG
Kozak número 4	SEQ ID NO:43	ACAACCAAAAATG

Ejemplo 14: Diseño y síntesis de genes de delta-9 desaturasa a partir de *Helicoverpa zea* y *Leptosphaeria nodorum*

Para obtener mayores niveles de expresión de genes heterólogos en las plantas, la estrategia de optimización de codones que se ha descrito en el ejemplo 2 fue modificada, y las regiones codificadoras de la proteína de los genes heterólogos HzD9DS y LnD9DS-2 fueron rehechas por ingeniería genética usando nuevos protocolos de diseño.

La selección de los codones se hizo utilizando una tabla en la que se había calculado el sesgo de codón de la planta hospedante prospectiva, que en este caso fue la canola. En el diseño de las regiones de codificación para la expresión en plantas de los genes de delta-9 desaturasa, se determinaron los codones primarios ("de primera elección") preferidos por la planta, y se usaron aproximadamente el 95% del tiempo. Los codones de "segunda elección" se usaron con moderación, a una frecuencia de aproximadamente 5%. En consecuencia, se diseñó una nueva secuencia de ADN, que codifica la secuencia de amino de cada delta-9 desaturasa, en la que la nueva secuencia de ADN difería del gen de la delta-9 desaturasa nativa mediante la sustitución de los codones preferidos de primera y segunda elección de la planta para especificar un aminoácido apropiado en cada posición en la secuencia de aminoácidos. La nueva secuencia fue analizada después para los lugares de las enzimas de restricción que podrían haberse creados por las modificaciones. Los lugares de las enzimas de restricción identificados fueron eliminados después reemplazando los codones con los codones preferidos de primera y segunda elección. Otros sitios en la secuencia que podrían afectar la transcripción o traducción del gen de interés, específicamente las estructuras de bucle muy estables, también se eliminaron.

Las selecciones de opciones de codones preferidos (primera y segunda elección) del código genético de canola se determinaron a partir de una tabla de sesgo de codón compilada a partir de las secuencias de codificación de la proteína para canola. En las Tabla 18 y 19, las columnas etiquetadas como "% Gen nativo" presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones para el aminoácido) de codones sinónimos para cada aminoácido, como se encuentra en las regiones codificantes de *Brassica napus* (canola). Las nuevas secuencias de ADN que codifican esencialmente la secuencia de aminoácidos de las delta-9 desaturases de *M. grisea*, *H. zea* y *L. nodorum* fueron diseñadas para la expresión óptima en canola usando la distribución de codón preferida de los codones de primera y segunda elección encontrada en los genes de canola. El diseño de las secuencias de ADN optimizadas en plantas se inició por traducción inversa de las secuencias de proteínas de SEQ ID NO:12 (*M. grisea*), SEQ ID NO:13 (*H. zea*), y SEQ ID NO:14 (*L. nodorum*) usando la tabla de sesgo de codón de canola construida. Las columnas etiquetadas como "% Gen opt de planta" indica los codones preferidos y la frecuencia con la que se incorporaron en el diseño del gen de la delta-9 desaturasa. SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 establecen las secuencias de nucleótido de las nuevas desaturases optimizadas de canola LnD9DS-2 y HzD9DS, respectivamente. Estas secuencias optimizadas de canola nuevas fueron etiquetadas como LnD9DS-2 v3 y HzD9DS v3.

Tabla 18. Composiciones de codones de las regiones de codificación para la proteína HzD9DS. La región de codificación de la *H. zea* desaturasa nativa se compara con una versión optimizada para la planta.

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de recomendado de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomen dado de planta
ALA (A)	GCA	4	11,4	1	2,9	0,0	LEU (L)	CTA	2	5,9	0	0,0	0,0
	GCC	7	20,0	0	0,0	0,0		CTC	8	23,5	0	0,0	0,0
	GCG	8	22,9	0	0,0	0,0		CTG	14	41,2	0	0,0	0,0
	GCT	16	45,7	34	97,1	100,0		CTT	6	17,6	34	100,0	100,0
ARG (R)	AGA	1	7,7	0	0,0	0,0		TTA	2	5,9	0	0,0	0,0
	AGG	5	38,5	13	100,0	100,0		TTG	2	5,9	0	0,0	0,0
	CGA	2	15,4	0	0,0	0,0	LYS (K)	AAA	11	44,0	0	0,0	0,0
	CGC	5	38,5	0	0,0	0,0		AAG	14	56,0	25	100,0	100,0
ASN (N)	CGG	0	0,0	0	0,0	0,0	MET (M)	ATG	8	100	8	100	100,0
	CGT	0	0,0	0	0,0	0,0	PHE (F)	TTC	20	83,3	24	100,0	100,0
	AAC	13	72,2	18	100,0	100,0		TTT	4	16,7	0	0,0	0,0
	AAT	5	27,8	0	0,0	0,0	PRO (P)	CCA	1	6,3	16	100,0	100,0
ASP (D)	GAC	16	64,0	2	8,0	0,0		CCC	5	31,3	0	0,0	0,0
	GAT	9	36,0	23	92,0	100,0		CCG	2	12,5	0	0,0	0,0

Aminoácido	Codón	Numero de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Amino ácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomen dado de planta
CYS (C)	TGC	1	100,0	1	100,0		CCT	8	50,0	0	0,0	0,0
	TGT	0	0,0	0	0,0	SER (S)	AGC	2	12,5	0	0,0	0,0
END	TAA	1	100,0	0	0,0		AGT	1	6,3	0	0,0	0,0
	TAG	0	0,0	0	0,0		TCA	1	6,3	1	6,3	0,0
	TGA	0	0,0	1	100,0		TCC	6	37,5	0	0,0	0,0
GLN (Q)	CAA	2	33,3	6	100,0		TCG	3	18,8	0	0,0	0,0
	CAG	4	66,7	0	0,0		TCT	3	18,8	15	93,8	100,0
GLU (E)	GAA	7	63,6	0	0,0	THR (T)	ACA	3	16,7	0	0,0	0,0
16	GAG	4	36,4	11	100,0		ACC	7	38,9	18	100,0	100,0
GLY (G)	GGA	8	40,0	20	100,0		ACG	4	22,2	0	0,0	0,0
	GGC	6	30,0	0	0,0		ACT	4	22,2	0	0,0	0,0
	GGG	2	10,0	0	0,0	ITRP (W)	TGG	14	100	14	100	0,0
	GGT	4	20,0	0	0,0	TYR (Y)	TAC	12	80,0	15	100,0	100,0
HIS (H)	CAC	11	73,3	15	100,0		TAT	3	20,0	0	0,0	0,0
	CAT	4	26,7	0	0,0	VAL (V)	GTA	0	0,0	0	0,0	0,0

Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomen dado de planta
ILE (I)	ATA	3	15,0	1	5,0		GTC	5	26,3	0	0,0	0,0
	ATC	10	50,0	19	95,0		GTG	13	68,4	0	0,0	0,0
	ATT	7	35,0	0	0,0		GTT	1	5,3	19	100,0	100,0
	Total	165		165			Total	189		189		

Tabla 19. Composiciones de codones de las regiones de codificación para la proteína LnD9DS-2. La región de codificación de la *L. nodorum* desaturasa nativa se compara con una versión optimizada para la planta.

Amino ácido	Codón	Núm. gen nativo	% de nativo	Núm. gen de planta	% de opt planta	Opt de recomendado	Amino ácido	Codón	Núm. gen nativo	% Gen nativo	Núm-de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Recomendado opt de planta
ALA (A)	GCA	3	9,4	0	0,0	0,0	LEU (L)	CTA	7	15,6	0	0,0	0,0
	GCC	9	28,1	0	0,0	0,0		CTC	14	31,1	0	0,0	0,0
	GCG	12	37,5	0	0,0	0,0		CTG	7	15,6	0	0,0	0,0
	GCT	8	25,0	32	100,0	100,0		CTT	5	11,1	45	100,0	100,0
ARG (R)	AGA	4	13,8	1	3,4	0,0		TTA	3	6,7	0	0,0	0,0
	AGG	3	10,3	28	96,6	100,0		TTG	9	20,0	0	0,0	0,0
	CGA	7	24,1	0	0,0	0,0	LYS (K)	AAA	9	45,0	0	0,0	0,0
	CGC	8	27,6	0	0,0	0,0		AAG	11	55,0	20	100,0	100,0
	CGG	5	17,2	0	0,0	0,0	MET (M)	ATG	9	100	9	100	100,0
	CGT	2	6,9	0	0,0	0,0	PHE (F)	TTC	16	80,0	20	100,0	100,0
ASN (N)	AAC	6	50,0	12	100,0	100,0		TTT	4	20,0	0	0,0	0,0
	AAT	6	50,0	0	0,0	0,0	PRO (P)	CCA	3	16,7	18	100,0	100,0
ASP (D)	GAC	16	66,7	2	8,3	0,0		CCC	8	44,4	0	0,0	0,0
	GAT	8	33,3	22	91,7	100,0		CCG	2	11,1	0	0,0	0,0
CYS (C)	TGC	4	80,0	5	100,0	100,0		CCT	5	27,8	0	0,0	0,0

Amino ácido	Codón	Núm. gen nativo	% de gen nativo	Núm. de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de recomendado	planta	Amino ácido	Codon	Núm. gen nativo	% Gen nativo	Núm-de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Recomendado opt de planta
	TGT	1	20,0	0	0,0	0,0		SER (S)	AGC	8	27,6	0	0,0	0,0
END	TAA	0	0,0	0	0,0	0,0			AGT	6	20,7	0	0,0	0,0
	TAG	1	100,0	0	0,0	0,0			TCA	1	3,4	1	3,4	0,0
	TGA	0	0,0	1	100,0	100,0			TCC	6	20,7	0	0,0	0,0
GLN (Q)	CAA	10	55,6	18	100,0	100,0			TCG	7	24,1	0	0,0	0,0
	CAG	8	44,4	0	0,0	0,0			TCT	1	3,4	28	96,6	100,0
GLU (E)	GAA	5	33,3	1	6,7	0,0		THR (T)	ACA	11	44,0	0	0,0	0,0
16	GAG	10	66,7	14	93,3	100,0			ACC	5	20,0	25	100,0	100,0
GLY (G)	GGA	13	34,2	38	100,0	100,0			ACG	7	28,0	0	0,0	0,0
	GGC	16	42,1	0	0,0	0,0			ACT	2	8,0	0	0,0	0,0
	GGG	6	15,8	0	0,0	0,0		TRP (W)	TGG	19	100	19	100	0,0
	GGT	3	7,9	0	0,0	0,0		TYR (Y)	TAC	11	64,7	17	100,0	100,0
HIS (H)	CAC	12	66,7	18	100,0	100,0			TAT	6	35,3	0	0,0	0,0
	CAT	6	33,3	0	0,0	0,0		VAL (V)	GTA	6	17,6	0	0,0	0,0
ILE (I)	ATA	4	18,2	1	4,5	0,0			GTC	10	29,4	0	0,0	0,0
	ATC	9	40,9	21	95,5	100,0			GTG	12	35,3	0	0,0	0,0

Amino ácido	Codón	Núm. de gen nativo	% de nativo	Núm. de gen opt de planta	% Gen de opt planta	Opt de recomendado	planta	Amino ácido	Codon	Núm. gen nativo	% Gen nativo	Núm-de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Recomendado opt de planta
	ATT	9	40,9	0	0,0	0,0			GTT	6	17,6	34	100,0	100,0
	Total	214		214					Total	236		236		

La síntesis de fragmentos de ADN que comprenden SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45 fue llevada a cabo por PicoScript y Blue Heron Biotechnology. El ADN sintético se clonó en vectores de expresión y se transformó en canola sustancialmente como se describe en los ejemplos precedentes.

5 Ejemplo 15: Modificación de la N- y C-terminal para aumentar la acumulación de polipéptidos de acil-CoA desaturasa en plantas

La acumulación y estabilidad de las proteínas unidas a la membrana en el retículo endoplasmático (ER) pueden ser influenciadas por motivos de secuencia de aminoácidos y modificaciones de sus N- y C-terminales. Ravid and Hochstrasser (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9:679-90. En particular, se ha demostrado que motivos y modificaciones N- y C-terminales modulan la acumulación y la estabilidad de desaturasas de lípidos en los hongos y las plantas, así como en animales. McCartney et al. (2004) Plant J. 37:156-73; Mziaut et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:8883-8.

15 La adición ya sea de un Myc o de la etiqueta del epitopo de la hemaglobina (HA) al N-terminal de FAD2 o FAD3 significativamente aumenta el nivel de equilibrio de estas enzimas en la levadura. O'Quin et al. (2009) Appl Microbiol Biotechnol 83:117-25. En consecuencia, la adición de estos, o epitopos similares, a la N-terminal de una delta-9 desaturasa de la presente invención se utiliza para aumentar la expresión del polipéptido en una planta. Un enlazador de polinucleótido que codifica una etiqueta Myc (SEQ ID NO:46) o una etiqueta HA (SEQ ID NO:47) se clona en el extremo 5' de una secuencia de codificación de delta-9 desaturasa (por ejemplo, HzD9DS, MgD9DS, AnD9DS, LnD9DS-1, y LnD9DS-2) como un marco de lectura abierto contiguo. La secuencia de codificación resultante se clona en un plásmido de expresión de la planta usando la estrategia de clonado descrita en el ejemplo 3. El plásmido de nueva construcción se usa para transformar establemente una célula material o tejido de planta de *Arabidopsis* y/o canola. Las plantas transgénicas se regeneran desde la célula, material o tejido de las plantas transformadas. Las plantas transgénicas se aíslan y se caracterizan molecularmente. La acumulación de la delta-9 desaturasa resultante en semillas de las plantas transgénicas se determina, y las plantas que robustamente expresan el polipéptido de la delta-9 desaturasa se identifican.

25 Evidencia de la expresión de AnD9DS en *Arabidopsis* y canola (Ejemplos 11 y 12) indican un nivel de expresión significativamente más alto de esta enzima desaturasa específica, con relación a HzD9DS y LnD9DS-2. Por lo tanto, todos o parte de los N- y C-terminales que están fuera del dominio del núcleo de la desaturasa (que contiene los segmentos de transmembrana y los residuos de histidina catalítica conservada) de AnD9DS pueden ser utilizados para reemplazar los residuos equivalentes en las desaturasas que expresan menos y aumentar la expresión de las mismas. En consecuencia, todo o parte de los residuos N-terminales 1-68 y los residuos C-terminales 281-455 de AnD9DS (SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:73, respectivamente) son usados para reemplazar todos o parte de los 68 residuos N-terminales (1-68) y los 168 residuos C-terminales (281-449) de LnD9DS-2 (SEQ ID NO:14) y/o de los 76 residuos N-terminales (1-76) y 60 residuos C-terminales (293-353) de HzD9DS (SEQ ID NO:13). La secuencia de codificación resultante se clona en un plásmido de expresión de la planta usando la estrategia de clonado descrita en el ejemplo 3. El plásmido de nueva construcción se usa para transformar establemente una célula material o tejido de planta de *Arabidopsis* y/o canola. Las plantas transgénicas se regeneran desde la célula, material o tejido de planta transformado. Las plantas transgénicas se aíslan y se caracterizan molecularmente. La acumulación resultante de delta-9 desaturasa en semillas de plantas transgénicas se determina, y las plantas que expresan robustamente el polipéptido modificado HzD9DS o el polipéptido modificado LnD9DS-2 se identifican.

40 Ejemplo 16: Modificaciones para potenciar la expresión ARNm de acil-CoA desaturasa en plantas

Se sabe dentro de la técnica que la expresión de ARNm se puede potenciar mediante la incorporación de elementos genéticos que estabilizan y aumentan la acumulación de ARNm. La incorporación de las regiones no traducidas 5' y 3' (por ejemplo, las secuencias 5' UTR y 3' UTR de osmotina del tabaco (Liu et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:1222-8), y la secuencia Ω del virus del mosaico del tabaco (Gallie et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:8693-711)) o intrones (Koziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405), dentro de una cercanía extrema a una secuencia de codificación de HzD9Ds o LnD9DS-2, se usa para aumentar los niveles de expresión del transgén en comparación con la expresión de la misma secuencia codificante que carece de los elementos genéticos mencionados anteriormente. La adición de uno o más de estos elementos genéticos dentro de una PTU desaturasa se realiza según los métodos bien conocidos en la técnica. Los fragmentos de los polinucleótidos que comprende la región 5' no traducida, la región 3' no traducida, y/o el intrón son añadidos a un plásmido de expresión de la planta (por ejemplo, pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, pDAB7330, o los plásmidos anteriores utilizados para construir pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, o pDAB7330) por medio de métodos de clonación estándar. El plásmido de nueva construcción se usa para transformar establemente una célula material o tejido de planta de *Arabidopsis* y/o canola. Las plantas transgénicas se regeneran desde la célula, material o tejido de planta transformado. Las plantas transgénicas se aíslan y se caracterizan molecularmente. La acumulación resultante de delta-9 desaturasa en semillas de plantas transgénicas se determina, y las plantas que expresan robustamente el polipéptido HzD9DS o el polipéptido LnD9DS-2 se identifican.

Además, se sabe en la técnica que los genes de las desaturasas en levaduras tales como *OLE1* están muy regulados. La delección de secuencias que codifican las regiones de transmembrana y que son una parte del dominio b5 del citocromo reduce la estabilidad de la transcripción de *OLE1*. Vemula et al. (2003) J. Biol. Chem.

278(46):45269-79. La presencia de estas secuencias en *OLE1* actúa como secuencias de estabilización de ARNm. Por consiguiente, la incorporación de las secuencias de *OLE1* que codifican la región de transmembrana y el dominio b5 del citocromo en una secuencia de codificación de LnD9DS-2 o HzD9DS se utiliza para aumentar la estabilidad de la transcripción de ARNm de la secuencia de codificación, lo que origina niveles más altos de expresión y un subsiguiente aumento de polipéptidos LnD9DS-2 o HzD9DS. Una secuencia de codificación quimérica LnD9DS-2 o HzD9DS que incluye la región de transmembrana *OLE1* y la secuencia del dominio b5 del citocromo se construye usando métodos conocidos en la técnica. La secuencia de codificación así producida se incorpora en un plásmido de expresión de la planta (por ejemplo, como se describe en los ejemplos anteriores), y se usa para generar plantas transgénicas por medio de la transformación de la planta mediada por *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas se aíslan y caracterizan. La acumulación resultante de delta-9 desaturasa se determina, y las plantas que expresan robustamente la delta-9 desaturasa se identifican.

Ejemplo 17

Uso de un terminador alternativo de la región 3' no traducida para la expresión estable de una delta-9 desaturasa en una planta

Debido al número limitado de terminadores de 3' UTR disponibles, el terminador 3' UTR de ORF 23 de *Agrobacterium* (3' UTR de AtuORF23) es usualmente usado para terminar la transcripción. Se mostró recientemente que otros terminadores 3' UTR son más efectivos en la terminación de la lectura de transcripción en *Arabidopsis thaliana*. En consecuencia, el terminador 3' UTR de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (SEQ ID NO:69) se usa en combinación con el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* para reducir la lectura de transcripción de genes aguas arriba, lo que reduce la interferencia de la transcripción.

El terminador 3' UTR de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (3'UTR de PvPhas v1) se incorporó dentro de una casete de expresión de LnD9DS-2 v2, y en una casete de expresión de HzD9DS v2, las cuales fueron previamente descritas en el plásmido pDAB7321 y pDAB7326. Según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, un fragmento de polinucleótido que comprende la 3' UTR de PvPhas v1 fue colocado corriente abajo del gen LnD9DS-2 v2 para crear un plásmido binario, pDAB110110 (Fig. 4a; SEQ ID NO:74). Un fragmento de polinucleótido que comprende el 3' UTR de PvPhas v1 fue también colocado corriente abajo de un gen de HzD9DS v2 para crear un plásmido binario pDAB110112 (Fig. 4b; SEQ ID NO:75).

Los plásmidos binarios resultantes fueron confirmados por medio de digestión con enzimas de restricción y secuenciación. Los plásmidos de nueva construcción son cada uno usados para transformar de forma estable una célula, material o tejido de la planta de *Arabidopsis* y/o de canola. Las plantas transgénicas se regeneran desde la célula, material o tejido de las plantas transformadas. Las plantas transgénicas se aíslan y se caracterizan molecularmente. La acumulación de la delta-9 desaturasa resultante en semillas de la planta transgénica se determina, y las plantas que robustamente expresan los polipéptidos HzD9DS o LnD9DS-2 se identifican.

Listado de secuencias

<110> Dow Agrosiences LLC
 Merlo, Ann O
 5 Gachotte, Daniel J
 Thompson, Mark A
 Walsh, Terence A

<120> Reduciendo el contenido de ácido graso saturado de las semillas de plantas
 10 <130> 2971-p10092.1US

<150> US 61/358,314
 <151> 2010-06-24
 15 <160> 78

<170> PatentIn versión 3.4

20 <210> 1
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador directo Mgdelta9F

<400> 1

30 gaagaattca tggcttcgtc atcttctcc gtgccggagt tggc 44

<210> 2
 <211> 41
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso Mg9deltaR

40 <400> 2

ctcgagctag ttagtcacgc ggctgagca cccggaacag g 41

<210> 3
 45 <211> 1523
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> fragmento amplificado por PCR de MgD9Ds

<400> 3

gaattcatgg cttcgtcatc ttctccgtg ccggagttgg ctgccgcctt ccctgatggc 60
 actaccgact tcaagcccat gaggaacacc aagggtacg acgtcagcaa gccgcacatt 120
 tccgagacac ctatgacact caagaactgg cataagcagc tcaactggct caacaccacc 180
 ttcatcttgt ttgtgcccct ggctggtctc atatccactt actgggtccc tctgcagtgg 240
 aagacggctg tatgggctgt cgtctactac ttcaacaccg gcctgggaat tactgccggt 300
 aagtggctct tgaacaaacg agctaggccg ccgccctgta tccaatcatc tgtatccatc 360
 cctagatgct aactagaaaa cttgcgggtt accaccgact ttgggctcac agctcgtaca 420
 aggcctcgct tccgctcaaa atctaccttg ccgccgttgg cgctggtgcc gtcgagggct 480

ES 2 568 803 T3

ccatcagatg gtggtccaac ggtcaccgcg cacaccaccg atacaccgat accgagaagg 540
 acccctactc agtccgcaag ggtctcctgt actcacacat gggatggatg cttctgaagc 600
 agaaccccaa gaagcagggc cgcaccgaca tcaccgacct gaacgaggac cccgttgctg 660
 tttggcagca ccgcaacttc ctcaagtgtg ttatcttcat ggccctcgtc ttccccacac 720
 ttgtggctgg ccttggctgg ggtgactact ggggaggttt catctacgga ggtattctgc 780
 gtgtcttctt cgtccagcag gccaccttct gcgtcaactc gcttgcccac tggctcgggtg 840
 accagccttt cgacgatcgc aactcgcggc gtgatcacgt catcacagcc ctggtcaccc 900
 ttggagaggg ataccacaac ttccaccagc agttcccttc ggactaccgc aacgctattg 960
 agtggtagca gtatgacccc accaagtggc caatctggat ctggaagcag cttggtcttg 1020
 cccacaacct gaagcagttc cgccaaaacg agattgagaa gggacgcgtc cagcagctgc 1080
 agaagaagct cgaccagaag cgcgccaagc ttgattgggg tattcccttg gagcagcttc 1140
 ccggttggtag ctgggatgac tttgttgagc agtccaagaa cggaaaggct tggattgcag 1200
 ttgccggtgt catccacgat gttggtgact tcatcaagga ccaccctggt ggcagagctc 1260
 tcatcaactc ggccattggc aaggacgcaa ccgcaatctt caacggcggg gtttacaacc 1320
 actccaacgc cgctcacaac ctgctctcga ctatgcgtgt ggggtgtttg cgtggcggct 1380
 gcgaggttga gatctggaag cgcgccagc cggaaaacaa ggacgtctca accgtcgttg 1440
 attcttcggg taaccgcacg gtccgcgagg gtgggcaagc gaccaaggtc gtccagcctg 1500
 ttccgggtgc tcaggccgcg tga 1523

- 5 <210> 4
- <211> 1428
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Clon de MgD9Ds sin intrones

<400> 4
 atggcttcgt catcttctc cgtgccggag ttggctgccg ccttccctga tggcactacc 60
 gacttcaagc ccatgaggaa caccaagggc tacgacgtca gcaagccgca catttccgag 120
 acacctatga cactcaagaa ctggcataag cacgtcaact ggctcaacac caccttcac 180
 ttgtttgtgc ccctggctgg tctcatatcc acttactggg tccctctgca gtggaagacg 240
 gctgtatggg ctgtcgtcta ctacttcaac accggcctgg gaattactgc cggttaccac 300
 cgactttggg ctcacagctc gtacaaggcc tcgcttccgc tcaaaatcta ccttgccgcc 360
 gttggcgctg gtgccgtcga gggctccatc agatggtggg ccaacgggtca ccgcgcacac 420
 caccgataca ccgataccga gaaggacccc tactcagctc gcaagggctc cctgtactca 480
 cacatgggat ggatgcttct gaagcagaac cccaagaagc agggccgcac cgacatcacc 540
 gacctgaacg aggaccccggt tgtcgtttgg cagcaccgca acttctctca gtgtgttatc 600
 ttcatggccc tcgtcttccc cacacttgtg gctggccttg gctgggggtga ctactgggga 660

15

ES 2 568 803 T3

ggtttcatct acggaggtat tctgctgtc ttcttcgtcc agcaggccac cttctgcgtc 720
aactcgcttg cccactggct cggtgaccag ctttctgacg atcgcaactc gccgcgtgat 780
cacgtcatca cagccctggt cacccttggg gagggatacc acaacttcca ccacgagttc 840
ccttcggact accgcaacgc tattgagtgg taccagtatg accccaccaa gtggtcaatc 900
tggatctgga agcagcttgg tcttgcccac aacctgaage agttccgcca aaacgagatt 960
gagaagggac gcgtccagca gctgcagaag aagctcgacc agaagcgcgc caagcttgat 1020
tggggatttc ccttgagca gcttcccgtt gttagctggg atgactttgt tgagcagtcc 1080
aagaacggaa aggcttggat tgcagttgcc ggtgtcatcc acgatgttgg tgacttcatc 1140
aaggaccacc ctgggtggcag agctctcatc aactcggcca ttggcaagga cgcaaccgca 1200
atcttcaacg gcggtgttta caaccactcc aacgccgctc acaacctgct ctcgactatg 1260
cgtgtgggtg ttttgcgtgg cggctgcgag gttgagatct ggaagcgcgc ccagtccgaa 1320
aacaaggacg tctcaaccgt cgttgattct tcgggtaacc gcatcgtccg cgcgggtggg 1380
caagcgacca aggtcgtcca gcctgttccg ggtgctcagg ccgcgtga 1428

<210> 5

<211> 1997

5 <212> ADN

<213> Leptosphaeria nodorum

<400> 5

cccgatcatc taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg gcagtgcgcg 60
caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct 120
tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta 180
tgaccatgat tacgccaagc tcgaaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggagct 240
ccaccgcggt ggcggccgct ctagaactag tggatcccc gggctgcagg aattcggcac 300
gagtatgcct tcccaccagg ctgttgctgg catgcaggcc atcgaccccg agtttgtcaa 360
gcagccgtct cctatggcga gcacctcggg gcccaaccgc aactccaagt acgatcctaa 420
gaagccgcac attacagaca tgcccatcac gcggtcaaac tggtagcagc atgtcaactg 480
gctcaacgtc atcttcatca tcggcgtgcc tctcgtggc tgcgtcgcgc cttctggac 540
ccctctcgag tggaaagacc ctgcgtgggc tgcatctac ttttctgga ctggcctcgg 600
tatcaccgcc ggataccatc gtctctgggc acacaagtca tacaacgccg gtcttctctt 660
gaggatctgg ctcgccgccc tcggcgtggg tgctgttgag ggttccatcc gctggtggag 720
ccgtgaccac cgcgccacc accgctacac cgacaccaac aaggaccctt acagtgtccg 780
caaggcctt ctctacagcc atctcggatg gatggtcatg aagcagaacc ccaagcgtat 840
cggccgcacc gacatcaccg acttgaacga ggaccccggt gtcgtctggc agcacaagaa 900
ctacatcaag gccgtcgtca ccatgggctt gatctttccc tctgccgtcg ccggtctcat 960
gtggggcgat tggatgggtg gcttcatcta cgctggtatc ctccgtatct tcttcgtcca 1020
10 gcaggccacc ttctgcgtca actcgttgc tcaactggctc ggtgaccagc ctttcgacga 1080

ES 2 568 803 T3

ccgcaactct cctcgtgacc acgtcattac cgctcttgtc actctcggag agggctacca 1140
 caacttccac cacgagttcc cctccgacta ccgcaacgcc atcgagtggc accagtacga 1200
 ccctaccaag tggttccatct ggctgtggag caagctcggc ctgcctcca acctcaagca 1260
 gttccgctcc aacgaaatcg agaagggtcg tgtccagcag ctccagaaga agattgacca 1320
 gaagcgcgcc aagctcgact ggggtgtccc tctcgaccag ctgcctgtca tagaatggga 1380
 cgactatgtc gagcaggcca agaacggccg tggctctatc gctgtcgtg gtgtcgttca 1440
 tgacgttacc gacttcatca acgagacccc cgggtggcaag acgcttatca agagcggcgt 1500
 tggcaaggat gccaccgcca tgttcaacgg cgggtgtctac ttccactcca acggagccca 1560
 caacctcctt tctaccatga gggttgggtgt catccgcggg ggctgtgaag ttgagatctg 1620
 gaagcgcgct cagcgtgaga acaaggatgt cggctctggc ctggacgacg caggcaaccc 1680
 aatcatcagg gctggtaacc agattaccaa ggttgcgcaa cccattcaga gtgctagtgc 1740
 agcatagatt ggatcttcat cttcacgagc gatgtatggc gtttggttgt ctctcttct 1800
 tggcggacag agtaatatc aatttcttag cgatcgttag aaagcatcat ggttacgatg 1860
 ctcatgatg ttgatggcg tatgtttgta gccttcctcg agtgattggs tatgaaaagt 1920
 agcctcacgg cctagaccaa gaatgaaaac attcacgatt tcagaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
 aaactcgagg gggggcc 1997

 <210> 6
 <211> 39
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo Lnd9FAD2F
 10
 <400> 6

 ggatccatgg cggccttggg cagcattcca gaggataag 39

 15 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> cebador inverso Lnd9FAD2R

 <400> 7

 25 ccatggtcag ttagctacgc agccacagcc ccctcaac 38

 <210> 8
 <211> 1370
 <212> ADN
 30 <213> Leptosphaeria nodorum

 <400> 8

 ggatccatgg cggccttggg cagcattcca gaggataagg ctacctcgtc gaaatcgact 60

 catattcaat atcaagaagt aacttttcgg aactgggtata agaagataaa ttggctcaac 120
 35

ES 2 568 803 T3

acgacgctgg tggtgctcat acccgctctt ggactctacc taacacgcac cacgccactt 180
 acacgaccta cgctcatctg gtccgtcctg tactacttct gcacagcttt cggcatcaca 240
 ggcggatata atcgactatg gagtcatcgc agctactccg ctcgtctacc gctacgctta 300
 ttcttagcct tcacaggcgc cggagccatc caaggtagtg ctcgatggtg gagcgcaaat 360
 caccgcgccc accaccgatg gaccgacaca atgaaggacc cctactccgt tatgcgcggc 420
 ctattattct cgcacatcgg atggatggta ttgaacagcg accccaaagt caaaggccga 480
 acagacgtca gtgatctcga cagcgacccc gtcgtagtct ggcagcacia gactacggc 540
 aagtgcctgc tgttcgccgc gtggatattc cccatgatcg tagccggcct cggatgggga 600
 gattgggtggg gaggccttgt ctacgccggc atcattcgag cgtgtttcgt ccagcaggcg 660
 acattttgcg tgaactctct cgcgcattgg atcggcgagc agccgttcga cgacagacgc 720
 acgcctcgag accacgtttt gacagcgttg gtaacgatgg gagaaggata tcataacttc 780
 caccacgaat tccaagcga ttatcgcaac gcgatcatct ggtaccaata cgaccctacc 840
 aatggctca tttacctctt ctccctcggc cccttcccc tcgcatactc gctcaaaacc 900
 ttccgggtcca atgagattga aaaaggcggg ttgcaacaac aacaaaaagc cctggacaag 960
 aagcgtcag gacttgattg gggcctacc ctctccaac tccctgtcat atcgtgggac 1020
 gacttccaag cgcgttgcaa agagtccggc gagatgctgg ttgctgtcgc aggtgtgatt 1080
 cacgacgtca gccagtttat tgaagatcac cctggaggca ggagtttgat tcggagtgcg 1140
 gtgggcaaag atgggacagg gatgtttaat ggaggcgtat atgagcacag taatgcggcg 1200
 cataatctgt tgtcgacaat gagggtggga gtgcttagag gtgggcagga ggtggaggtg 1260
 tggaagaagc agagagtgga tgttttaggg aagagcgaca ttttgagaca ggttacgcgg 1320
 gtggagaggt tggttgaggg ggctgtggct gcgtagctaa ctgacatgg 1370

<210> 9
 <211> 1428
 <212> ADN
 <213> Magnaporthe grisea

5

<400> 9
 atggcttcgt catcttcctc cgtgccggag ttggctgccg ccttccctga tggcactacc 60
 gacttcaagc ccatgaggaa caccaagggc tacgacgtca gcaagccgca catttccgag 120
 acacctatga cactcaagaa ctggcataag cacgtcaact ggctcaacac caccttcac 180
 ttgtttgtgc ccctggctgg tctcatatcc acttactggg tccctctgca gtggaagacg 240
 gctgtatggg ctgtcgtcta ctacttcaac accggcctgg gaattactgc cggttaccac 300
 cgactttggg ctcacagctc gtacaaggcc tcgcttccgc tcaaaatcta ccttgccgcc 360
 gttggcgctg gtgccgtcga gggctccatc agatggtggt ccaacgggtca ccgcgcacac 420
 caccgataca ccgataccga gaaggacccc tactcagtcc gcaagggctc cctgtactca 480
 cacatgggat ggatgcttct gaagcagaac cccaagaagc agggccgcac cgacatcacc 540
 gacctgaacg aggaccccgt tgtcgtttgg cagcaccgca acttctctca gtgtgttacc 600

10

ES 2 568 803 T3

ttcatggccc tcgtcttccc cacacttggt gctggccttg gctgggggtga ctactgggga 660
 ggtttcatct acggagggtat tctgcgtgtc ttcttcgtcc agcaggccac cttctgcgtc 720
 aactcgcttg cccactggct cggtgaccag cctttcgacg atcgcaactc gccgcgtgat 780
 cacgtcatca cagccctggt cacccttggg gagggatacc acaacttcca ccacgagttc 840
 ccttcggact accgcaacgc tattgagtgg taccagtatg accccaccaa gtggtcaatc 900
 tggatctgga agcagcttgg tcttgcccac aacctgaagc agttccgcca aaacgagatt 960
 gagaaggggac gcgtccagca gctgcagaag aagctcgacc agaagcgcgc caagcttgat 1020
 tggggatttc ccttgagca gcttcccgtt gttagctggg atgactttgt tgagcagtc 1080
 aagaacggaa aggcttggat tgcagttgcc ggtgtcatcc acgatgttgg tgacttcac 1140
 aaggaccacc ctgggtggcag agctctcatc aactcggcca ttggcaagga cgcaaccgca 1200
 atcttcaacg gcggtgttta caaccactcc aacgccgtc acaacctgct ctcgactatg 1260
 cgtgtgggtg ttttgcgtgg cggctgcgag gttgagatct ggaagcgcgc ccagtccgaa 1320
 aacaaggacg tctcaaccgt cgttgattct tcgggtaacc gcatcgtccg cgcgggtggg 1380
 caagcgacca aggtcgtcca gcctgttccg ggtgctcagg ccgcgtga 1428

<210> 10
 <211> 1062
 <212> ADN
 <213> Helicoverpa zea

5

<400> 10

atggctcaa atatatcgga ggatgtgaac ggggtgctct tcgagagtga tgcagcgacg 60
 ccggacctgg cgtgtccac gccgcctgtg cagaaggctg acaacaggcc caagcaactg 120
 gtgtggagga acatactact gttcgcgtat cttcacttag cggctcttta cggaggttat 180
 ctgttctct tctcagctaa atggcagaca gacatatttg cctacatcct gtatgtgatc 240
 tccgggcttg gtatcacggc tggagcacat cgctgtggg cccacaagtc ctacaaagct 300
 aatggcctc tccgagttat cctggtcatc ttaacacag tggcattcca ggatgccgt 360
 atggactggg cgcgcgacca ccgatgcat cacaagtact cggaaaccga tgctgatcct 420
 cataatgca cccgaggatt cttcttctct cacattggct ggctgcttgt caggaacat 480
 cccgacctta aggagaagg caagggactc gacatgagcg acttacttgc tgacccatt 540
 ctcaggttcc agaaaaata ctacctgatc ctgatgccct tggcttgctt cgtgatgcct 600
 accgtgattc ctgtgtactt ctggggtgaa acctggacca acgcattctt tgtggcggcc 660
 atgttccgct acgcgttcat cctaaatgtg acgtggctcg tcaactctgc cgctcacaag 720
 tggggagaca agccctacga caaaagcatt aagccttccg aaaacttgtc ggtcgccatg 780
 ttcgctctcg gagaaggatt ccacaactac caccacactt tcccttggga ctacaaaact 840
 gctgagctgg gcaacaacaa actcaacttc actaccacct ttattaactt cttcgctaaa 900
 attggctggg cttacgacct gaagacagtg tctgatgata tcgtcaagaa cagggtgaag 960
 cgcactgggtg acggctccca ccacctgtgg ggctggggag acgaaaaatca atccaaagaa 1020
 gaaattgatg ccgctatcag aatcaatcct aaggacgatt aa 1062

10

<210> 11
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Leptosphaeria nodorum

15

ES 2 568 803 T3

<400> 11

```

atggcggcct tggacagcat tccagaggat aaggctacct cgtcgaaatc gactcatatt    60
caatatcaag aagtaacttt tcggaactgg tataagaaga taaattggct caacacgacg    120
ctggtggtgc tcataccgcg tcttgactc  tacctaacac gcaccacgcc acttacacga    180
cctacgctca tctggtccgt cctgtactac ttctgcacag ctttcggcat cacaggcgga    240
tatcatcgac tatggagtca tcgcagctac tccgctcgtc taccgctacg cttattccta    300
gccttcacag gcgccggagc catccaaggt agtgctcgat ggtggagcgc aaatcacgcg    360
gcccaccacc gatggaccga cacaatgaag gaccctact ccgttatgcg cggcctatta    420
ttctcgaca tcggatggat ggtattgaac agcgaccca aagtcaaagg ccgaacagac    480
gtcagtgatc tcgacagcga ccccgctcgt gtctggcagc acaagcacta cggcaagtgc    540
ctgctgttcg ccgctgggat attccccatg atcgtagccg gcctcggatg gggagattgg    600
tggggaggcc ttgtctacgc cggcatcatt cgagcgtggt tcgtccagca ggcgacattt    660
tgcgtgaact ctctcgcgca ttggatcggc gagcagccgt tcgacgacag acgcacgcct    720
cgagaccacg ttttgacagc gttggtaacg atgggagaag gatatacataa cttccaccac    780
gaattcccaa gcgattatcg caacgcgatc atctggtacc aatacgacc taccaaatgg    840
ctcatttacc tcttctccct cggccccttc ccctcgcgat actcgcctcaa aaccttccgg    900
tccaatgaga ttgaaaaagg gcggttgcaa caacaacaaa aagccctgga caagaagcgc    960
tcaggacttg attggggcct acccctcttc caactccctg tcatatcgtg ggacgacttc   1020
caagcgcggt gcaaagagtc cggcgagatg ctggttgctg tcgcaggtgt gattcacgac   1080
gtcagccagt ttattgaaga tcaccctgga ggcaggagtt tgattcggag tgcggtgggc   1140
aaagatggga cagggatggt taatggaggc gtatatgagc acagtaatgc ggcgcataat   1200
ctggtgtcga caatgagggt gggagtgcct agaggtgggc aggaggtgga ggtgtggaag   1260
aagcagagag tggatgtttt agggaagagc gacattttga gacaggttac gcgggtggag   1320
aggttggttg agggggctgt ggctgcgtag                                     1350

```

5

<210> 12

<211> 475

<212> PRT

<213> Magnaporthe grisea

10

<400> 12

```

Met Ala Ser Ser Ser Ser Ser Val Pro Glu Leu Ala Ala Ala Phe Pro
1           5                   10                   15

```

ES 2 568 803 T3

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

ES 2 568 803 T3

Glu Trp Tyr Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Trp Ser Ile Trp Ile Trp Lys
 290 295 300

Gln Leu Gly Leu Ala His Asn Leu Lys Gln Phe Arg Gln Asn Glu Ile
 305 310 320

Glu Lys Gly Arg Val Gln Gln Leu Gln Lys Lys Leu Asp Gln Lys Arg
 325 330 335

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

Trp Asp Asp Phe Val Glu Gln Ser Lys Asn Gly Lys Ala Trp Ile Ala
 355 360 365

Val Ala Gly Val Ile His Asp Val Gly Asp Phe Ile Lys Asp His Pro
 370 375 380

Gly Gly Arg Ala Leu Ile Asn Ser Ala Ile Gly Lys Asp Ala Thr Ala
 385 390 395 400

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

Leu Ser Thr Met Arg Val Gly Val Leu Arg Gly Gly Cys Glu Val Glu
 420 425 430

Ile Trp Lys Arg Ala Gln Ser Glu Asn Lys Asp Val Ser Thr Val Val
 435 440 445

Asp Ser Ser Gly Asn Arg Ile Val Arg Ala Gly Gly Gln Ala Thr Lys
 450 455 460

Val Val Gln Pro Val Pro Gly Ala Gln Ala Ala
 465 470 475

<210> 13
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Helicoverpa zea

5

<400> 13

Met Ala Pro Asn Ile Ser Glu Asp Val Asn Gly Val Leu Phe Glu Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Ala Thr Pro Asp Leu Ala Leu Ser Thr Pro Pro Val Gln Lys
 20 25 30

Ala Asp Asn Arg Pro Lys Gln Leu Val Trp Arg Asn Ile Leu Leu Phe
 35 40 45

10

ES 2 568 803 T3

Ala Tyr Leu His Leu Ala Ala Leu Tyr Gly Gly Tyr Leu Phe Leu Phe
50 55 60

Ser Ala Lys Trp Gln Thr Asp Ile Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Ile
65 70 75 80

Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu Trp Ala His Lys
85 90 95

Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Val Ile Leu Val Ile Phe Asn
100 105 110

Thr Val Ala Phe Gln Asp Ala Ala Met Asp Trp Ala Arg Asp His Arg
115 120 125

Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro His Asn Ala Thr
130 135 140

Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu Val Arg Lys His
145 150 155 160

Pro Asp Leu Lys Glu Lys Gly Lys Gly Leu Asp Met Ser Asp Leu Leu
165 170 175

Ala Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr Leu Ile Leu Met
180 185 190

Pro Leu Ala Cys Phe Val Met Pro Thr Val Ile Pro Val Tyr Phe Trp
195 200 205

Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala Met Phe Arg Tyr
210 215 220

Ala Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser Ala Ala His Lys
225 230 235 240

Trp Gly Asp Lys Pro Tyr Asp Lys Ser Ile Lys Pro Ser Glu Asn Leu
245 250 255

Ser Val Ala Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His Asn Tyr His His
260 265 270

Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly Asn Asn Lys Leu
275 280 285

Asn Phe Thr Thr Thr Phe Ile Asn Phe Phe Ala Lys Ile Gly Trp Ala
290 295 300

Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Asp Ile Val Lys Asn Arg Val Lys
305 310 315 320
Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Glu Asn
325 330 335

Gln Ser Lys Glu Glu Ile Asp Ala Ala Ile Arg Ile Asn Pro Lys Asp
340 345 350

Asp

<210> 14
<211> 449

5

ES 2 568 803 T3

<212> PRT

<213> Leptosphaeria nodorum

<400> 14

5

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

ES 2 568 803 T3

atggccagca gttcttcaag tgtgccagaa cttgccgag ctttccctga tgggacaacg 60
gacttcaaac ccatgaggaa caccaaaggc tatgatgtct ccaaacctca catctctgaa 120
acaccgatga ctttgaagaa ctggcacaaa catgtgaact ggctcaacac cacattcatt 180
ctctttgttc cactggctgg gttgatctca acctattggg ttcctcttca atggaaaact 240
gcagtgtggg cagttgtgta ctacttcaac actggacttg ggatcactgc tggctacat 300
agattgtggg cacattcctc ttacaaggcc agcttgctc tcaaaatcta ccttgccgca 360
gttggtgctg gagccgttga aggttcata agatggtgga gcaacggaca cagagcacat 420
cacagataca cagacacaga gaaagatcct tactcagtga ggaagggatt gctctacagc 480
cacatgggtt ggatgctctt gaagcagaat ccaaagaagc aagggaggac ggacattact 540
gatctgaatg aggaccagt tgtggtctgg caacatagga actttctcaa gtgtgtgatc 600
ttcatggctt tggctttcc caccctgtt gctggcctgg gatggggaga ctactgggga 660
ggtttcatct atggagggat cttgagagtg ttctttgttc agcaagccac cttctgtgtc 720
aactcacttg cacattggct tggatgatca ccgtttgatg acagaaactc tccacgtgac 780
catgtcataa ctgctcttgt cacgctgggt gaaggctatc acaacttca ccatgagttt 840
ccgtcagact atagaaatgc gattgagtgg tatkagtatg accccacgaa gtggagcatt 900
tggatttggg agcaacttgg acttgctcac aatctcaagc agttcagaca gaatgagata 960
gagaagggaa gggttcaaca gttgcagaag aaactggatc agaagagagc gaaacttgat 1020
tggggaatac cgttggaaca actccctgtt gtgtcttggg atgactttgt tgaacagtca 1080
aagaatggca aggcattgat tgctgttctt ggtgtcattc acgatgttgg tgacttcac 1140
aaggatcatc ctggtggacg tgctctcatc aactctgca ttggcaaaga tgccacagcg 1200
atcttcaatg gaggtgtcta caatcattca aatgccgcac acaaccttct ctccaccatg 1260
agggttggtg tcctccgtgg aggggtgcgaa gtggagatat ggaaacgtgc tcaaagtgag 1320
aacaagatg tctctactgt ggttgatagt tctggcaacc gtattgtgag agctggtgga 1380
caagctacca aagtggttca gccagtcctt ggtgctcaag cagcttga 1428

<210> 16
<211> 1062
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de la desaturasa optimizada para colza

<400> 16

atggctccca acatttctga ggatgtcaat ggtgttcttt ttgagtcaga tgcggcaacc 60

ES 2 568 803 T3

cctgatttgg ctctttccac accacctgtg caaaaagctg ácaacagacc caagcaactt 120
 gtgtggagga acattttgct tttcgcttac ttgcacctcg cagctctcta cggaggctat 180
 ttgtttctct tcagtgcaaa atggcagacc gacattttcg cttacattct ttatgtcatc 240
 tctggactgg ggataactgc tggggcacat agactctggg ctcacaagtc atacaaagcc 300
 aagtggccac tcagagttat actggtcatc ttcaacacgg ttgcctttca agacgctgct 360
 atggattggg ctcgtgacca tagaatgcat cacaagtaca gcgagaccga cgcggaccca 420
 cacaatgcaa cgagaggttt cttcttctct cacattggct ggcttcttgt taggaaacat 480
 cctgatctga aagaaaaagg gaagggactc gacatgagtg atctccttgc tgatccaata 540
 ctccgttttc agaagaagta ctatctgac ctcatgcctc tggcctgttt tgtgatgcca 600
 accgttatcc cggtttactt ttggggagaa acttgacaa atgctttctt cgtggcagcc 660
 atgttccggt atgctttcat cctgaatgtt acctggttgg tgaactctgc cgcacacaag 720
 tggggagaca aaccctatga caagtcctac aagccttccg aaaacctttc agttgcatg 780
 tttgctttgg gagaaggatt tcacaattac catcacactt ttccgtggga ctacaagaca 840
 gcagagcttg gaaacaacaa gttgaacttc aacaacacgt tcatcaattt ctttgcgaaa 900
 atcggttggg cctatgattt gaagactgtg agtgatgaca ttgtcaagaa cagggtaag 960
 agaactggcg atggaagcca tcatctctgg ggctggggtg atgagaatca gagcaaagaa 1020
 gatagatg cagccattag gatcaaccct aaagacgatt ga 1062

<210> 17
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de la desaturasa optimizada para colza

10

<400> 17
 atggctgcac ttgatagcat ccctgaggac aaagcaacta gctccaagtc aaccacata 60
 cagtaccaag aggtcacggt taggaactgg tacaagaaaa tcaactggct caacacgacc 120
 cttgttgtcc tcattcctgc tcttgggttg tacttgacga gaaccacacc tctcaccaga 180
 cctaccctca tttggtctgt tctctactat ttctgtacag cgtttggcat cactggtggc 240
 taccacagac tttggtccca taggtcttac agtgcgaggt tgccattgag actcttctg 300
 gctttcactg gagctggtgc gatccaaggt tctgcaagat ggtggtcagc caatcatagg 360
 gcacatcacc gttggacgga caccatgaag gaccctact ctgtgatgag aggactgctg 420
 ttctcccaca taggttggat ggttctcaac tctgatcaa aggtcaaagg cagaacagat 480
 gtttctgac ttgactctga tcccgtcgtt gtgtggcaac acaaacacta tggcaagtgt 540
 ttgctctttg ccgcttggat ctttccgatg atagtggctg ggctggggtg gggagattgg 600
 tggggtggac ttgtctatgc tggcatcata cgtgcctgct ttgttcagca agccactttc 660
 tgtgtcaact cattggcaca ttggataggt gaacaaccgt ttgatgacag acgtactcca 720

ES 2 568 803 T3

	agggatcatg ttctgactgc gttggtcaca atgggagaag gataccacaa cttccacat	780
	gagtttccga gtgactacag aaatgccatc atttggatc agtatgacc tacaaagtgg	840
	ctcatctatc tcttcagctt gggtccttc ccattggcct actctctcaa gaccttccgt	900
	tccaatgaga ttgagaaagg aaggcttcag caacagcaaa aggcctctga caagaaaaga	960
	agtggctctg attggggact tcctctcttc cagcttccag tgatctcatg ggatgacttt	1020
	caagctcggt gcaaagaaag tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt gatccatgat	1080
	gtctcccagt tcattgaaga tcatctggt gggaggagcc tcattagaag tgctgttggg	1140
	aaagatggga ctggcatggt caatggtgga gtgtatgaac attcaaacgc cgcacacaac	1200
	ttgctgagca caatgagagt tggagtcttg agaggtggac aagaagtgga ggtttggaa	1260
	aaacagaggg tggatgttct tgggaagtca gacattcttc gtcaagtgac aagggtggag	1320
	cgtctgggtg aaggagctgt tgcagcgtga	1350
	<210> 18	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador MAS414	
	<400> 18	
	tgaagcattc cataagccgt cacg	24
15	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador MAS415	
	<400> 19	
25	gaaattatca cgcttccgca cacg	24
	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador MAS413	
35	<400> 20	
	tgggctgaat tgaagacatg ctcc	24
40	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> CEbador arw008	
	<400> 21	
	acaccttca ccagacctac cctca	25

<210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador arw009

 10 <400> 22

 cacacaacga cgggatcaga gt 22

 <210> 23
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador arw010

 <400> 23

 caagtcatac aaagccaagt ggcc 24
 25
 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador arw011

 <400> 24
 35
 taacggaaca tggctgccac ga 22

 <210> 25
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador AntiLnD9DS2F
 45
 <400> 25

 catatgttcg acgacagacg cagcctcga gac 33
 50
 <210> 26
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador AntiLnD9DS2Rh

 <400> 26
 60 ggatccgcag ccacagcccc ctcaaccaac ctctc 35

 <210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador AntiMgD9DSF

 <400> 27
 5 catatgttcg acgatacga ctcgccgct gatcac 36

 <210> 28
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador AntiMgD9DSRh
 15 <400> 28

 ggatccgcg cctgagcacc cggaacaggc tg 32
 20 <210> 29
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador AntiHzD9DSF

 <400> 29
 30 catatgtatg acaagtccat caagccttcc 30

 <210> 30
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador AntiHzD9DSRh
 40 <400> 30

 ggatcctcgt ctttaggggt gatcctaag gctgc 35
 45 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Cebador directo para AnD9Ds diana

 <400> 31

 ggacttctct actctcacct tgga 24
 55 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador inverso para AnD9Ds diana

 <400> 32
 65 tccgatcctc tttgggttct 20

<210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador directo para HzD9Ds diana

 10 <400> 33

 gaccacaca atgcaacg 18

 <210> 34
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador inverso para HzD9Ds diana

 <400> 34

 cctaacaaga agccagccaa t 21
 25
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador directo para LnD9Ds diana

 <400> 35
 35
 gttctgactg cgttggtcac 20

 <210> 36
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso para LnD9Ds diana
 45
 <400> 36

 cggaaactca tgggtgaagt 20
 50
 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Cebador directo para Actina diana

 <400> 37

 60 ctactggtat tgtgctcgac t 21

 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso para Actina diana

 <400> 38
 5 ctctctcggg gagaatcttc at 22

 <210> 39
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda de Actina
 15 <400> 39

 cacgctatcc tccgtctcga tc 22
 20 <210> 40
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia de Kozak

 <400> 40
 30 ggatccaaca atg 13

 <210> 41
 <211> 13
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Kozak

 <400> 41
 40 acaaccaaaa atg 13

 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de Kozak
 50 <400> 42

 acaaccaacc taccatgg 18
 55 <210> 43
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia de Kozak

 <400> 43
 65 acaaccaaaa aatg 14

ES 2 568 803 T3

<210> 44
 <211> 1350
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Desaturasa optimizada para colza

 10 <400> 44

 atggctgctc ttgattctat cccagaggat aaggctacct cttctaagtc taccacatc 60
 caataccaag aagttacctt caggaactgg tacaagaaga tcaactggct taaccacc 120
 cttgttgctt ttatcccagc tcttgactt taccttacca ggaccacccc acttaccagg 180
 ccaaccctta tctggctctg tctttactac ttctgcaccg ctttcggaat aaccggagga 240
 taccacaggc tttggctctc caggctctac tctgctaggc ttccacttag gcttttcctt 300
 gctttcaccg gagctggagc tatccaagga tctgctagat ggtggctctc taaccacagg 360
 gctcaccaca ggtggaccga taccatgaag gaccatact ctgttatgag gggacttctt 420
 ttctctcaca tcggatggat ggttcttaac tctgatccaa aggttaaggg aaggaccgat 480
 gtttctgatc ttgattctga tccagttggt gtttggaac acaagcacta cggaaagtgc 540
 cttcttttctg ctgcttggat cttcccaatg atcgttgctg gacttggatg gggagattgg 600
 tggggaggac ttgtttacgc tggaatcatc agggcttgct tcgttcaaca agctaccttc 660
 tgcgttaact ctcttgctca ctggatcggg gagcaacct tcgacgatag gaggacccca 720
 agggatcacg ttcttaccgc tcttgttacc atgggagagg gataccaca cttccaccac 780
 gagttcccat ctgattacag gaacgctatc atctggatc aatacgtacc aaccaagtgg 840
 cttatctacc ttttctctct tggaccattc cacttgctt actctcttaa gaccttcagg 900
 tctaacgaga tcgagaaggg aaggcttcaa caacaacaaa aggctcttga taagaagagg 960
 tctggacttg attggggact tccacttttc caacttccag ttatctcttg ggatgatttc 1020
 caagctaggt gcaaggagtc tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt tatccacgat 1080
 gtttctcaat tcacgagga tcaccagga ggaaggctc ttatcaggtc tgctgttga 1140
 aaggatggaa ccggaatggt caacggagga gtttacgagc actctaacgc tgctcacaac 1200
 cttcttttcta ccatgagggt tggagtctt aggggaggac aagaggttga ggtttggaag 1260
 aagcaaaggg ttgatgttct tggaaagtca gatatcctta ggcaagttac cagggttgag 1320
 aggcttggtg agggagctgt tgctgcttga 1350

 <210> 45
 15 <211> 1062
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Desaturasa optimizada para colza

 <400> 45

 atggctcaa acatctctga ggatgttaac ggagttcttt tcgagtctga tgctgctacc 60
 ccagatcttg ctctttctac cccaccagtt caaaggctg ataacaggcc aaagcaactt 120
 gtttgaggga acatccttct tttcgcttac cttcaccttg ctgctcttta cggaggatac 180
 ctttctcttt tctctgctaa gtggcaaac gatatcttcg cttacatcct ttacgttacc 240

ES 2 568 803 T3

aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaaat caccgctgga 240
 taccacaggc tttgggctca ctgctcttac tctgctactc ttccacttag gatctggctt 300
 gctgctgttg gaggaggagc tgttgagga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 360
 gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctggttaggaa gggacttctc 420
 tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac 480
 atctctgatc tcaacgagga cccagtgtgt gtttggcaac acaggaacta cctcaagggt 540
 gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttggatg gggagattgg 600
 cttggaggat tcgtgtacgc tggaatcctt aggatcttct tcggtcaaca agctaccttc 660
 tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttggga gatcaacat tcgatgatag gaactctcct 720
 agggatcacg tgatcaccgc tcttgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 780
 gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg 840
 tctatctggg cttggaagca acttggattg gcttacgatc tcaagaagt cagggctaac 900
 gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact 960
 cttgattggg gaacccccact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag 1020
 caagctaaga acggaagggg acttgttgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac 1080
 ttcatacaagg atcaccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct 1140
 accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacg cagctcacia cttcttagc 1200
 accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggtg agatctggaa gagggctcag 1260
 aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag 1320
 caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttga 1368

<210> 49
 <211> 1368
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante silencioso de AnD9DS v3

10

<400> 49
 atgtctgctc caaccgctga catcagggct agggctccag aggctaagaa ggttcacatc 60
 gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc 120
 ctcatcatcg gaatccccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc 180
 aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaaat caccgctgga 240
 taccacaggc tttgggctca ctgctcatac tctgctactc ttccacttag gatctggctt 300
 gctgctgttg gaggaggagc tgttgagga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 360
 gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctggttaggaa gggacttctc 420
 tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac 480
 atctctgatc tcaacgagga cccagtgtgt gtttggcaac acaggaacta cctcaagggt 540

ES 2 568 803 T3

gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttggatg gggagattgg 600
 cttggaggat tcgtgtacgc tggaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctaccttc 660
 tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttga gatcaacat tcgatgatag gaactctct 720
 agggatcacg tgatcaccgc tcttgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 780
 gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg 840
 tctatctggg cttggaagca acttggattg gcttacgatc tcaagaagt cagggctaac 900
 gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact 960
 cttgattggg gaacccact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag 1020
 caagctaaga acggaagggg acttgttgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac 1080
 ttcataaagg atcaccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct 1140
 accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacg cagctcacia cttcttagc 1200
 accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggtg agatctggaa gagggctcag 1260
 aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag 1320
 caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttga 1368

<210> 50
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Aspergillus nidulans

5

<400> 50

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

10

ES 2 568 803 T3

Asp Lys Asp Pro Tyr Ser Val Arg Lys Gly Leu Leu Tyr Ser His Leu
 130 135 140

Gly Trp Met Val Met Lys Gln Asn Pro Lys Arg Ile Gly Arg Thr Asp
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Leu Asn Glu Asp Pro Val Val Val Trp Gln His Arg Asn
 165 170 175

Tyr Leu Lys Val Val Phe Thr Met Gly Leu Ala Val Pro Met Leu Val
 180 185 190

Ala Gly Leu Gly Trp Gly Asp Trp Leu Gly Gly Phe Val Tyr Ala Gly
 195 200 205

Ile Leu Arg Ile Phe Phe Val Gln Gln Ala Thr Phe Cys Val Asn Ser
 210 215 220

Leu Ala His Trp Leu Gly Asp Gln Pro Phe Asp Asp Arg Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Arg Asp His Val Ile Thr Ala Leu Val Thr Leu Gly Glu Gly Tyr His
 245 250 255

Asn Phe His His Glu Phe Pro Ser Asp Tyr Arg Asn Ala Ile Glu Trp
 260 265 270

His Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Trp Ser Ile Trp Ala Trp Lys Gln Leu
 275 280 285

Gly Leu Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Phe Arg Ala Asn Glu Ile Glu Lys
 290 295 300

Gly Arg Val Gln Gln Leu Gln Lys Lys Leu Asp Arg Lys Arg Ala Thr
 305 310 315 320

Leu Asp Trp Gly Thr Pro Leu Asp Gln Leu Pro Val Met Glu Trp Asp
 325 330 335

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

Gly Val Val His Asp Val Thr Asp Phe Ile Lys Asp His Pro Gly Gly
 355 360 365

Lys Ala Met Ile Ser Ser Gly Ile Gly Lys Asp Ala Thr Ala Met Phe
 370 375 380

Asn Gly Gly Val Tyr Tyr His Ser Asn Ala Ala His Asn Leu Leu Ser
 385 390 395 400

ES 2 568 803 T3

Thr Met Arg Val Gly Val Ile Arg Gly Gly Cys Glu Val Glu Ile Trp
 405 410 415

Lys Arg Ala Gln Lys Glu Asn Val Glu Tyr Val Arg Asp Gly Ser Gly
 420 425 430

Gln Arg Val Ile Arg Ala Gly Glu Gln Pro Thr Lys Ile Pro Glu Pro
 435 440 445

Ile Pro Thr Ala Asp Ala Ala
 450 455

<210> 51

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Aspergillus nidulans

<400> 51

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

Lys Val His Ile Ala Asp Thr Ala Ile Asn Arg His Asn Trp Tyr Lys
 20 25 30

His Val Asn Trp Leu Asn Val Phe Leu Ile Ile Gly Ile Pro Leu Tyr
 35 40 45

Gly Cys Ile Gln Ala Phe Trp Val Pro Leu Gln Leu Lys Thr Ala Ile
 50 55 60

Trp Ala Val Ile Tyr Tyr Phe Phe Thr Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly
 65 70 75 80

Tyr His Arg Leu Trp Ala His Cys Ser Tyr Ser Ala Thr Leu Pro Leu
 85 90 95

Arg Ile Trp Leu Ala Ala Val Gly Gly Gly Ala Val Glu Gly Ser Ile
 100 105 110

Arg Trp Trp Ala Arg Asp His Arg Ala His His Arg Tyr Thr Asp Thr
 115 120 125

Asp Lys Asp Pro Tyr Ser Val Arg Lys Gly Leu Leu Tyr Ser His Leu
 130 135 140

Gly Trp Met Val Met Lys Gln Asn Pro Lys Arg Ile Gly Arg Thr Asp
 145 150 155 160

10 Ile Ser Asp Leu Asn Glu Asp Pro Val Val Val Trp Gln His Arg Asn
 165 170 175

ES 2 568 803 T3

Tyr Leu Lys Val Val Phe Thr Met Gly Leu Ala Val Pro Met Leu Val
 180 185 190
 Ala Gly Leu Gly Trp Gly Asp Trp Leu Gly Gly Phe Val Tyr Ala Gly
 195 200 205
 Ile Leu Arg Ile Phe Phe Val Gln Gln Ala Thr Phe Cys Val Asn Ser
 210 215 220
 Leu Ala Leu Trp Leu Gly Asp Gln Pro Phe Asp Asp Arg Asn Ser Pro
 225 230 235 240
 Arg Asp His Val Ile Thr Ala Leu Val Thr Leu Gly Glu Gly Tyr His
 245 250 255
 Asn Phe His His Glu Phe Pro Ser Asp Tyr Arg Asn Ala Ile Glu Trp
 260 265 270
 His Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Trp Ser Ile Trp Ala Trp Lys Gln Leu
 275 280 285
 Gly Leu Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Phe Arg Ala Asn Glu Ile Glu Lys
 290 295 300
 Gly Arg Val Gln Gln Leu Gln Lys Lys Leu Asp Arg Lys Arg Ala Thr
 305 310 315 320
 Leu Asp Trp Gly Thr Pro Leu Asp Gln Leu Pro Val Met Glu Trp Asp
 325 330 335
 Asp Tyr Val Glu Gln Ala Lys Asn Gly Arg Gly Leu Val Ala Ile Ala
 340 345 350
 Gly Val Val His Asp Val Thr Asp Phe Ile Lys Asp His Pro Gly Gly
 355 360 365
 Lys Ala Met Ile Ser Ser Gly Ile Gly Lys Asp Ala Thr Ala Met Phe
 370 375 380
 Asn Gly Gly Val Tyr Tyr His Ser Asn Ala Ala His Asn Leu Leu Ser
 385 390 395 400
 Thr Met Arg Val Gly Val Ile Arg Gly Gly Cys Glu Val Glu Ile Trp
 405 410 415
 Lys Arg Ala Gln Lys Glu Asn Val Glu Tyr Val Arg Asp Gly Ser Gly
 420 425 430
 Gln Arg Val Ile Arg Ala Gly Glu Gln Pro Thr Lys Ile Pro Glu Pro
 435 440 445
 Ile Pro Thr Ala Asp Ala Ala
 450 455

5 <210> 52
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 52

ES 2 568 803 T3

Met Pro Thr Ser Gly Thr Thr Ile Glu Leu Ile Asp Asp Gln Phe Pro
1 5 10 15

Lys Asp Asp Ser Ala Ser Ser Gly Ile Val Asp Glu Val Asp Leu Thr
20 25 30

Glu Ala Asn Ile Leu Ala Thr Gly Leu Asn Lys Lys Ala Pro Arg Ile
35 40 45

Val Asn Gly Phe Gly Ser Leu Met Gly Ser Lys Glu Met Val Ser Val
50 55 60

Glu Phe Asp Lys Lys Gly Asn Glu Lys Lys Ser Asn Leu Asp Arg Leu
65 70 75 80

Leu Glu Lys Asp Asn Gln Glu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Lys Ile His
85 90 95

Ile Ser Glu Gln Pro Trp Thr Leu Asn Asn Trp His Gln His Leu Asn
100 105 110

Trp Leu Asn Met Val Leu Val Cys Gly Met Pro Met Ile Gly Trp Tyr
115 120 125

Phe Ala Leu Ser Gly Lys Val Pro Leu His Leu Asn Val Phe Leu Phe
130 135 140

Ser Val Phe Tyr Tyr Ala Val Gly Gly Val Ser Ile Thr Ala Gly Tyr
145 150 155 160

His Arg Leu Trp Ser His Arg Ser Tyr Ser Ala His Trp Pro Leu Arg
165 170 175

Leu Phe Tyr Ala Ile Phe Gly Cys Ala Ser Val Glu Gly Ser Ala Lys
180 185 190

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

Arg Asp Pro Tyr Asp Ala Arg Arg Gly Leu Trp Tyr Ser His Met Gly
210 215 220

Trp Met Leu Leu Lys Pro Asn Pro Lys Tyr Lys Ala Arg Ala Asp Ile

ES 2 568 803 T3

ggactagtcc agaaggtaat tatccaagat gtagcatcaa gaatccaatg tttacgggaa 60
 aaactatgga agtattatgt aagctcagca agaagcagat caatatgagg cacatatgca 120
 acctatgttc aaaaatgaag aatgtacaga tacaagatcc tatactgcca gaatacgaag 180
 aagaatacgt agaaattgaa aaagaagaac caggcgaaga aaagaatctt gaagacgtaa 240
 gcaactgacga caacaatgaa aagaagaaga taaggctcggg gattgtgaaa gagacataga 300
 ggacacatgt aagggtgaaa atgtaagggc ggaaagtaac cttatcacia aggaatctta 360
 tccccacta cttatccttt tatatttttc cgtgtcattt ttgcccttga gttttcctat 420
 ataaggaacc aagttcggca tttgtgaaaa caagaaaaaa tttgggtgaa gctattttct 480
 ttgaagtact gaggatacaa cttcagagaa atttgtaagt ttgtaggtac cagatctgga 540
 tcccaaacca tgtctccgga gaggagacca gttgagatta ggccagctac agcagctgat 600
 atggccgagg tttgtgatat cgtaaccat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg 660
 acagagccac aaacaccaca agagtggtatt gatgatctag agaggttgca agatagatac 720
 ccttggttgg ttgctgaggt tgagggtggt gtggctggta ttgcttacgc tgggccctgg 780
 aaggctagga acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttacgtgtc acataggcat 840
 caaagggttg gcctaggatc tacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcgcaa 900
 ggttttaagt ctgtggttgc tgttataggc cttccaaacg atccatctgt taggttgcat 960
 gaggctttgg gatacacagc ccgggggtaca ttgcgcgag ctggatacaa gcatggtgga 1020
 tggcatgatg ttggtttttg gcaaagggat tttgagttgc cagctcctcc aaggccagtt 1080
 aggccagtta cccaaatctg agtagttagc ttaatcacct agagctcgat cggcggcaat 1140
 agcttcttag cgccatcccg ggttgatcct atctgtgttg aaatagttgc ggtgggcaag 1200
 gctctctttc agaaagacag gcggccaaag gaacccaagg tgagggtggc tatggctctc 1260
 agttccttgt ggaagcgctt ggtctaaggc gcagaggtgt tagcgggatg aagcaaaagt 1320
 gtccgattgt aacaagatat gttgatccta cgtaaggata ttaaagtatg tattcatcac 1380
 taatataatc agtgtattcc aatattgtact acgatttcca atgtctttat tgtcgcgta 1440
 tgtaatcggc gtcacaaaat aatccccggg gactttcttt taatccagga tgaaataata 1500
 tgttattata atttttgcga tttggtccgt tataggaatt gaagtgtgct tgaggctcgg 1560
 cgccaccact ccattttcat aattttacat gtatttgaaa aataaaaatt tatggtattc 1620
 aatttaaaca cgtatacttg taagaatga tatcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt 1680

ES 2 568 803 T3

attgataaaa taacaagtca ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca 1740
 agtttaaatt cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg 1800
 aaagactgag tgcgatatta tgggtgaata cataggaatt cgtttaaacg atctgctct 1860
 aattttcggt ccaacttgca caggaaagac gtcgaccgcg gtagctcttg cccagcagac 1920
 tgggcttcca gtcctttcgc tcgatcgggt ccaatgttgt cctcagctgt gaaccggaag 1980
 cggacgacca acagtggaag aactgaaagg aacgagccgt ctataccttg atgatcggcc 2040
 tctggtgaag ggtatcatcg cagccaagca agctcatgaa aggctgatgg gggagggtga 2100
 taattatgag gccacggcg ggcttattct ttagggagga tctatctcgt tgctcaagtg 2160
 catggcgcaa agcagttatt ggagtgcgga ttttcgttgg catattattc gccacgagtt 2220
 agcagacgaa gagaccttca tgaacgtggc caaggccaga gttaagcaga tgttacccc 2280
 tgctgcaggc ctttctatta tccaatagtt ggttgatctt tggaaagagc ctcggctgag 2340
 gcccatactg aaagagatcg atggatatcg atatgccatg ttgtttgcta gccagaacca 2400
 gatcacatcc gatatgctat tgcagcttga cgcagatatg gaggataagt tgattcatgg 2460
 gatcgtcag gagtagctca tccatgcacg ccgacaagaa cagaaattcc gtcgagttaa 2520
 cgcagccgct tacgacggat tcgaaggcca tccattcggg atgtattagt ttgcaccagc 2580
 tccgcgtcac acctgtcttc atttgaataa gatgtagca attgttttta gctttgtctt 2640
 gttgtggcag ggcggcaagt gcttcagaca tcattctggt ttcaaatttt atgctggaga 2700
 acagcttctt aattccttgg gaaataatag actgctctt aaaattcaga tgtctggata 2760
 tagatatgat tgtaaaataa cctatttaag tgtcatttag aacataagtt ttatgaatgt 2820
 tcttccattt tcgtcatcga acgaataaga gtaaatacac cttttttaac attacaata 2880
 agttcttata cgttgtttat acaccgggaa tcatttccat tattttcgcg caaaagtcac 2940
 ggatattcgt gaaagcgaca taaactgcga aatttgcggg gagtgtcttg agtttgctc 3000
 gaggctagcg catgcacata gacacacaca tcatctcatt gatgcttggg aataattgtc 3060
 attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aattttagac aagtatcaaa 3120
 cggatgtgac ttcagtacat taaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 3180
 aatttgattt acaattgaat atatcctgcc ccagccagcc aacagctcga tttacaattg 3240
 aatatacctt gccggccggc ccacgcgtgt cgaggaattc tgatctggcc cccatttggg 3300
 cgtgaatgta gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt 3360
 cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata 3420
 ataacgtgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaa ttggaatta ctctttcttt 3480
 ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc 3540
 atttacaatt gaatatatcc tgccgccgct gccgcttgc acccgggtgga gcttgcatgt 3600
 tggtttctac gcagaactga gccggttagg cagataattt ccattgagaa ctgagccatg 3660
 tgcaccttcc cccaacacg gtgagcgacg gggcaacgga gtgatccaca tgggactttt 3720

ES 2 568 803 T3

aaacatcatc cgctcggatgg cgttgcgaga gaagcagtcg atccgtgaga tcagccgacg 3780
 caccgggacg gcgcgcaaca cgatcgcaaa gtatttgaac gcaggtacaa tcgagccgac 3840
 gttcacgcgg aacgaccaag caagcttggc tgccattttt ggggtgaggc cgttcgcggc 3900
 cgaggggagc agcccctggg gggatgggag gcccgcgta gcgggcccgg agggttcgag 3960
 aagggggggc accccccttc ggcgtgcgcg gtcacgcgca cagggcgag ccctgggtaa 4020
 aaacaaggtt tataaatatt ggtttaaag caggttaaaa gacaggttag cggtgccga 4080
 aaaacgggag gaaaccctg caaatgctg attttctgcc tgtggacagc ccctcaaatg 4140
 tcaataggtg gcgccctcat ctgtcagcac tctgcccctc aagtgtcaag gatcgcgccc 4200
 ctcatctgtc agtagtcgag cccctcaagt gtcaataccg cagggcactt atccccaggc 4260
 ttgtccacat catctgtggg aaactcgcgt aaaatcaggc gttttcgccg atttgcgagg 4320
 ctggccagct ccacgtcgcc ggccgaaatc gagcctgccc ctcatctgtc aacgccgcgc 4380
 cgggtgagtc ggccccctca gtgtcaacgt ccgccccctca tctgtcagtg agggccaagt 4440
 tttccgcgag gtatccacaa cgccggcggc cgcggtgtct cgcacacggc ttcgacggcg 4500
 tttctggcgc gtttgcaggg ccatagacgg ccgccagccc agcggcgagg gcaaccagcc 4560
 cggtgagcgt cggaaagggt cgacggatct tttccgctgc ataaccctgc ttcgggggtca 4620
 ttatagcgat tttttcggta tatccatcct ttttcgcacg atatacagga ttttgccaaa 4680
 gggttcgtgt agactttcct tgggtatcc aacggcgta gccgggcagg ataggtgaag 4740
 tagggccacc cgcgagcggg tgttccttct tctactgtccc ttattcgcac ctggcgggtgc 4800
 tcaacgggaa tcctgctctg cgaggctggc cggctaccgc cggcgtaaca gatgagggca 4860
 agcggatggc tgatgaaacc aagccaacca ggaagggcag cccacctatc aaggtgtact 4920
 gccttccaga cgaacgaaga gcgattgagg aaaaggcggc ggcggccggc atgagcctgt 4980
 cggcctacct gctggccgtc ggccagggtt acaaaatcac gggcgctcgtg gactatgagc 5040
 acgtccgcga gctggcccgc atcaatggcg acctgggccg cctgggcggc ctgctgaaac 5100
 tctggctcac cgacgaccg cgacggcgc ggttcgggtga tgccacgac ctcgccctgc 5160
 tggcgaagat cgaagagaag caggacgagc ttggcaagg catgatgggc gtggtccgcc 5220
 cgagggcaga gccatgactt ttttagccgc taaaacggcc ggggggtgcy cgtgattgcc 5280
 aagcacgtcc ccatgcgctc catcaagaag agcgacttcg cggagctggt attcgtgacg 5340
 ggcaagattc ggaataccaa gtacgagaag gacggccaga cggcttacgg gaccgacttc 5400
 attgccgata aggtggatta tctggacacc aaggcaccag gcgggtcaaa tcaggaataa 5460
 gggcacattg ccccgcgctg agtcggggca atcccgaag gagggtgaat gaatcggagc 5520
 tttgaccgga aggcatacag gcaagaactg atcgacgcgg ggttttccgc cgaggatgcc 5580
 gaaaccatcg caagccgcac cgtcatgctg gcgccccgcg aaaccttcca gtccgtcggc 5640
 tcgatggtc agcaagctac ggccaagatc gagcgcgaca gcgtgcaact ggctccccct 5700
 gccctgcccg cgccatcggc cgccgtggag cgttcgcgctc gtctcgaaca ggagggcgca 5760

ES 2 568 803 T3

ggtttggcga agtcgatgac catcgacacg cgaggaacta tgacgaccaa gaagcgaaaa 5820
 accgccggcg aggacctggc aaaacaggtc agcgaggcca agcaggccgc gttgctgaaa 5880
 cacacgaagc agcagatcaa ggaaatgcag ctttccttgt tcgatattgc gccgtggccg 5940
 gacacgatgc gagcgatgcc aaacgacacg gcccgcctctg cctgtttcac cacgcgcaac 6000
 aagaaaatcc cgcgcgaggc gctgcaaaac aaggtcattt tccacgtcaa caaggacgtg 6060
 aagatcacct acaccggcgt cgagctgcgg gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag 6120
 gtgttgagat acgcaagcg caccctatc ggcgagccga tcaccttcac gttctacgag 6180
 ctttgccagg acctgggctg gtcgatcaat ggccgttatt acacgaaggc cgaggaatgc 6240
 ctgtcgcgcc tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg accgcgttgg gcacctggaa 6300
 tcggtgtcgc tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg gcaagaaaac gtcccgttgc 6360
 caggtcctga tcgacgagga aatcgtcgtg ctgtttgctg gcgaccacta cacgaaattc 6420
 atatgggaga agtaccgcaa gctgtcgccg acggcccgcg ggatgttcga ctatttcagc 6480
 tcgcaccggg agccgtaccc gctcaagctg gaaaccttcc gcctcatgtg cggatcggat 6540
 tccaccgcg tgaagaagtg gcgcgagcag gtcggcgaag cctgcgaaga gttgcgaggc 6600
 agcggccttg tggaacacgc ctgggtcaat gatgacctgg tgattgcaa acgctagggc 6660
 cttgtggggg cagttccggc tgggggttca gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa 6720
 caagcgggca ctgctcgacg cacttgcttc gctcagtatc gctcgggacg cacggcgcgc 6780
 tctacgaact gccgataaac agaggattaa aattgacaat tgtgattaag gctcagattc 6840
 gacggccttg agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga 6900
 aagctccaga gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt 6960
 tcgctgaacg gttgcgagat gccgtggcat tcggcgccta catcgacggc gagatcattg 7020
 ggctgtcggg cttcaaacag gaggacggcc ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg 7080
 gcgttttctg ggagcccga cagcgaggcc gaggggtcgc cggtatgctg ctgcgggctg 7140
 tgccggcggg tttattgctc gtgatgatcg tccgacagat tccaacggga atctggtgga 7200
 tgcgatctt catcctcggc gacttaata tttcgtatt ctggagcttg ttgtttattt 7260
 cggctaccg cctgccggc ggggtcgcgg cgacggtagg cgctgtgcag ccgctgatgg 7320
 tcgtgttcat ctctgccgct ctgctaggta gcccgatacg attgatggcg gtcctggggg 7380
 ctatttgcg aactgcgggc gtggcgtgt tgggtgtgac accaaacgca gcgctagatc 7440
 ctgtcggcgt cgcagcgggc ctggcggggg cggtttccat ggcgttcgga accgtgctga 7500
 cccgcaagtg gcaacctccc gtgcctctgc tcaccttac cgctggcaa ctggcggccg 7560
 gaggacttct gctcgttcca gtagctttag tgtttgatcc gccaatccc atgcctacag 7620
 gaaccaatgt tctcggcctg gcgtggctcg gcctgatcgg agcgggttta acctacttcc 7680
 tttggttccg ggggatctcg cgactcgaac ctacagttgt ttccttactg ggctttctca 7740
 gccccgagc gcttagtggg aattgtacc cttatcgaa ccgggagcac aggatgacgc 7800

ES 2 568 803 T3

ctaacaattc attcaagccg acaccgcttc gcggcgccgc ttaattcagg agttaaacat 7860
 catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgatcat 7920
 cgagcgccat ctggaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg cagtggatgg 7980
 cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga 8040
 aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc ctggagagag 8100
 cgagattctc cgcgctgtag aagtcacatc tgttggtcac gacgacatca ttccgtggcg 8160
 ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttgg agaatggcag cgcaatgaca ttcttgacag 8220
 tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa aagcaagaga 8280
 acatagcggt gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc tttgatccgg ttcctgaaca 8340
 ggatctatct gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgccgc ccgactgggc 8400
 tggcgatgag cgaaatgtag tgcttacggt gtcccgcatt tggctacagc cagtaaccgg 8460
 caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc cggcccagta 8520
 tcagcccgtc atacttgaag ctaggcaggc ttatcttggg caagaagatc gcttggcctc 8580
 gcgcgagat cagttggaag aatttgttca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt 8640
 cggcaataa tgtctaaca ttcgttcaag ccgacgccgc ttcgcccgcg ggcttaactc 8700
 aagcgttaga gagctgggga agactatgcg cgatctgttg aagggtggtc taagcctcgt 8760
 cttgcatgag catttcgatc cattcccatt ccgcgctcaa gatggcttcc cctcggcagt 8820
 tcacagggc taaatcaatc tagccgactt gtccggtgaa atgggctgca ctccaacaga 8880
 aacaatcaaa caaacataca cagcgactta ttcacacgag ctcaaattac aacggtatat 8940
 atcctgccag tcagcatcat cacacaaaa gttaggcccg aatagtttga aattagaaag 9000
 ctcgcaattg aggtctacag gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctcaccgat 9060
 cctaaccggt gtgatcatgg gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttgg tctaatttag 9120
 tttggtattg agtaaaacaa attcgaacca aacaaaaata taaatatata gtttttatat 9180
 atatgccttt aagacttttt atagaatttt ctttaaaaaa tatctagaaa tatttgcgac 9240
 tcttctggca tgtaaatatt cgttaaatat gaagtgtccc atttttatta actttaaata 9300
 attggttcta cgatcacttt cttatcaagt gttactaaaa tgcgtcaatc tctttgttct 9360
 tccatattca tatgtcaaaa cctatcaaaa ttcttatata tctttttcga atttgaagtg 9420
 aaatttcgat aatttaaaat taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt 9480
 tatacttaat tactaaattt ggtaacttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa 9540
 acgactaaaa taaataaata tcatgtgta ttaagaaaat tctctataa gaatatttta 9600
 atagatcata tgtttgtaaa aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa 9660
 aatttgacaa agtaagatta aaataatatt catctaaaca aaaaaaac agaaaatgct 9720
 gaaaaccggg caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt tggtttgggt tgattttgat 9780
 ataaaccgaa ccaactcggg ccatttgcac ccctaatcat aatagcttta atatttcaag 9840

ES 2 568 803 T3

atattattaa gttaacgttg tcaatatacct ggaaatthttg caaaatgaat caagcctata 9900
tggctgtaat atgaatttaa aagcagctcg atgtggtggt aatatgtaat ttacttgatt 9960
ctaaaaaaat atcccaagta ttaataattht ctgctaggaa gaaggttagc tacgatttac 10020
agcaaagcca gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca 10080
aatatthttta aaaaaatagc caatgacttg gaacaaaaga aagtgatata thttttgttc 10140
ttaaacaagc atccccctta aagaatggca gthttccttht gcatgtaact attatgctcc 10200
cttcgttaca aaaatthttg actactattg ggaacttctt ctgaaaatag tggccaccgc 10260
ttaattaagc cgcgccatgc ccgggcaagc ggccgcacaa gthttgtacaa aaaagctgaa 10320
cgagaaacgt aaaatgatat aaatatcaat atattaaatt agatthttgca taaaaaacag 10380
actacataat actgtaaaac acaacataatc cagtcactat gaatcaacta cttagatggt 10440
attagtgacc tgtagtcgac cgacagcctt ccaaattgtt ttcgggtgat gctgccaaact 10500
tagtcgaccg acagccttcc aaatgttctt ctcaaacgga atcgtcgtat ccagcctact 10560
cgctattgtc ctcaatgccg tattaatatca taaaaagaaa taagaaaaag aggtgcgagc 10620
ctctthtttg tgtgacaaaa taaaaacatc tacctattca tatacgttag tgtcatagtc 10680
ctgaaaatca tctgcatcaa gaacaattht acaactctta tactthttct ttacaagtcg 10740
thtcggcttca tctggattht cagcctctat acttactaaa cgtgataaag thtctgtaat 10800
thtctactgta tcgacctgca gactggctgt gtataaggga gcctgacatt tatattcccc 10860
agaacatcag gttaatggcg thtttgatgt cattthtcgcg gtggctgaga tcagccactt 10920
ctthccccgat aacggagacc ggcaactgg ccataatcggg ggtcatcatg cgccagctth 10980
catccccgat atgcaccacc gggtaaagtt cacgggagac thtatctgac agcagacgtg 11040
cactggccag ggggatcacc atccgtcgc ccggcgctgtc aataatatca ctctgtacat 11100
ccacaaacag acgataacgg ctctctctth tatagggtgta aaccttaaac tgcatttcac 11160
cagccccgtg tctcgtcagc aaaagagccg thcattthcaa taaaccgggc gacctcagcc 11220
atcccttctt gatthttccg thttccagcgt tcggcacgca gacgacgggc thcattctgc 11280
atggttgctg ttaccagacc ggagatattg acatcatata tgccttgagc aactgatagc 11340
tgtcgtgctc aactgtcact gtaatacgtt gcttcatagc atacctctth ttgacatact 11400
tcgggtatac atatcagtat atattcttht accgcaaaaa tcagcgcgca aatagcata 11460
ctgttatctg gctthttagta agccgatcc acgcgcgctt tacgccccct ctgccactca 11520
tcgcagtact gttgtaattc attaagcatt ctgccgacat ggaagccatc acaaacggca 11580
tgatgaacct gaatcgccag cggcatcagc accttgctgc cttgcgtata atatthgccc 11640
atggtgaaaa cgggggcgaa gaagttgtcc atatthgcca cgtthaaatc aaaactggtg 11700
aaactcacc agggattggc tgagacgaaa aacatattct caataaacct thtagggaaa 11760
taggccaggt thtaccgta acacgccaca tcttgcgaa atatgtgtag aaactgccg 11820
aaatcgtcgt ggtattcact ccagagcgt gaaaacgtht cagthttgctc atggaaaacg 11880

ES 2 568 803 T3

gtgtaacaag ggtgaacact atcccatatc accagctcac cgtctttcat tgccatacgg 11940
aattccggat gagcattcat caggcgggca agaatgtgaa taaaggccgg ataaaacttg 12000
tgcttatttt tctttacggt ctttaaaaag gccgtaatat ccagctgaac ggtctgggta 12060
taggtacatt gagcaactga ctgaaatgcc tcaaaatggt ctttacgatg ccattgggat 12120
atatcaacgg tggtatatcc agtgattttt ttctccattt tagcttcctt agctcctgaa 12180
aatctcgata actcaaaaaa tacgcccggg agtgatctta tttcattatg gtgaaagttg 12240
gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggccca gggcttcccg 12300
gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggattt 12360
tattcggcgc aaagtgcgtc gggtgatgct gccaaacttag tcgactacag gtcactaata 12420
ccatctaagt agttgattca tagtgactgg atatgttgtg ttttacagta ttatgtagtc 12480
tgTTTTTtat gcaaaatcta atttaataata ttgatattta tatcatttta cgtttctcgt 12540
tcagctttct tgtacaaagt ggttgccggc gcttaattaa atttaaattc aattaatgca 12600
atcttgattt tcaacaacga aggtaatggc gtaaaagaaa aaatgtatgt tattgtattg 12660
atctttcatg atgttgaagc gtgccataat atgatgatgt ataattaaaa tattaactgt 12720
cgcattttat tgaaatggca ctgttatttc aaccatatct ttgattctgt tacatgacac 12780
gactgcaaga agtaaataat agacgccgtt gttaaagaat tgctatcata tgtgcctaac 12840
tagaggggat ttgagcgtca gacctaataa aatattacaa aatatctcac tctgtcgcca 12900
gcaatggtgt aatcagcgcg gacaaatggc gtaaagatcg cggaaaaacc tccccgagtg 12960
gcatgatagc tgctctgtga ttgctgattt agtcagcctt atttgactta aggggtgccct 13020
cgttagtgc aaattgcttt caaggagaca gccatgcccc acactttggt gaaaaacaaa 13080
ttgcccttgg ggagacggta aagccagttg ctcttcaata aggaatgtcg aggaggcaat 13140
gtaaccgcct ctggtagtac acttctctaa tccaaaaatc aatttgattt caagataccg 13200
caaaaaactt atggttttaa ccctgca 13227

<210> 54
<211> 10247
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Plásmido pDAB7318

<400> 54

cgcgccgacc cagctttctt gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt 60
tgttgcaacg aacaggtcac tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat 120
atcccctata gtgagtcgta ttacatggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccgtg 180
tctcaaaatc tctgatgtta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa 240
ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga gccatattca acgggaaacg 300
tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc 360

ES 2 568 803 T3

gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgcttgt atgggaagcc cgatgcgcca 420
gagttgtttc tgaacatgga caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc 480
agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact 540
cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggaa aacagcatt ccaggtatta 600
gaagaatatc ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg 660
ttgattcga ttcctgtttg taattgtcct ttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct 720
caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt 780
aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata aacttttgcc attctcaccg 840
gattcagtcg tcaactcatg tgatttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa 900
ttaataggtt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca ggatcttgcc 960
atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ccttcattac agaaacggct tttcaaaaa 1020
tatggtattg ataactctga tatgaataaa ttgcagttc atttgatgct cgatgagttt 1080
ttctaactcg aattggttaa ttggttga cactggcaga gcattacgct gacttgacgg 1140
gacggcgcaa gctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt acgcgctgct ccaactgagcg 1200
tcagacccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 1260
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 1320
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 1380
cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 1440
ctcgtcttgc taatcctgtt accagtggtt gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 1500
gggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt 1560
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 1620
gagcattgag aaagcgccac gttccccgaa gggagaaaagg cggacaggta tccggtaagc 1680
ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatcct 1740
tatagtctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgta 1800
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt 1860
tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 1920
attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag 1980
tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg 2040
ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc 2100
aacgcaatta atacgcgtac cgctagccag gaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat 2160
ccgtcaggat ggccttctgc ttagtttgat gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc 2220
gccaccctcc gggccgttgc ttcacaacgt tcaaatccgc tcccggcgga tttgtcctac 2280
tcaggagagc gttaccgac aaacaacaga taaaacgaaa ggcccagtct tccgactgag 2340
cctttcgttt tatttgatgc ctggcagttc cctactctcg cgtaaacgct agcatggatg 2400

ES 2 568 803 T3

ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtcctta agctcgggcc ccaaataatg 2460
 attttatttt gactgatagt gacctgttcg ttgcaacaaa ttgatgagca atgctttttt 2520
 ataatgcaa ctttgtacaa aaaagcaggc tccgcggccg cactagggtt aaactctaga 2580
 agctaggaat tcaaacaag aagcgatcgc gcggccgcca ttgtactccc agtatcatta 2640
 tagtgaaagt tttggctctc tcgcccgttg ttttttacct ctatttaaag gggttttcca 2700
 cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt taattttctca taatctttgg 2760
 ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat ttattatttg ttaaacattt 2820
 tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta atgtagtcta acattttcat 2880
 attgaaatat ataatttact taatttttagc gttggtagaa agcataatga tttattctta 2940
 ttcttcttca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa ttctttacct taagaaggat 3000
 ttcccatttt atattttaaa aatataattta tcaaattttt ttcaaccacg taaatctcat 3060
 aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat aattttttta ttcgactgat 3120
 cttaaagcaa caccagtgca cacaactagc catttttttc ttggaataaa aaaatccaat 3180
 tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa caatgatttg tggattttct 3240
 gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt gacactacgg aagtaactga 3300
 agatctgctt ttacatgcga gacacatctt ctaaagtaat ttaataata gttactatat 3360
 tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa aaattaatta gatataatta 3420
 aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt gtgactattg atttattatt 3480
 ctactatggt taaattgttt tatagatagt ttaaagtaaa tataagtaat gtagtagagt 3540
 gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg gtggactaat tttcatatat 3600
 ttcttattgc ttttaccttt tcttggtagt taagtccgta actggaatta ctgtgggttg 3660
 ccatgacact ctgtggcttt ttggttcatg catggatgct tgcgcaagaa aaagacaaaag 3720
 aacaagaaa aaagacaaaa cagagagaca aaacgcaatc acacaacca ctcaaattag 3780
 tcaactggctg atcaagatcg ccgctccat gtatgtctaa atgccatgca aagcaacacg 3840
 tgcttaacat gcactttaa tggctcacc atctcaacc acacacaaac acattgcctt 3900
 tttcttcatc atcaccacaa ccacctgtat atattcattc tcttccgcca cctcaatttc 3960
 ttcacttcaa cacacgtcaa cctgcatatg cgtgtcatcc catgcccaaa tctccatgca 4020
 tgttccaacc accttctctc ttatataata cctataaata cctctaatat cactcacttc 4080
 tttcatcatc catccatcca gagtactact actctactac tataataacc caaccaact 4140
 catattcaat actactctag gatccaacaa tgtctgtctc aaccgctgac atcagggcta 4200
 gggctccaga ggctaagaag gttcacatcg ctgataccgc tatcaacagg cacaattggt 4260
 acaagcacgt gaactggctc aacgtcttcc tcatcatcgg aatcccactc tacggatgca 4320
 tccaagcttt ctgggttcca cttcaactca agaccgctat ctgggctgtg atctactact 4380
 tcttcaccgg acttggaatc accgctggat accacaggct ttgggctcac tgctcact 4440

ES 2 568 803 T3

ctgctactct tccacttagg atctggcttg ctgctggttg aggaggagct gttgaggat 4500
 ctatcagatg gtgggctagg gatcacagg ctcacatag gtacaccgat accgacaagg 4560
 acccatactc tgtttaggaag ggacttctct actctcacct tggatggatg gtgatgaagc 4620
 agaacccaaa gaggatcggg aggaccgaca tctctgatct caacgaggac ccagttggtg 4680
 tttggcaaca caggaactac ctcaagggtg tgttcacctat gggacttgct gttccaatgc 4740
 ttgttgctgg acttggatgg ggagattggc ttggaggatt cgtgtacgct ggaatcctta 4800
 ggatcttctt cgttcaacaa gctaccttct gcgtgaactc tcttgctcac tggcttgagg 4860
 atcaaccatt cgatgatagg aactctccta gggatcacgt gatcaccgct cttggttacc 4920
 ttggagaggg ataccacaac ttcaccacg agttcccatc tgactacagg aacgctatcg 4980
 agtggcacca gtacgatcct accaagtggc ctatctgggc ttggaagcaa cttggattgg 5040
 cttacgatct caagaagttc agggctaacg agatcgagaa ggaagggtt caacaacttc 5100
 agaagaagct tgataggaag agggctactc ttgattgggg aaccctactt gatcaacttc 5160
 cagtgatgga atgggatgac tacgttgagc aagctaagaa cggaaagggg cttggttgcta 5220
 tcgctggagt tgttcacgat gttaccgact tcatcaagga tcaccagga ggaaggcta 5280
 tgatctcttc tggaatcggg aaggatgcta ccgctatggt caacggagga gtgtactacc 5340
 actctaacgc agctcacaac cttcttagca ccatgagggg gggagtgatc aggggaggat 5400
 gcgaggttga gatctggaag agggctcaga aggagaacgt tgagtacgtt agggatggat 5460
 ctggacaaag ggtgatcagg gctggagagc aaccaaccaa gatcccagag ccaatcccaa 5520
 ccgctgatgc tgcttgagta gttagcttaa tcacctaggt caccagtatg aactaaaatg 5580
 catgtagggt taagagctca tggagagcat ggaatattgt atccgacct gtaacagtat 5640
 aataactgag ctccatctca cttcttctat gaataaaca aggatggtat gatataataa 5700
 cactctatct atgcacctta ttgttctatg ataaatttcc tcttattatt ataaatcatc 5760
 tgaatcgtga cggcttatgg aatgcttcaa atagtacaaa acaaatgtg tactataaga 5820
 ctttctaaac aattctaact ttagcattgt gaacgagaca taagtgttaa gaagacataa 5880
 caattataat ggaagaagtt tgtctccatt tatatattat atattacca cttatgtatt 5940
 atattaggat gttaaggaga cataacaatt ataaagagag aagtttgtat ccatttatat 6000
 attatatact acccatttat atattatact tatccactta tttaatgtct ttataagggt 6060
 tgatccatga tatttctaata attttagttg atatgtatat gaaaaggtag tatttgaact 6120
 ctcttactct gtataaagggt tggatcatcc ttaaagtggg tctatttaat tttattgctt 6180
 cttacagata aaaaaaaaaat tatgagttgg ttgataaaa tattgaagga tttaaaataa 6240
 taataaataa taaataacat ataatatatg tatataaatt tattataata taacatttat 6300
 ctataaaaaa gtaaatattg tcataaatct atacaatcgt ttagccttgc tggaacgaat 6360
 ctcaattatt taaacgagag taaacatatt tgactttttg gttatttaac aaattattat 6420
 ttaacactat atgaaatttt ttttttttat cagcaaagaa taaaattaaa ttaagaagga 6480

ES 2 568 803 T3

caatgggtgtc ccaatcctta tacaaccaac ttccacaaga aagtcaagtc agagacaaca 6540
 aaaaaacaag caaaggaaat tttttaatth gagttgtcctt gtttgtgca taatttatgc 6600
 agtaaaacac tacacataac ctttttagca gtagagcaat ggttgaccgt gtgcttagct 6660
 tcttttattt tattttttta tcagcaaaga ataaataaaa taaaatgaga cacttcaggg 6720
 atgtttcaac ctttatacaa aaccccaaaa acaagtttcc tagcacccta ccaacgaatt 6780
 cgcggccgct ttcttgcatt acatcgtcct gcagagccaa gcgcatgctt aattaaacta 6840
 gtctcccagt atcattatag tgaaagtttt ggctctctcg ccggtgggtt tttacctcta 6900
 tttaaagggg ttttccacct aaaaattctg gtatcattct cactttactt gttactttaa 6960
 tttctcataa tctttggttg aaattatcac gcttccgcac acgatatccc taaaaattta 7020
 ttatttgtaa aacattttca aaccgcataa aattttatga agtcccgtct atctttaatg 7080
 tagtctaaca ttttcatatt gaaatatata attfacttaa ttttagcggt ggtagaaagc 7140
 ataatgattt attcttattc ttcttcatat aaatgtttta tatacaatat aaacaaattc 7200
 tttaccttaa gaaggatttc ccattttata ttttaaaaat atattttatca aatatttttc 7260
 aaccacgtaa atctcataat aataagttgt ttcaaaaagta ataaaattta actccataat 7320
 tttttatttc gactgatcct aaagcaacac ccagtgacac aactagccat ttttttcttt 7380
 gaataaaaaa atccaattat cattgtattt tttttataca atgaaaattt caccaaaca 7440
 tgatttggtg tatttctgaa gcaagtcatt ttatgcaaaa ttctataatt cccatttgac 7500
 actacggaag taactgaaga tctgctttta catgagagac acatcttcta aagtaatttt 7560
 aataatagtt actatattca agatttcata tatcaaatc tcaatattac ttctaaaaa 7620
 ttaattagat ataattaa tttactttt ttaattttta gtttaattgt tgaatttggtg 7680
 actattgatt tattattcta ctatgtttta attgttttat agatagttta aagtaaatat 7740
 aagtaatgta gtagagtggt agagtgttac cctaaaccat aaactataag atttatgggtg 7800
 gactaatttt catatatttc ttattgcttt taccttttct tggatgtaa gtccgtaact 7860
 ggaattactg tgggttgcca tgacactctg tggctttttg gttcatgcat ggatcttgcg 7920
 caagaaaaag acaagaaca aagaaaaag acaaaacaga gagacaaaac gcaatcacac 7980
 aaccaactca aattagtcac tggctgatca agatcgcgc gcctatgtat gtctaaatgc 8040
 catgcaaaagc aacacgtgct taacatgcac tttaaatggc tcacccatct caaccacac 8100
 acaaacacat tgcctttttc ttcatcatca ccacaaccac ctgtatata tcatctctt 8160
 ccgccacctc aatttcttca cttcaacaca cgtcaacctg catatgcgtg tcatcccatg 8220
 cccaaatctc catgcatggt ccaaccacct tctctcttat ataataccta taaatacttc 8280
 taatatact cacttctttc atcatccatc catccagagt actactact tactactata 8340
 atacccaac ccaactcata ttcaatacta ctctaggtac cctgcagga tccaacaatg 8400
 gctgcacttg atagatccc tgaggacaaa gcaactagct ccaagtcaac ccacatacag 8460
 taccaagagg tcacgtttag gaactggtac aagaaaatca actggctcaa cacgaccctt 8520

ES 2 568 803 T3

gttgtcctca ttctgtctt tgggttgtag ttgacgagaa ccacacctct caccagacct 8580
accctcattt ggtctgttct ctactatttc tgtacagcgt ttggcatcac tggaggctac 8640
cacagacttt ggtcccatag gtcttacagt gcgagggtgc cattgagact cttcctggct 8700
ttcactggag ctggtgcat ccaaggttct gcaagatggt ggtcagccaa tcatagggca 8760
catcaccgtt ggacggacac catgaaggac ccctactctg tgatgagagg actgtgttct 8820
tcccacatag gttggatggt tctcaactct gatccaaagg tcaaaggcag aacagatggt 8880
tctgatcttg actctgatcc cgctgttggtg tggcaacaca aacactatgg caagtgtttg 8940
ctctttgccg cttggatctt tccgatgata gtggctgggc tgggttgggg agattggtgg 9000
ggtggacttg tctatgctgg catcatacgt gcctgctttg ttcagcaagc cactttctgt 9060
gtcaactcat tggcacattg gataggtgaa caaccgtttg atgacagacg tactccaagg 9120
gatcatgttc tgactgctgt ggtcacaatg ggagaaggat accacaactt ccaccatgag 9180
tttccgagtg actacagaaa tgccatcatt tggatcagt atgaccctac aaagtggctc 9240
atctatctct tcagcttggg tcccttccca ttggcctact ctctcaagac cttccgttcc 9300
aatgagattg agaaaggaag gcttcagcaa cagcaaaagg ctcttgacaa gaaaagaagt 9360
ggtcttgatt ggggacttcc tctcttccag cttccagtga tctcatggga tgactttcaa 9420
gctcgttgca aagaaagtgg agagatgctt gttgctgttg ctggagtgat ccatgatgtc 9480
tcccagtta ttgaagatca tcttgggtgg aggagcctca ttagaagtgc tgttgggaaa 9540
gatgggactg gcatgttcaa tgggtggagtg tatgaacatt caaacgccgc acacaacttg 9600
ctgagcacia tgagagttgg agtcttgaga ggtggacaag aagtggaggt ttggaagaaa 9660
cagaggggtg atgttcttgg gaagtcagac attcttcgtc aagtgacaag ggtggagcgt 9720
ctggtggaag gagctgttgc agcgtgatga gtagttagct taatcaccta gagctcggtc 9780
acctcgagta tcaaaatcta tttagaaata cacaatattt tgttgaggc ttgctggaga 9840
atcgatctgc tatcataaaa attacaaaaa aattttattt gcctcaatta ttttaggatt 9900
ggtattaagg acgcttaaat tatttgtcgg gtactacgc atcattgtga ttgagaagat 9960
cagcgatagc aaatattcgt agtactatcg ataatttatt tgaaaattca taagaaaagc 10020
aaacgttaca tgaattgatg aaacaatata aagacagata aagccacgca catttaggat 10080
attggccgag attactgaat attgagtaag atcacggaat ttctgacagg agcatgtctt 10140
caattcagcc caaatggcag ttgaaatact caaacgcccc catatgcagg agcggatcat 10200
tcattgtttg tttggttggc tttgccaaca tgggagtcca aggttgg 10247

<210> 55
<211> 6058
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Plásmido pDAB7320

10

<400> 55

ES 2 568 803 T3

aattcgcggc cgctttcctg catgacatcg tcctgcagag ccaagcgcac gcttaattaa 60
actagtctcc cagtatcatt atagtgaag ttttggctct ctcgccggtg gttttttacc 120
tctatntaaa ggggttttcc acctaaaaat tctggatca ttctcacttt acttggtact 180
ttaatttctc ataatccttg gttgaaatta tcacgcttcc gcacacgata tccctacaaa 240
tttattatnt gttaaacatt ttcaaaccgc ataaaatntt atgaagtccc gtctatctnt 300
aatgtagtct aacattntca tattgaaata tataatntac ttaatnttag cgttggtaga 360
aagcataatg atntatctt attcttctt atataaatgt ttaatataca atataaaca 420
attctntacc ttaagaagga tttcccattt tatatntta aaatatatnt atcaaatatt 480
tttcaaccac gtaaatctca taataataag ttgnttcaaa agtaataaaa tntaactcca 540
taatntntt attcgaactga tcttaaagca acaccagtg acacaactag ccattntntt 600
ctntgaataa aaaaatccaa ttatcattgt atntntntta tacaatgaaa atntcaccia 660
acaatgattt gtggtatntc tgaagcaagt catgntatgc aaaatntat aatntccatt 720
tgacactacg gaagtaactg aagatctgct tttacatgcg agacacatct tctaaagtaa 780
ttntaataat agntactata ttcaagattt catatatcaa atactcaata ntactntca 840
aaaatntaatt agatataatt aaaaatntac tntntntaatt ttaagntta ttgntgaatt 900
tgtgaactat gattntatnt tctactatgt ttaaattgnt ntatagatag ntntaaagtaa 960
atataagtaa tgtagtagag tgttagagtg ttaccntaa ccntaaacta taagattnt 1020
ggtggactaa tntntatata tntctnttg cntntacntt ntcttggtat gtaagtccgt 1080
aactggaatt actgtgggtt gccatgacac tctgtggtct tntgntcat gcatggatct 1140
tgcgcaagaa aaagacaaag aacaagaaa aaagacaaaa cagagagaca aaacgcaatc 1200
acacaacca ctcaaattag tcaactggctg atcaagatcg ccgctccat gtagtctaa 1260
atgccatgca aagcaacacg tgcttaacat gcactntaa tggctcacc atctcaacc 1320
acacacaaac acatntcctt tntctntac atcaccacaa ccactgnt atatntcattc 1380
tctntcgcca cctcaatnt tntactntca cacacgntaa cctgcatatg cgtgntcatc 1440
catgccccaa tctcatgca tntntcaacc acctntctc ntatataata cctataaata 1500
cctntaatat cactcactc tntcatcact catccatcca gagtactact actntactac 1560
tataataccc caaccact catatntcaat actactctag gtaccctgca gggatccaac 1620
aatggctgca cttgatagca tccctgagga caaagcaact agctccaagt caaccacat 1680
acagtaccaa gaggtcacgt ttaggaactg gtacaagaaa atcaactggc tcaacacgac 1740
cctntgtgct ctcattcctg ctctgggtt gtacttgacg agaaccacac ctctcaccag 1800
acctaccctc atntggtctg ntctntacta tntctgtaca gcntntgca tcaactggtg 1860
ctaccacaga cntntggtccc ataggtctta cagtgcgagg tntccattga gactntctc 1920
ggctntcact ggagctggtg cgatccaag tntctgcaaga tgggtgctag ccaatcatag 1980
ggcacatcac cgttggaacg acaccatgaa ggaccctac tctgntatga gaggactgct 2040

ES 2 568 803 T3

gttctccac ataggttgga tggttctcaa ctctgatcca aagggtcaaag gcagaacaga 2100
 tgtttctgat cttgactctg atccccgtcg tgtgtggcaa cacaaacct atggcaagtg 2160
 tttgtcttt gccgcttga tctttccgat gatagtggct gggctgggtt ggggagattg 2220
 gtggggtgga cttgtctatg ctggcatcat acgtgcctgc tttgttcagc aagccacttt 2280
 ctgtgtcaac tcattggcac attggatagg tgaacaaccg tttgatgaca gacgtactcc 2340
 aagggatcat gttctgactg cgttggcac aatgggagaa ggataccaca acttccacca 2400
 tgagtttccg agtgactaca gaaatgccat catttggat cagtatgacc ctacaaagtg 2460
 gctcatctat ctcttcagct tgggtccctt cccattggcc tactctctca agacctccg 2520
 ttccaatgag attgagaaag gaaggcttca gcaacagcaa aaggctcttg acaagaaaag 2580
 aagtggctctt gattggggac ttctctctt ccagcttcca gtgatctcat gggatgactt 2640
 tcaagctcgt tgcaaagaaa gtggagagat gcttgttgct gttgctggag tgatccatga 2700
 tgtctccag ttcatgaa atcatcctgg tgggaggagc ctcatagaa gtgctgttgg 2760
 gaaagatggg actggcatgt tcaatggtg agtgtatgaa cattcaaacg ccgcacacaa 2820
 cttgctgagc acaatgagag ttggagtctt gagaggtgga caagaagtgg aggtttgaa 2880
 gaaacagagg gtggatgtt ttgggaagtc agacattctt cgtcaagtga caagggtgga 2940
 gcgtctggtg gaaggagctg ttgcagcgtg atgagtagtt agcttaatca cctagagctc 3000
 ggtcacctcg agtatcaaaa tctatttga aatacaaat attttgttgc aggcttgctg 3060
 gagaatcgat ctgctatcat aaaaattaca aaaaaatttt atttgctca attattttag 3120
 gattggatt aaggacgctt aaattatttgc tgggctact acgcatcatt gtgattgaga 3180
 agatcagcga tacgaaatat tcgtagtact atcgataatt tatttgaaaa ttcataagaa 3240
 aagcaaactg tacatgaatt gatgaaacaa tacaagaca gataaagcca cgcacattta 3300
 ggatattggc cgagattact gaatattgag taagatcacg gaatttctga caggagcatg 3360
 tcttcaattc agcccaaatg gcagttgaaa tactcaaacc gccccatag caggagcggg 3420
 tcattcattg tttgtttggt tgcctttgcc aacatgggag tccaagggtg gcgcgccgac 3480
 ccagctttct tgtacaaagt tggcattata agaaagcatt gcttatcaat ttgttgcaac 3540
 gaacagggtca ctatcagtca aaataaaatc attatttggc atccagctga tatcccctat 3600
 agtgagtcgt attacatggt catagctggt tcctggcagc tctggcccgt gtctcaaaat 3660
 ctctgatggt acattgcaca agataaaaat atatcatcat gaacaataaa actgtctgct 3720
 tacataaaca gtaatacaag ggggtgttat agccatattc aacgggaaac gtcgaggccg 3780
 cgattaaatt ccaacatgga tgctgattta tatgggtata aatgggctcg cgataatgct 3840
 gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgcttg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt 3900
 ctgaaacatg gcaaggttag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaac 3960
 tggctgacgg aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat 4020
 gcatggttac tcaccactgc gatccccgga aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat 4080

ES 2 568 803 T3

cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtgt tcctgcgccg gttgcattcg 4140
 attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc tcagggcгаа 4200
 tcacgaatga ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg taatggctgg 4260
 cctgttgaac aagtctggaa agaaatgcat aaacttttgc cattctcacc ggattcagtc 4320
 gtcactcatg gtgattttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa attaataggt 4380
 tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc catcctatgg 4440
 aactgcctcg gtgagttttc tccttcatta cagaaacggc tttttcaaaa atatggtatt 4500
 gataatcctg atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt tttctaataca 4560
 gaattggtta attggttgta aactggcag agcattacgc tgacttgacg ggacggcgca 4620
 agctcatgac caaaatccct taacgtgagt tacgcgtcgt tccactgagc gtcagacccc 4680
 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttgc tgcgcgtaat ctgctgcttg 4740
 caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 4800
 ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 4860
 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgccttg 4920
 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac 4980
 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca 5040
 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga 5100
 gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 5160
 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 5220
 gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg 5280
 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggg tcctggcctt ttgctggcct 5340
 tttgctcaca tgttcttttc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc 5400
 tttgagttag ctgataaccg tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc 5460
 gaggaagcgg aagagcgcgc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat 5520
 taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt 5580
 aatacgcgta ccgctagcca ggaagagttt gtagaaacgc aaaaaggcca tccgtcagga 5640
 tggccttctg cttagtttga tgcctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc 5700
 cgggcccgtt cttcacaacg ttcaaatccg ctcccggcgg atttgccta ctcaggagag 5760
 cgttcaccga caaacaacag ataaaaacgaa agggccagtc ttccgactga gcctttcggt 5820
 ttatttgatg cctggcagtt ccctactctc gcgttaacgc tagcatggat gttttccag 5880
 tcacgacggt gtaaaacgac ggccagtctt aagctcgggc cccaaataat gattttattt 5940
 tgactgatag tgacctgttc gttgcaacaa attgatgagc aatgcttttt tataatgcca 6000
 actttgtaca aaaaagcagg ctccgcggcc gcactagggt taaactctag aagctagg 6058

<210> 56
 <211> 9956
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7323

10

<400> 56

ES 2 568 803 T3

ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccggtgg ttttttacct 60
 ctatttaaag gggttttcca cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt 120
 taatttctca taatctttgg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat 180
 ttattatttg ttaaacattt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta 240
 atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taatttttagc gttggtagaa 300
 agcataatga tttattctta ttcttcttca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa 360
 ttctttacct taagaaggat ttcccatttt atatttttaa aatataattha tcaaataattt 420
 ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaaat ttaactccat 480
 aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgta cacaactagc catttttttc 540
 tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa 600
 caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt 660
 gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcca gacacatctt ctaaagtaat 720
 ttttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa 780
 aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt 840
 gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattggtt tatagatagt ttaaagtaaa 900
 tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg 960
 gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttaccttt tcttggtatg taagtccgta 1020
 actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtctt ttggttcatg catggatctt 1080
 gcgcaagaaa aagacaaaga acaaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca 1140
 cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgcgtccatg tatgtctaaa 1200
 tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca 1260
 cacacaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct 1320
 cttccgccac ctcaatttct tcacttcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc 1380
 atgcccaaat ctccatgcat gttccaacca ctttctctct tatataatac ctataaatac 1440
 ctctaataac actcacttct ttcatcatcc atccatccag agtactacta ctctactact 1500
 ataatacccc aacccaactc atattcaata ctactctagg taccctgcag ggatccaaca 1560
 atggctccca acatttctga ggatgtcaat ggtgttcttt ttgagtcaga tgcggcaacc 1620
 cctgatttgg ctctttccac accacctgtg caaaaagctg acaacagacc caagcaactt 1680
 gtgtggagga acattttgct tttcgcttac ttgcacctcg cagctctcta cggaggctat 1740
 ttgtttctct tcagtgcaaa atggcagacc gacattttcg cttacattct ttatgtcatc 1800

ES 2 568 803 T3

tctggactgg ggataactgc tggggcacat agactctggg ctcacaagtc atacaaagcc 1860
aagtggccac tcagagttat actgggtcadc ttcaacacgg ttgcctttca agacgctgct 1920
atggattggg ctcgtgacca tagaatgcat cacaagtaca gcgagaccga cgcggacca 1980
cacaatgcaa cgagaggttt cttcttctct cacattggct ggcttcttgt taggaaacat 2040
cctgatctga aagaaaaagg gaagggactc gacatgagtg atctccttgc tgatccaata 2100
ctccgttttc agaagaagta ctatctgadc ctcatgcctc tggcctgttt tgtgatgcca 2160
accgttatcc cggtttactt ttggggagaa acttggacaa atgctttctt cgtggcagcc 2220
atgttccggt atgctttcat cctgaatggt acctgggttg tgaactctgc cgcacacaag 2280
tggggagaca aaccctatga caagtccatc aagccttccg aaaaccttcc agttgcgatg 2340
tttgctttgg gagaaggatt tcacaattac catcacactt ttccgtggga ctacaagaca 2400
gcagagcttg gaaacaacaa gttgaacttc acaacaacgt tcatcaatth ctttgcgaaa 2460
atcggttggg cctatgattt gaagactgtg agtgatgaca ttgtcaagaa cagggtaag 2520
agaactggcg atggaagcca tcatctctgg ggctgggggtg atgagaatca gagcaaagaa 2580
gagatagatg cagccattag gatcaaccct aaagacgatt gagtagttag cttaatcacc 2640
tagagctcgg tcacctcgag tatcaaaatc tatttagaaa tacacaatat tttgttgcag 2700
gcttgctgga gaatcgatct gctatcataa aaattacaaa aaaattttat ttgcctcaat 2760
tattttagga ttggtattaa ggacgcttaa attatttgtc gggtcactac gcatcattgt 2820
gattgagaag atcagcgata cgaaatattc gtagtactat cgataattta tttgaaaatt 2880
cataagaaaa gcaaacgta catgaattga tgaaacaata caaagacaga taaagccacg 2940
cacatttagg atattggccg agattactga atattgagta agatcacgga atttctgaca 3000
ggagcatgtc ttcaattcag cccaaatggc agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca 3060
ggagcggatc attcattggt tgtttggtt cctttgcca catgggagtc caaggttggc 3120
gcgccgacc agctttcttg tacaagttg gcattataag aaagcattgc ttatcaatth 3180
gttgcaacga acaggtcact atcagtcaaa ataaaatcat tatttgccat ccagctgata 3240
tcccctatag tgagtcgat tacatggtea tagctgtttc ctggcagctc tggcccgtgt 3300
ctcaaaatct ctgatgttac attgcacaag ataaaaatat atcatcatga acaataaac 3360
tgtctgctta cataaacagt aatacaagg gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt 3420
cgaggccgag attaaattcc aacatggatg ctgatttata tgggtataaa tgggctcgcg 3480
ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct atcgcttga tgggaagccc gatgcgccag 3540
agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcg ttgccaatga tgttacagat gagatggtea 3600
gactaaactg gctgacggaa tttatgcctc ttccgacat caagcattth atccgtactc 3660
ctgatgatgc atggttactc accactgca tccccgaaa aacagcattc caggtattag 3720
aagaatatcc tgattcaggt gaaaatattg ttgatgcgct ggcagtgctc ctgcgccggt 3780
tgcattcgat tcctgtttgt aattgtcctt ttaacagcga tcgcgtatth cgtctcgctc 3840

ES 2 568 803 T3

aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgagag tgattttgat gacgagcgta 3900
 atggctggcc tgttgaacaa gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca ttctcaccgg 3960
 attcagtcgt cactcatggt gatttctcac ttgataacct tatttttgac gaggggaaat 4020
 taataggttg tattgatggt ggacgagtcg gaatcgagag ccgataccag gatccttgcca 4080
 tcctatggaa ctgcctcggg gagttttctc cttcattaca gaaacggcctt tttcaaaaat 4140
 atggtattga taatcctgat atgaataaat tgcagtttca tttgatgctc gatgagtttt 4200
 tctaatacaga attggttaat tggttgtaac actggcagag cattacgctg acttgacggg 4260
 acggcgcaag ctcatgacca aaatccctta acgtgagtta cgcgtcgttc cactgagcgt 4320
 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct 4380
 gctgcttgca acaaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc 4440
 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 4500
 ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 4560
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttaccg 4620
 ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt 4680
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 4740
 agcattgaga aagcggccag cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 4800
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 4860
 atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 4920
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcccctt tttacggttc ctggcctttt 4980
 gctggccttt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 5040
 ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat 5100
 cagttagcga ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 5160
 cgattcatta atgcagctgg cagcagcagg tttccgactg gaaagcgggc agtgagcgcg 5220
 acgcaattaa tacgcgtacc gctagccagg aagagtttgt agaaacgcaa aaaggccatc 5280
 cgtcaggatg gccttctgct tagtttgatg cctggcagtt tatggcgggc gtcctgcccg 5340
 ccaccctccg ggccgttgct tcacaacggt caaatccgct cccggcggat ttgtcctact 5400
 caggagagcg ttcaccgaca aacaacagat aaaacgaaag gccagtcctt ccgactgagc 5460
 ctttcgtttt atttgatgcc tggcagttcc ctactctcgc gttaacgcta gcatggatgt 5520
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagctctaa gctcgggcc caaataatga 5580
 ttttattttg actgatagtg acctgttcgt tgcaacaaat tgatgagcaa tgctttttta 5640
 taatgccaac tttgtacaaa aaagcaggct ccgcgccgc actaggttta aactctagaa 5700
 gctaggaatt caaacaaga agcagtcgag cggccgcat tgtactcca gtatcattat 5760
 agtgaagtt ttggctctct cgcgggtggg tttttacctc ttttaaagg ggttttccac 5820
 ctaaaaattc tggatcatt ctactttac ttgttacttt aatttctcat aatccttggg 5880

ES 2 568 803 T3

tgaaattatc acgcttccgc acacgatatc cctacaaatt tattatttgt taaacatfff 5940
 caaacccgat aaaatfffat gaagtcccgt ctatctffta thtagtctaa cattffcata 6000
 ttgaaatata taatffactt aatfftagcg ttggtagaaa gcataatgat ttatffctat 6060
 tctffctcat ataaatgfff aatatacaat ataaacaaat tctffacctt aagaaggatt 6120
 tcccattffa tatfftaaaa atatafffat caaatatfff tcaaccacgt aaatctcata 6180
 ataataagtt gtttcaaaag taataaaatt taactccata atffffttat tcgactgatc 6240
 ttaaagcaac acccagtgac acaactagcc atffffttct ttgaataaaa aaatccaatt 6300
 atcattgtat tffffttata caatgaaaat ttcaccaaac aatgatttgt ggtatffctg 6360
 aagcaagtca tgffatgcaa aatffctataa tffccatttg aactacgga agtaactgaa 6420
 gatctgctff tacatgagag acacatcttc taaagtaatt ttaataatag ttactatatt 6480
 caagattfca tatatcaaat actcaatatt actffctaaaa aatffattag atataatffa 6540
 aatattactt tfftaatfff agtfftaatt gttgaatttg tgactattga tffattatfc 6600
 tactatgfff aaattgfff atagatagtt taaagtaaat ataagtaatg tagtagagtg 6660
 ttagagtgff accctaaacc ataaactata agatffatgg tggactaatt tffcatatatt 6720
 tcttattgct tffacctfff ctgggatgt aagfccgtaa ctggaattac tgtggggtgc 6780
 catgacactc tgtggctfff tggttcatgc atggatgctt gcgcaagaaa aagacaaaga 6840
 acaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca cacaccaac tcaaattagt 6900
 cactggctga tcaagatgc cgcgtccatg tatgtctaaa tggcatgcaa agcaacacgt 6960
 gcttaacatg cactfftaat ggctcaccca tctcaaccca cacacaaaca cattgcctff 7020
 tctffcatca tccaccacac cacctgtata tattcattct ctccgccac ctcaatffct 7080
 tcacttcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc atgcccfaat ctccatgcat 7140
 gttccaacca cttffctctt tatataatc ctataaatac ctctaatatc actcactff 7200
 tffcatcatc atccatccag agtactacta ctctactact ataatacccc aacccaactc 7260
 atattcaata ctactctagg atccaacaat gtctgtcca accgctgaca tcagggctag 7320
 ggctccagag gctaagaagg tffcatatgc tgataccgct atcaacaggc acaattggta 7380
 caagcacgtg aactggctca acgtctffct catcatcgg affffactct acggatgcat 7440
 ccaagctff tgggtffcac tffcaactcaa gaccgctatc tgggctgtga tctactact 7500
 ctffaccgga ctgggaatca ccgctggata ccacaggctt tgggctcact gctcactc 7560
 tgctactctt ccacttagga tctggcttgc tgctgttggg ggaggagctg ttgagggatc 7620
 tatcagatgg tgggctaggg atcacagggc tcatcatagg tacaccgata ccgacaagga 7680
 cccatactct gttaggaagg gactffctta ctctcacctt ggatggatgg tgatgaagca 7740
 gaacccaag aggatcggaa ggaccgacat ctctgatctc aacgaggacc cagttgttgt 7800
 ttggcaacac aggaactacc tcaaggttgt gttcacatg ggacttgctg tffcaatgct 7860
 tgttgctgga ctgggatggg gagattggct tggaggattc gtgtacgctg gaatccttag 7920

ES 2 568 803 T3

gatcttcttc gttcaacaag ctaccttctg cgtgaactct cttgctcact ggcttgagaga 7980
tcaaccattc gatgatagga actctcctag ggatcacgtg atcaccgctc ttgttacctt 8040
tggagagggg taccacaact tccaccacga gttcccatct gactacagga acgctatcga 8100
gtggcaccag tacgatccta ccaagtggtc tatctgggct tgaagcaac ttggattggc 8160
ttacgatctc aagaagttca gggctaacga gatcgagaag ggaaggggtc aacaacttca 8220
gaagaagcct gataggaaga gggctactct tgattgggga accccacttg atcaacttcc 8280
agtgatggaa tgggatgact acgttgagca agctaagaac ggaaggggac ttgttgctat 8340
cgctggagtt gttcacgatg ttaccgactt catcaaggat caccaggag gaaaggctat 8400
gatctcttct ggaatcggaa aggatgctac cgctatgttc aacggaggag tgtactacca 8460
ctctaacgca gctcacaacc ttcttagcac catgagggtg ggagtgatca ggggaggatg 8520
cgaggttgag atctggaaga gggctcagaa ggagaacggt gagtacgta gggatggatc 8580
tggacaaagg gtgatcaggg ctggagagca accaaccaag atcccagagc caatccaac 8640
cgctgatgct gcttgagtag ttagcttaat cacctaggtc accagtatga actaaaatgc 8700
atgtaggtgt aagagctcat ggagagcatg gaatattgta tccgaccatg taacagtata 8760
ataactgagc tccatctcac ttcttctatg aataaaciaa ggatgttatg atataatac 8820
actctatcta tgcaccttat tgttctatga taaatttctt cttattatta taaatcatct 8880
gaatcgtgac ggcttatgga atgcttcaaa tagtacaana acaaatgtgt actataagac 8940
tttctaaaca attctaactt tagcattgtg aacgagacat aagtgttaag aagacataac 9000
aattataatg gaagaagttt gtctccattt atataattata tattaccac ttatgtatta 9060
tattaggatg ttaaggagac ataacaatta taaagagaga agtttgtatc catttatata 9120
ttatatacta cccatttata tattatactt atccacttat ttaatgtctt tataaggttt 9180
gatccatgat atttctaata ttttagttga tatgtatatg aaaaggactt atttgaactc 9240
tcttactctg tataaagggt ggatcaccct taaagtgggt ctatttaatt ttattgcttc 9300
ttacagataa aaaaaaatt atgagttggg ttgataaaat attgaaggat ttaaaataat 9360
aataaataat aaataacata taatatatgt atataaattt attataatat aacatttatc 9420
tataaaaaag taaatattgt cataaatcta tacaatcgtt tagccttgct ggaacgaatc 9480
tcaattatth aaacgagagt aaacatattt gactttttgg ttatttaaca aattattatt 9540
taacactata tgaaatthtt tttttttatc agcaaagaat aaaattaaat taagaaggac 9600
aatggtgtcc caatccttat acaaccaact tccacaagaa agtcaagtca gagacaacaa 9660
aaaaacaagc aaaggaaatt ttttaatttg agttgtcttg tttgctgcat aatttatgca 9720
gtaaaacact acacataacc cttttagcag tagagcaatg gttgaccgtg tgcttagctt 9780
cttttatttt atttttttat cagcaaagaa taaataaaat aaaatgagac acttcagggg 9840
tgthttcaacc cttatacaaa acccaaaaa caagthttctt agcaccctac caacgaattc 9900
gcgcccgctt tcttgcataa catcgtcctg cagagccaag cgcattgctta attaaa 9956

<210> 57
<211> 5767
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Plásmido pDAB7325

<400> 57

ES 2 568 803 T3

aattcgcggc cgctttcctg catgacatcg tctgcagag ccaagcgcgcat gcttaattaa 60
actagtctcc cagtatcatt atagtgaag ttttggtctc ctcgccggtg gttttttacc 120
tctatttaaa ggggttttcc acctaaaaat tctggtatca ttctcacttt acttgttact 180
ttaatttctc ataatctttg gttgaaatta tcacgcttcc gcacacgata tccctacaaa 240
tttattattht gttaaacatt ttcaaaccgc ataaaattht atgaagtccc gtctatcttht 300
aatgtagtct aacattthtca tattgaaata tataatthtac ttaattthtag cgttggtaga 360
aagcataatg atthtattctt atthtcttht atataaatgt ttaatataca atataaacia 420
atthtthtacc ttaagaagga thtccatttht tataththta aatataththt atcaaatathh 480
thtcaaccac gtaaatctca taataataag thgtthtcaa agtaataaaa thtaactcca 540
taaththththt atthcgactga thtthaaagca acaccagtg acacaactag cthththththt 600
ctthgaaata aaaaatccaa thtathcttg atththththt tacaatgaaa atthcaccaa 660
acaatgathh gtggatththt tgaagcaagt catgthtgc aaaathctat aaththcttht 720
tgacactacg gaagtaactg aagatctgct thtathctgc agacathct tctaaagtaa 780
ththtaataat agthtactata thtcaagathh cataththca ataththcaata thtactthta 840
aaaathtaath agatataath aaaaaththac thththththt ttaagththaa thgttgathh 900
tgtgactathh gaththththt thtathcttg ththaaathgt thththththt ththaaagtaa 960
atataagtaa thtagthtag thgtthtagthh ththctththaa cthththththt thagaththth 1020
ggthgactha thththththt ththctththt ththththctth thctthgththt gthagthctg 1080
aactggaath actgthggthh gccathgacac thctgthgtct ththgththct gathgththct 1140
thcgcaagaa aagacaaag aacaaagaaa aagacaaaa cagagagaca aacgcaathc 1200
acacaaacia ctcaaththg thctgthgtg atcaagathc cgcgthctcat gththththth 1260
athgcatgca aagcaacacg thctthththt gaththththaa thgththctthct atthththct 1320
acacaaiaac athththctth ththctthctac atththththaa cthctthththt athththctth 1380
ththctgcca cththththt thctthththaa cthctthththaa cthgthththt cthththctth 1440
cathgththth ththctththt thththththct acththththt thththththt cththththth 1500
cctthththt cthctththt ththctthctac aththththth gaththththt actthththct 1560
ththththct caathththct aththththt actthththt gththctthg gththththct 1620
aathgthctth aacaththctg aggathththaa thgtgththct ththgaththct atgthththct 1680
cctgaththt gthctththth cthctththt gththththct gaththththct cththththct 1740

ES 2 568 803 T3

tgtgtggagg aacatthttgc ttttcgctta cttgcacctc gcagctctct acggaggcta 1800
 tttgtttctc ttcagtgcaa aatggcagac cgacatthttc gcttacattc tttatgtcat 1860
 ctctggactg gggataactg ctggggcaca tagactctgg gctcacaagt catacaaagc 1920
 caagtggcca ctcaagagta tactggatcat cttcaacacg gttgcctthtc aagacgctgc 1980
 tatggattgg gctcgtgacc atagaatgca tcacaagtac agcgagaccg acgaggaccc 2040
 acacaatgca acgagagggt tcttcttctc tcacattggc tggcttcttg ttaggaaaca 2100
 tcctgatctg aaagaaaaag ggaagggact cgacatgagt gatctccttg ctgatccaat 2160
 actccgthttt cagaagaagt actatctgat cctcatgcct ctggcctgtht ttgtgatgcc 2220
 aaccgthtacc ccggtthtact tttggggaga aacttggaaca aatgctthtct tctgtggcagc 2280
 catgttccgt tatgctthtca tcctgaatgt tacctggtht gthgaactctg ccgcacacaa 2340
 gtggggagac aaaccctatg acaagtccat caagccttcc gaaaaccttht cagthtgcgat 2400
 gthtgccttg ggagaaggat ttcacaatta ccatcacact thtccgthggg actacaagac 2460
 agcagagctt ggaacaaca agthgaactt cacaacaacg thcatcaatt tctthtgcgaa 2520
 aatcgthtgg gcctatgatt tgaagactgt gagthgatgac atthtcaaga acaggtcaa 2580
 gagaactggc gatggaagcc atcatctctg gggctggggtht gatgagaatc agagcaaaga 2640
 agagatagat gcagccatta ggatcaacc ctaaagacgat thagthagtht gctthaatcac 2700
 cttagactcg gtcacctcga gthtcaaaat ctatthtagaa atacacaata thttgthtgc 2760
 ggctthtctg agaatcgaac thctatcata aaaattacaa aaaaatttht thtgcctcaa 2820
 thattthtag atthgtatta aggacgctta aattattht gggthcacta cgcathcttg 2880
 thattgagaa gatcagcgat acgaaatatt cgtagthtacta thgataatth atthtgaat 2940
 tcataagaaa agcaaacgtht acatgaatth atgaaacaat acaaacagac ataaagccac 3000
 gcacatthtag gatattggcc gagattactg aatattgagtht aagatcacgg aatthtctgac 3060
 aggagcatht cthtcaattht gcccaaatgg cagthtgaat actcaaacgg ccccatatgc 3120
 aggagcggat cattcatht thtthtggtht gcctthtgcca acatgggagtht ccaagthtgg 3180
 cgcgcccagc cagctthtct thtacaagtht ggcattataa gaaagcatht cthtcaat 3240
 thtthtcaacg aacaggtcac thtcaagtht aataaaatca thattthtcca thcagctgat 3300
 atcccctata thgagthtgc thtcatggtht atagctgtht cctggcagct ctggcccgtg 3360
 thtcaaaatc thtgattht cathtgcacaa gataaaata thtcatcatht aacaataaaa 3420
 ctgthtctt acataaacag thatacaagg gthtthtga gccatatht acgggaaacg 3480
 thcagggccc gathtaaatc caacatggat gctgathtatht atgggtataa atgggctcgc 3540
 gataatgtht ggcaatcag thcagacaatc thtctgctgtht atgggaagcc cghatgcgcca 3600
 gagthttht thgaaacatgg caaagthtgc gthtccaatg atthtthtaca thgagatgtht 3660
 agactaaact ggctgacgga atthtthtgcct cthtccgacca thcaagcatht thtccgtht 3720
 cctgatgatht cathtthtact caccactgcg atccccggaa aaacagcatht ccagthtata 3780

ES 2 568 803 T3

gaagaatatc ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgccc tggcagtggt cctgcccgg 3840
 ttgcatcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct 3900
 caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcca gtgattttga tgacgagcgt 3960
 aatggctggc ctggtgaaca agtctggaaa gaaatgcata aacttttgcc attctcaccg 4020
 gattcagtcg tcaactcatg tgatttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa 4080
 ttaataggtt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca ggatcttgcc 4140
 atcctatgga actgcctcgg tgagttttct cttcattac agaaacggct ttttcaaaaa 4200
 tatggtattg ataactctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt 4260
 ttctaactcag aattgggttaa ttggttgtaa cactggcaga gcattacgct gacttgacgg 4320
 gacggcgcaa gctcatgacc aaaaaccctt aacgtgagtt acgcgctggt ccaactgagcg 4380
 tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 4440
 tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 4500
 ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc 4560
 cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 4620
 ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 4680
 ggggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt 4740
 tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 4800
 gagcattgag aaagcgccac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 4860
 ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 4920
 tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca 4980
 gggggcgga gcctatgaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt 5040
 tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 5100
 attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcag 5160
 tcagtgagcg aggaagcggg agagcgcca atacgcaaac cgctctccc cgcgcggttg 5220
 ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaagcggg cagtgagcgc 5280
 aacgcaatta atacgcgtac cgctagccag gaagagttg tagaaacgca aaaagccat 5340
 ccgtcaggat ggccttctgc ttagtttgat gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc 5400
 gccaccctcc gggccgttgc ttcacaacgt tcaaaccgc tcccggcggg tttgtcctac 5460
 tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga taaaacgaaa ggcccagtct tccgactgag 5520
 ctttctgtt tattttgatgc ctggcagttc cttactctcg cgtaaacgct agcatggatg 5580
 ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtctta agctcgggcc ccaataatg 5640
 attttatttt gactgatagt gacctgttcg ttgcaacaaa ttgatgagca atgctttttt 5700
 ataatgcaa ctttgtacaa aaaagcaggc tccgcgccg cactaggttt aaactctaga 5760
 agctagg 5767

<210> 58
 <211> 6109
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7327

10

<400> 58

ES 2 568 803 T3

cggtcacctc gagtatcaaa atctatttag aaatacacia tttttgttg caggcttgct 60
 ggagaatcga tctgctatca taaaaattac aaaaaaattt ttttgcctc aattatttta 120
 ggattgggat taaggacgct taaattattt gtcgggtcac tacgcatcat tgtgattgag 180
 aagatcagcg atacgaaata ttcgtagtac tatcgataat ttatttgaaa attcataaga 240
 aaagcaaacg ttacatgaat tgatgaaaca atacaaagac agataaagcc acgcacattt 300
 aggatattgg ccgagattac tgaatattga gtaagatcac ggaatttctg acaggagcat 360
 gtcttcaatt cagcccaaat ggcagttgaa atactcaaac cgccccatat gcaggagcgg 420
 atcattcatt gtttgtttgg ttgcctttgc caacatggga gtccaagggtt ggcgcgccga 480
 cccagctttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat tgcttatcaa tttgttgcaa 540
 cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttgc catccagctg atatccccta 600
 tagtgagtcg tattacatgg tcatagctgt ttctggcag ctctggcccg tgtctcaaaa 660
 tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa tatatcatca tgaacaataa aactgtctgc 720
 ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat gagccatatt caacgggaaa cgtcgaggcc 780
 gcgattaaat tccaacatgg atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt 840
 cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt 900
 tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgcaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa 960
 ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga 1020
 tgcattggtta ctccacctg cgatccccgg aaaaacagca ttccaggtat tagaagaata 1080
 tcctgattca ggtgaaaata ttggtgatgc gctggcagtg ttctgcgcc ggttgcattc 1140
 gattcctggt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctccaggcga 1200
 atcacgaatg aataacgggt tgggtgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg 1260
 gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt 1320
 cgctactcat ggtgatttct cacttgataa cttattttt gacgagggga aattaatagg 1380
 ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccacccatg 1440
 gaactgcctc ggtgagtttt ctcttcatt acagaaacgg ctttttcaa aatatggtat 1500
 tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaate 1560
 agaattggtt aattggttgt aacactggca gagcattacg ctgacttgac gggacggcgc 1620
 aagctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttacgcgctg ttccactgag cgtcagaccc 1680
 cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt 1740

ES 2 568 803 T3

gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac 1800
tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt 1860
gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgctacat acctcgctct 1920
gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggg 1980
ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac 2040
acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg 2100
agaaagcgcc acgcttcccg aaggggaaaa ggccggacagg tatccggtaa gcggcagggg 2160
cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc 2220
tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc 2280
gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc 2340
ttttgctcac atgttctttc ctgctttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc 2400
ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag 2460
cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca 2520
ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat 2580
taatacgcgt accgctagcc aggaagagtt tgtagaaacg caaaaaggcc atccgtcagg 2640
atggccttct gcttagtttg atgcctggca gtttatggcg ggcgtcctgc ccgccaccct 2700
ccgggccggt gcttcacaac gttcaaatcc gctcccggcg gatttgcct actcaggaga 2760
gcgttcaccg acaaacaca gataaaacga aaggcccagt cttccgactg agcctttcgt 2820
tttatttgat gcctggcagt tccctactct cgcgttaacg ctagcatgga tgttttcca 2880
gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtct taagctcggg ccccaaataa tgattttatt 2940
ttgactgata gtgacctggt cgttgcaaca aattgatgag caatgctttt ttataatgcc 3000
aactttgtac aaaaaagcag gctccgcggc cgcactaggt ttaaaactta gaagctagga 3060
attcgcggcc gctttcttgc atgacatcgt cctgcagagc caagcgcagc cttaattaaa 3120
ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccgggtg ttttttacct 3180
ctatttaaag gggttttcca ctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt 3240
taatttctca taatctttgg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat 3300
ttattatttg ttaaactttt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta 3360
atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taatttttagc gttggtagaa 3420
agcataatga tttattctta ttcttttca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa 3480
ttctttacct taagaaggat ttccattttt atattttaaa aatataattta tcaaataattt 3540
ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat 3600
aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa cacccagtga cacaactagc catttttttc 3660
tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta tttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa 3720
caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt 3780

ES 2 568 803 T3

gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcca gacacatctt ctaaagtaat 3840
ttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa 3900
aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt 3960
gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattgitt tatagatagt ttaaagtaaa 4020
tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg 4080
gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttaccttt tcttggtagt taagtcgta 4140
actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtcct ttggttcatg catggatcct 4200
gcgcaagaaa aagacaaaaga acaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca 4260
cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgcgtccatg tatgtctaaa 4320
tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca 4380
cacacaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct 4440
cttccgccac ctcaatttct tcaactcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc 4500
atgcccaaat ctccatgcat gttccaacca ccttctctct tatataatac ctataaatac 4560
ctctaatac actcacttct ttcatcatcc atccatccag agtactacta ctctactact 4620
ataatacccc aacccaactc atattcaata ctactctagg tacctgcag ggatccaaca 4680
atgtctgctc caaccgctga catcagggct agggctccag aggctaagaa ggttcacatc 4740
gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc 4800
ctcatcatcg gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc 4860
aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggat caccgctgga 4920
taccacaggc tttgggctca ctgctcatac tctgctactc ttccacttag gatctggctt 4980
gctgctggtg gaggaggagc tgttgagggg tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 5040
gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctgttaggaa gggacttctc 5100
tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac 5160
atctctgatc tcaacgagga cccagttggt gtttggcaac acaggaacta cctcaagggt 5220
gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttctg gacttggatg gggagattgg 5280
cttggaggat tcgtgtacgc tggaaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctaccttc 5340
tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttggg gatcaaccat tcgatgatag gaactctcct 5400
agggatcacg tgatcaccgc tcttgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 5460
gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg 5520
tctatctggg cttggaagca acttggattg gcttacgatc tcaagaagtt cagggctaac 5580
gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact 5640
cttgattggg gaaccccact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag 5700
caagctaaga acggaagggg acttgttgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac 5760
ttcatcaagg atcaccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct 5820
accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacy cagctcacia ctttcttagc 5880
accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggttg agatctggaa gagggctcag 5940
aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag 6000
caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttgagt agttagctta 6060
atcacctagg tcaccagtat gaactaaaat gcatgtaggt gtaagagct 6109

ES 2 568 803 T3

<211> 6136
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Plásmido pDAB7329

<400> 59

cggtcacctc	gagtatcaaa	atctatntag	aaatacacia	tattttgttg	caggcttgct	60
ggagaatcga	tctgctatca	taaaaattac	aaaaaaattt	tatttgcctc	aattatttta	120
ggattgggat	taaggacgct	taaattattt	gtcgggtcac	tacgcatcat	tgtgattgag	180
aagatcagcg	atacgaata	ttcgtagtag	tatcgataat	ttatttgaaa	attcataaga	240
aaagcaaacy	ttacatgaat	tgatgaaaca	atacaaagac	agataaagcc	acgcacattt	300
aggatattgg	ccgagattac	tgaatattga	gtaagatcac	ggaatttctg	acaggagcat	360
gtcttcaatt	cagcccaaat	ggcagttgaa	atactcaaac	cgccccatat	gcaggagcgg	420
atcattcatt	gtttgtttgg	ttgcctttgc	caacatggga	gtccaagggt	ggcgcgccga	480
cccagctttc	ttgtacaaag	ttggcattat	aagaaagcat	tgcttatcaa	tttgttgcaa	540
cgaacaggtc	actatcagtc	aaaataaaat	cattatttgc	catccagctg	atatccccta	600
tagtgagtcg	tattacatgg	tcatagctgt	ttcctggcag	ctctggcccg	tgtctcaaaa	660
tctctgatgt	tacattgcac	aagataaaaa	tatatcatca	tgaacaataa	aactgtctgc	720
ttacataaac	agtaatacaa	ggggtgttat	gagccatatt	caacgggaaa	cgtcgaggcc	780
gcgattaaat	tccaacatgg	atgctgattt	atatgggtat	aatgggctc	gcgataatgt	840
cgggcaatca	ggtgcgacaa	tctatcgctt	gtatgggaag	cccgatgcgc	cagagttggt	900
tctgaaacat	ggcaaaggta	gcgttgcca	tgatgttaca	gatgagatgg	tcagactaaa	960
ctggctgacg	gaatttatgc	ctcttccgac	catcaagcat	tttatccgta	ctcctgatga	1020
tgcatgggta	ctcaccactg	cgatccccgg	aaaaacagca	ttccaggtat	tagaagaata	1080
tcctgattca	ggtgaaaata	ttgttgatgc	gctggcagtg	ttcctgcgcc	ggttgcatte	1140
gattcctggt	tgtaattgtc	cttttaacag	cgatcgcgta	tttcgtctcg	ctcaggcgca	1200
atcacgaatg	aataacgggt	tggttgatgc	gagtgatttt	gatgacgagc	gtaatggctg	1260
gcctgttgaa	caagtctgga	aagaaatgca	taaacttttg	ccattctcac	cggattcagt	1320
cgctactcat	ggtgatttct	cacttgataa	ccttattttt	gacgagggga	aattaatagg	1380
10 ttgtattgat	gttggacgag	tcggaatcgc	agaccgatac	caggatcttg	ccatcctatg	1440

ES 2 568 803 T3

gaactgcctc ggtgagtttt ctccttcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatatggtat 1500
 tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaate 1560
 agaattggtt aattggttgt aacactggca gagcattacg ctgacttgac gggacggcgc 1620
 aagctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttacgcgtcg ttccactgag cgtcagaccc 1680
 cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgctgctaa tctgctgctt 1740
 gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac 1800
 tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaataactg tccttctagt 1860
 gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct 1920
 gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttga 1980
 ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgcga gcggctcggc tgaacggggg gttcgtgcac 2040
 acagcccagc ttggagcga cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg 2100
 agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg 2160
 cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc 2220
 tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc 2280
 gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc 2340
 ttttgctcac atgttctttc ctgctttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc 2400
 ctttgagtga gctgataccg ctccgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag 2460
 cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca 2520
 ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat 2580
 taatacgcgt accgctagcc aggaagagtt tgtagaaacg caaaaaggcc atccgtcag 2640
 atggccttct gcttagtttg atgcctggca gtttatggcg ggcgtcctgc ccgccaccct 2700
 ccgggccggt gcttcacaac gttcaaatcc gctcccggcg gatttgcctt actcaggaga 2760
 gcggtcaccg acaaacaca gataaaacga aaggcccagt cttccgactg agcctttcgt 2820
 tttatttgat gcctggcagt tccctactct cgcgttaacg ctagcatgga tgttttccca 2880
 gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtct taagctcggg ccccaataa tgattttatt 2940
 ttgactgata gtgacctggt cgttgcaaca aattgatgag caatgctttt ttataatgcc 3000
 aactttgtac aaaaaagcag gctccgcggc cgcactaggt ttaaaactta gaagctagga 3060
 attcgcggcc gctttcctgc atgacatcgt cctgcagagc caagcgcag cttaattaaa 3120
 ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccggtgg ttttttacct 3180
 ctatttaaag gggttttcca ctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt 3240
 taattttca taatctttgg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat 3300
 ttattatttg taaacattt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta 3360
 atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taattttagc gttggtagaa 3420
 agcataatga tttattctta ttcttcttca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa 3480

ES 2 568 803 T3

ttccttacct taagaaggat ttcccatttt atattttaaa aatatattta tcaaataattt 3540
 ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat 3600
 aatTTTTTTT ttgactgat cttaaagcaa cacccagtga cacaactagc cattTTTTTtC 3660
 tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa 3720
 caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt 3780
 gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcca gacacatctt ctaaagtaat 3840
 ttttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa 3900
 aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt 3960
 gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattgttt tatagatagt ttaaagtaaa 4020
 tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg 4080
 gtggactaat tttcatatat ttcttattgc tttfaccttt tcttggtagt taagtccgta 4140
 actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtctt ttggttcatg catggatctt 4200
 gcgcaagaaa aagacaaaga acaaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca 4260
 cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgcgtccatg tatgtctaaa 4320
 tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca 4380
 cacacaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct 4440
 cttccgccac ctcaatttct tcaactcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc 4500
 atgcccaaat ctccatgcat gttccaacca ccttctctct tatataatac ctataaatac 4560
 ctctaataac actcacttct ttcatcatcc atccatccag agtactacta ctctactact 4620
 ataatacccc aacccaactc atattcaata ctactctagg tacctgcag ggatccaaca 4680
 atggccagca gttcttcaag tgtgccagaa cttgccgcag cttccctga tgggacaacg 4740
 gacttcaaac ccatgaggaa caccaaaggc tatgatgtct ccaaacctca catctctgaa 4800
 acaccgatga ctttgaagaa ctggcacaaa catgtgaact ggctcaacac cacattcatt 4860
 ctctttgttc cactggctgg gttgatctca acctattggg ttctcttca atggaaaact 4920
 gcagtgtggg cagttgtgta ctacttcaac actggacttg ggatcactgc tggctaccat 4980
 agattgtggg cacattcctc ttacaaggcc agcttgctc tcaaaatcta ccttgccgca 5040
 gttgtgtgct gagccgttga aggtccata agatggtgga gcaacggaca cagagcacat 5100
 cacagataca cagacacaga gaaagatcct tactcagtga ggaagggatt gctctacagc 5160
 cacatgggtt ggatgctctt gaagcagaat ccaaagaagc aagggaggac ggacattact 5220
 gatctgaatg aggaccagt tgtggtctgg caacatagga actttctcaa gtgtgtgatc 5280
 ttcatggctt tggcttttcc cacccttggt gctggcctgg gatggggaga ctactgggga 5340
 ggtttcatct atggagggat cttgagagtg ttctttgttc agcaagccac cttctgtgtc 5400
 aactcacttg cacattggct tggatgataa ccgtttgatg acagaaactc tccacgtgac 5460
 catgtcataa ctgctcttgt cacgctgggt gaaggctatc acaactttca ccatgagttt 5520

ES 2 568 803 T3

ccgtcagact atagaaatgc gattgagtgg tatcagtatg accccacgaa gtggagcatt 5580
 tggatttggg agcaacttgg acttgctcac aatctcaagc agttcagaca gaatgagata 5640
 gagaaggaaa gggttcaaca gttgcagaag aaactggatc agaagagagc gaaacttgat 5700
 tggggaatac cgttggaaaca actccctggt gtgtcttggg atgactttgt tgaacagtca 5760
 aagaatggca aggcattgat tgctgttctt ggtgtcattc acgatgttgg tgacttcac 5820
 aaggatcatc ctggtggacg tgctctcatc aactctgcga ttggcaaaga tgccacagcg 5880
 atcttcaatg gaggtgtcta caatcattca aatgccgcac acaaccttct ctccaccatg 5940
 aggggtgggt tcctccgtgg aggggtgcgaa gtggagatat ggaaacgtgc tcaaagtgag 6000
 aacaaagatg tctctactgt ggttgatagt tctggcaacc gtattgtgag agctggtgga 6060
 caagctacca aagtggttca gccagtcctt ggtgctcaag cagcttgatg agtagttagc 6120
 ttaatcacct agagct 6136

<210> 60
 <211> 18713
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7319

10

<400> 60

ttgtacaaag tggttgctgc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180
 ttgaaatggc actgttattt caaccatatac ttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
 aagtaataa tagacgccgt tgtaaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctgagggaa 300
 tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg 360
 taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcatgatag 420
 ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
 caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaca attgcctttg 540
 gggagacggt aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
 tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
 tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
 atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
 atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
 tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa 900
 agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga 960
 ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaaggcgcg aaagtaacct 1020
 tatcaciaag gaatcttata cccactact tatcctttta ttttttccg tgtcattttt 1080

ES 2 568 803 T3

gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt 1140
 tgggtgaagc tattttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt 1200
 gtaggtacca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg 1260
 ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg 1320
 tctacagtga acttttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag 1380
 aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtttgt ggctggtatt 1440
 gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactggt 1500
 tacgtgtcac atagggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
 aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
 ccactctgta ggttgcataa ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgagct 1680
 ggatacaagc atggtggatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca 1740
 gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
 agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatccccggg ttgatcctat ctgtgttgaa 1860
 atagttgagg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg 1920
 aggtgggcta tggctctcag ttccttgtag aagcgcttgg tctaagggtc agaggtgta 1980
 gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt 2040
 aaagtatgta ttcataccta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat 2100
 gtctttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccgggta ctttctttta 2160
 atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tgggccgta taggaattga 2220
 agtgtgcttg aggtcggtcg ccaccactcc ctttcataa tttacatgt atttgaaaaa 2280
 taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaga 2340
 aatatagttt aaatatattat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa 2400
 cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct 2460
 ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
 tttaaacgat ctgcgtctaa tttcgggtcc aacttgaca ggaagacgt cgaccgcggt 2580
 agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgctc gatcgggtcc aatgttgtcc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tgggaaggg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
 gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgcggtt ttcggtggca 2880
 tattattcgc cagcagttag cagacgaaga gacctcatg aacgtggcca aggccagagt 2940
 taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatacgt atgccatggt 3060
 gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga 3120

ES 2 568 803 T3

ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
 gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggatcattc cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat 3300
 tgttttagc tttgtctgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
 aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtgc tcathtagaa 3480
 cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaac gaataagagt aaatacacct 3540
 tttttaacat tacaataag ttcttatac ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcga tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccgcccc acgctgtcgc aggaattctg 3960
 atctgcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taattgttt attgcttctc cctataaata cgacggatcg taattgtcgc ttttatcaaa 4080
 atgactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat tttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttctttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgtg gtttctacgc agaactgagc cggtaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgcgagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtcgc ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttcgcggccg aggggcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttctcg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggtaaaaga 4740
 caggtagcgc gtggccgaaa aacggcgga aacccttgca atgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccccaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcggcgt ttgcgaggct ggccagctcc acgctcggcg ccgaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgc cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccc cgggtgtctc 5160

ES 2 568 803 T3

cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
aacctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat 5340
atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccg 5520
gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaacccag aagggcagcc 5580
cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aagggcggcg 5640
cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggctac aaaatcacgg 5700
gcgtcgtgga ctatgagcac gtcccgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggcccgc 5760
tggcggcctt gctgaaactc tggctcaccg acgaccgcg cacggcgcg ttcggtgatg 5820
ccacgatcct cgccctgtcg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca 5880
tgatggcgtt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgtcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
gggtcaaact aggaataaagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
gggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc gccccgcgaa 6300
accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag 6540
caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct ttccttgctt 6600
gatattgcgc cgtggccgga cacgatgca gcatgcca aacgacacgg ccgctctgcc 6660
ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa ggtcattttc 6720
cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac 6780
gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcga cccctatcgg cgagccgatc 6840
accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtcg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcgac ggcccgacgg 7140
atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttccgc 7200

ES 2 568 803 T3

ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggccaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgtc 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
 tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cgcccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560
 gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgctcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
 aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggcgcctaca 7680
 tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
 acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggcg 7800
 gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
 caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatatc tcgctattct 7920
 ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcggggcg acggtaggcg 7980
 ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctc gctaggtagc ccgatacgat 8040
 tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcccggcg ggcgctggtg gtgttgacac 8100
 caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcggggggc gtttccatgg 8160
 cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
 cctggcaact ggccggccga ggacttctgc tcgttccagt agctttagtg tttgatccgc 8280
 caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag 8340
 cgggtttaac ctacttctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt 8400
 cttactggg ctttctcagc ccccagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
 gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggtt 8520
 aattcaggag ttaaacatca tgagggagc ggtgatcgc gaagtatcga ctcaactatc 8580
 agaggtagtt ggcgtcatcg agcgcctct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta 8640
 cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt 8700
 gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgacctt tggaaacttc 8760
 ggcttcccc ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
 cgacatcatt ccgtggcgtt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg 8880
 caatgacatt cttgcaggt tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt 8940
 gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggc ccagcggcgg aggaactctt 9000
 tgatccggtt cctgaacag atctatttga ggcgctaaat gaaacctta cgctatggaa 9060
 ctcgcccgcc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
 gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgct gctgccgact gggcaatgga 9180
 gcgcctgccg gccagtatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttgaca 9240

ES 2 568 803 T3

agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttcact acgtgaaagg 9300
 cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
 cgcggcgcgg cttaaactca gcgtagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttgatcca ttcccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccgggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
 atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggttg attttgatat aaaccgaacc aactcggctc atttgcacc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgc aatattcttg aaattttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa ttttttaaa aaaatacgc atgacttga acaaaagaaa 10800
 gtgatataat tttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttccttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttcaaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 aaacaaagaa gcgatcgcgc ggccgccatt gtactcccag tatcattata gtgaaagttt 11100
 tggctctctc gccggtggtt ttttacctct atttaaagg gttttccacc taaaaattct 11160
 ggtatcattc tcactttact tgttacttta atttctcata atctttggtt gaaattatca 11220
 cgcttccgca cacgatatcc ctacaaattt attatttgtt aaacattttc aaaccgcata 11280

ES 2 568 803 T3

aaatTTtatg aagTcccgtc tatcttTaat gtagtctaac atTTTcatat tgaaatatat 11340
 aatttactta atTTtagcgt tggtagaaag cataatgatt tattcttatt cttcttcata 11400
 taaatgttta atatacaata taaacaaatt ctttacctta agaaggattt cccattttat 11460
 atTTtaaaaa tatatttatc aaatattttt caaccacgta aatctcataa taataagttg 11520
 tttcaaaagt aataaaattt aactccataa tttttttatt cgactgatct taaagcaaca 11580
 cccagtgaca caactagcca tttttttctt tgaataaaaa aatccaatta tcattgtatt 11640
 ttttttatac aatgaaaatt tcaccaaaca atgatttggt gtatttctga agcaagtcac 11700
 gttatgcaaa attctataat tcccatttga cactacggaa gtaactgaag atctgctttt 11760
 acatgcgaga cacatcttct aaagtaattt taataatagt tactatattc aagatttcat 11820
 atatcaaata ctcaatatta cttctaaaaa attaattaga tataattaa atattacttt 11880
 tttaatTTta agtTTtaattg ttgaatttgt gactattgat ttattattct actatgttta 11940
 aattgtTTta tagatagttt aaagtaaata taagtaatgt agtagagtgt tagagtgtta 12000
 ccctaaacca taaactataa gatttatggt ggactaattt tcatatattt cttattgctt 12060
 ttaccttttc ttggtatgta agtccgtaac tgggaattact gtgggttgcc atgacactct 12120
 gtggtcTTTT ggttcatgca tggatgcttg cgcaagaaaa agacaaagaa caaagaaaaa 12180
 agacaaaaca gagagacaaa acgcaatcac acaaccaact caaattagtc actggctgat 12240
 caagatcgcc gcgtccatgt atgtctaaat gccatgcaaa gcaacacgtg cttaacatgc 12300
 actTTaaatg gctcaccat ctcaaccac acacaaacac attgcTTTT tcttcatcat 12360
 caccacaacc acctgtatat attcattctc ttccgccacc tcaatttctt cacttcaaca 12420
 cacgtcaacc tgcataTgcg tgcataccca tgcccaaatc tccatgcatg ttccaaccac 12480
 cttctctctt atataatacc tataaatacc tctaataTca ctcaactctt tcatcatcca 12540
 tccatccaga gtactactac tctactacta taatacccca acccaactca tattcaatac 12600
 tactctagga tccaacaatg tctgctccaa ccgctgacat cagggctagg gctccagagg 12660
 ctaagaaggt tcacatcgct gataccgcta tcaacaggca caattggTac aagcacgtga 12720
 actggctcaa cgtcttctc atcatcgga tcccactcta cggatgcatc caagctttct 12780
 gggttccact tcaactcaag accgctatct gggctgtgat ctactacttc ttcaccggac 12840
 ttggaatcac cgctggatac cacaggcttt gggctcactg ctcatactct gctactcttc 12900
 cacttaggat ctggcttgct gctgttgag gaggagctgt tgagggatct atcagatggt 12960
 gggctagggg tcacagggct catcataggt acaccgatac cgacaaggac ccatactctg 13020
 ttaggaaggg acttctctac tctcaccttg gatggatggt gatgaagcag aacccaaaga 13080
 ggatcggaag gaccgacatc tctgatctca acgaggacc agttgttTgt tggcaacaca 13140
 ggaactacct caaggTgtg ttcaccatgg gacttgctgt tccaatgctt gttgctggac 13200
 ttggatgggg agattgctt ggaggattcg tgtacgctgg aatccttagg atcttcttcg 13260
 ttcaacaagc taccttctgc gtgaactctc ttgctcactg gcttggagat caaccattcg 13320

ES 2 568 803 T3

atgataggaa ctctcctagg gatcacgtga tcaccgctct tgmtaccctt ggagagggat 13380
 accacaactt ccaccacgag ttcccatctg actacaggaa cgctatcgag tggcaccagt 13440
 acgatcctac caagtggctt atctgggctt ggaagcaact tggattggct tacgatctca 13500
 agaagtccag ggctaacgag atcgagaagg gaagggttca acaacttcag aagaagcttg 13560
 ataggaagag ggctactctt gattggggaa ccccacttga tcaacttcca gtgatggaat 13620
 gggatgacta cgttgagcaa gctaagaacg gaaggggact tgttgctatc gctggagt 13680
 ttcacgatgt taccgacttc atcaaggatc acccaggagg aaaggctatg atctctctg 13740
 gaatcgaaa ggatgctacc gctatgttca acggaggagt gtactaccac tctaacgcag 13800
 ctcaaacct tcttagcacc atgaggggtg gagtgatcag gggaggatgc gaggttgaga 13860
 tctggaagag ggctcagaag gagaacgttg agtacgttag ggatggatct ggacaaagg 13920
 tgatcagggc tggagagcaa ccaaccaaga tcccagagcc aatcccaacc gctgatgctg 13980
 cttgagtagt tagcttaatc acctaggtca ccagtatgaa ctaaaatgca tgtaggtgta 14040
 agagctcatg gagagcatgg aatattgtat ccgacctgt aacagtataa taactgagct 14100
 ccatctcact tcttctatga ataaacaaag gatgttatga tatattaaca ctctatctat 14160
 gcaccttatt gttctatgat aaatttcctc ttattattat aatcatctg aatcgtgacg 14220
 gcttatggaa tgcttcaaat agtacaaaaa caaatgtgta ctataagact ttctaaacaa 14280
 ttctaacttt agcattgtga acgagacata agtgtaaga agacataaca attataatgg 14340
 aagaagttt tctccattta tatattatat attaccact tatgtattat attaggatgt 14400
 taaggagaca taacaattat aaagagagaa gtttgtatcc atttatatat tatatactac 14460
 ccatttatat attatactta tccacttatt taatgtcttt ataaggtttg atccatgata 14520
 tttctaatat tttagttgat atgtatatga aaaggtaacta tttgaactct cttactctgt 14580
 ataaaggttg gatcatcctt aaagtgggtc tatttaattt tattgcttct tacagataaa 14640
 aaaaaatta tgagttgggt tgataaaata ttgaaggatt taaaataata ataaataata 14700
 aataacatat aatatatgta tataaattta ttataatata acatttatct ataaaaaagt 14760
 aatatgttc ataaatctat acaatcgttt agccttgctg gaacgaatct caattattta 14820
 aacgagagta aacatatttg actttttggt tatttaacaa attattattt aacactatat 14880
 gaaatttttt ttttttatca gcaaagaata aaattaaatt aagaaggaca atgggtgtccc 14940
 aatccttata caaccaactt ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca 15000
 aaggaaattt ttttaattga gttgtcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta 15060
 cacataaccc ttttagcagt agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta 15120
 ttttttatc agcaaagaat aaataaaata aatgagaca cttcagggat gtttcaacc 15180
 ttatacaaaa ccccaaaaac agtttccta gcaccctacc aacgaattcg cggccgcttt 15240
 cctgcatgac atcgtcctgc agagccaagc gcatgcttaa ttaaactagt ctcccagtat 15300
 cattatagtg aaagttttgg ctctctcgcc ggtggttttt tacctctatt taaaggggtt 15360

ES 2 568 803 T3

ttccacctaa aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt tctcataatc 15420
 tttggttgaa attatcacgc ttccgcacac gatatcccta caaatttatt atttgttaa 15480
 cttttcaaaa ccgcataaaa ttttatgaag tcccgtctat cttaaatgta gtctaacatt 15540
 ttcataattga aatatataat ttacttaatt ttagcgttgg tagaaagcat aatgatttat 15600
 tcttattctt ctccatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt taccttaaga 15660
 aggatttccc attttatatt ttaaaaatat atttatcaaa ttttttcaa ccacgtaa 15720
 ctcataataa taagttgttt caaaagtaat aaaattaac tccataattt ttttattcga 15780
 ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccattt ttttcttga ataaaaaat 15840
 ccaattatca ttgtattttt tttatacaat gaaaatttca ccaacaatg atttgtggta 15900
 tttctgaagc aagtcatggt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta 15960
 actgaagatc tgcttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttaa taatagttac 16020
 tatattcaag atttcatata tcaaaactc aatattactt ctaaaaaatt aattagatat 16080
 aattaaata ttactttttt aattttaagt ttaattgttg aatttgtgac tattgattta 16140
 ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagttaaa gtaaataata gtaatgtagt 16200
 agagtgttag agtgttacc taaccataa actataagat ttatgggtga ctaattttca 16260
 tatatttctt attgctttta cttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg 16320
 ggttgccatg acactctgtg gtcttttgg tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac 16380
 aaagaacaaa gaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaa 16440
 ttagtcaactg gctgatcaag atcgccgct ccatgtatgt ctaaagcca tgcaaagcaa 16500
 cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac aaacacattg 16560
 ctttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttc gccacctcaa 16620
 tttcttcaact tcaacacacg tcaacctgca tatgctgtc atcccatgcc caaatctca 16680
 tgcattgtcc aaccacctc tctcttatat aatacctata aatacctcta atactactca 16740
 cttctttcat catccatcca tccagagtac tactactcta ctactataat accccaacc 16800
 aactcatatt caatactact ctaggtagcc tgcaggatc caacaatggc tgcacttgat 16860
 agcatccctg aggacaaagc aactagctcc aagtcaacc acatacagta ccaagaggtc 16920
 acgttttagga actggtacaa gaaaatcaac tggctcaaca cgacccttgt tgcctcatt 16980
 cctgctcttg ggttgactt gacgagaacc acacctctca ccagacctac cctcatttg 17040
 tctgttctct actatttctg tacagcgtt ggcatcactg gtggctacca cagactttg 17100
 tccataggt cttacagtgc gaggttgcca ttgagactct tcttggctt cactggagct 17160
 ggtgcatcc aaggttctgc aagatggtg tcagccaatc atagggcaca tcaccgttg 17220
 acggacacca tgaaggacc ctactctgtg atgagaggac tgctgttctc ccacataggt 17280
 tggatggttc tcaactctga tccaaaggc aaaggcagaa cagatgttc tgatcttgac 17340
 tctgatcccg tcgttgtgtg gcaacacaaa cactatggca agtgtttgct ctttgcgct 17400

ES 2 568 803 T3

tggatctttc cgatgatagt ggctgggctg ggttggggag attggtggg tggacttgtc 17460
 tatgctggca tcatacgtgc ctgctttggt cagcaagcca ctttctgtgt caactcattg 17520
 gcacattgga taggtgaaca accgtttgat gacagacgta ctccaagggg tcatgttctg 17580
 actgctgttg tcacaatggg agaaggatac cacaacttcc accatgagtt tccgagtgc 17640
 tacagaaatg ccatcatttg gtatcagtat gaccctacaa agtggctcat ctatctcttc 17700
 agcttgggtc ctttcccatt ggctactct ctcaagacct tccgttccaa tgagattgag 17760
 aaaggaaggc ttcagcaaca gcaaaaaggct cttgacaaga aaagaagtgg tcttgattgg 17820
 ggacttcctc tcttccagct tccagtgatc tcatgggatg actttcaagc tcgttgcaaa 17880
 gaaagtggag agatgcttgt tgctgttgct ggagtgatcc atgatgtctc ccagttcatt 17940
 gaagatcatc ctgggtgggag gagcctcatt agaagtgtg tgggaaaga tgggactggc 18000
 atgttcaatg gtggagtgta tgaacattca aacgccgcac acaacttgct gagcacaatg 18060
 agagtggag tcttgagagg tggacaagaa gtggaggttt ggaagaaaca gaggtggat 18120
 gttcttggga agtcagacat tcttcgtcaa gtgacaaggg tggagcgtct ggtggaagga 18180
 gctgttcgag cgtgatgagt agttagctta atcacctaga gctcggtcac ctcgagtatc 18240
 aaaatctatt tagaaataca caatattttg ttgcaggctt gctggagaat cgatctgcta 18300
 tcataaaaat tacaaaaaaa ttttatttgc ctcaattatt ttaggattgg tattaaggac 18360
 gcttaaatga tttgtcgggt cactacgcat cattgtgatt gagaagatca gcgatacgaa 18420
 atattcgtag tactatcgat aatttatttg aaaattcata agaaaagcaa acgttacatg 18480
 aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa gccacgcaca tttaggatat tggccgagat 18540
 tactgaatat tgagtaagat cacggaattt ctgacaggag catgtcttca attcagccca 18600
 aatggcagtt gaaatactca aaccgcccc aatgacaggag cggatcattc attgtttggt 18660
 tggttgcctt tgccaacatg ggagtccaag gttggcgcgc cgaccagct ttc 18713

<210> 61
 <211> 14524
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7321

10

<400> 61
 ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180
 ttgaaatggc actgttattt caaccatata tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
 aagtaaataa tagacgccgt tgtaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa 300
 tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatgggtg 360
 taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccagat ggcatgatag 420

ES 2 568 803 T3

ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaacaa attgcctttg 540
gggagacggg aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcaagaaa 900
agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga 960
ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 1020
tatcacaaag gaatcttatc ccccactact tatcctttta ttttttccg tgtcattttt 1080
gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaa agaaaaaatt 1140
tgggtgaagc tttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt 1200
gtaggtacca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg 1260
ccagctacag cagctgatat ggccgcgggt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg 1320
tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag 1380
aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgtgt ggctggtatt 1440
gcttacgctg ggccttgaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactgtt 1500
tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
aagcttatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
ccatctgtta ggttgcagta ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgagct 1680
ggatacaagc atggtgtagt gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca 1740
gctctccaa ggcagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa 1860
atagttgagg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaagga acccaagggtg 1920
aggtgggcta tggctctcag ttccttgctg aagcgcctgg tctaaggctc agaggtgtta 1980
gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt 2040
aaagtatgta ttcactacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat 2100
gtctttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga ctttctttta 2160
atccaggatg aaataatag ttattataat ttttgcgatt tgggccgtta taggaattga 2220
agtgtgcttg aggtcggctg ccaccactcc catttcataa tttacatgt atttgaaaa 2280
taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga 2340
aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa 2400
cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct 2460

ES 2 568 803 T3

ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
 tttaaacgat ctgcgctctaa ttttcggtcc aacttgcaca ggaaagacgt cgaccgcggt 2580
 agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgctc gatcgggtcc aatgttgctc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtgaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tggatgaagg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
 gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgccgatt ttcgttggca 2880
 tattattcgc cagcagttag cagacgaaga gaccttcatt aacgtggcca aggccagagt 2940
 taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt 3060
 gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga 3120
 ggataagttg attcattggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
 gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggtcatc cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgttagcaat 3300
 tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
 aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa 3480
 cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcatcgaac gaataagagt aaatacacct 3540
 tttttaacat taaaaataag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgcg tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgacg tgaatgtaga cacgtcgaac taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttggtt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgagg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggg gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500

ES 2 568 803 T3

aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggctg ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttcgcgccg aggggcgcag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcg gtcgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggtttagc gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccctcaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat ccccgaggct gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgccgat ttgcgaggct ggcagctcc acgtcgccgg ccgaaatcga gcctgccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctc 5160
 cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
 cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccg 5520
 gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gcccaaccag aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tgggcggcct gctgaaatc tggctcaccg acgaccccg caggcgcgg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggta 5880
 tgatgggctt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgctcg tgattgcaa gcacgtccc atgctctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggtaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 gggatgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcggg 6240
 tttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgac gccccgcgaa 6300
 acctccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcgccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag 6540

ES 2 568 803 T3

caggccgctg tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttgctc 6600
 gatattgctc cgtggccgga cacgatgcca gcgatgcca acgacacggc ccgctctgcc 6660
 ctgttcacca cgcgcaaca gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaaca ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcga cccctatcgg cgagccgatc 6840
 accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcggac ggcccagcgg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgac tcaagctgga aaccttcgac 7200
 ctcatgtgct gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgctt gggtaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgtc 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggact gctcgcgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
 tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560
 gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag caccaggaga 7620
 aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggccctaca 7680
 tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
 acaaggcga tctgtccggc gtttctggtg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggc 7800
 gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
 caacgggaat ctggtggatg cgcatttca tcctcggcgc acttaattt tcgctattct 7920
 ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcggggcg acggtagggc 7980
 ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtagc ccgatacgat 8040
 tgatggcggc cctgggggct atttgcgga ctgcgggctt ggcgctggtg gtgttgacac 8100
 caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggctt ggcgggggag gtttccatgg 8160
 cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
 cctggcaact ggccggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagt tttgatccgc 8280
 caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag 8340
 cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcggc actcgaacct acagttggtt 8400
 ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
 gggagcacag gatgacgctt aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggtt 8520
 aattcaggag ttaaacatca tgaggggaag ggtgatcggc gaagtatcga ctcaactatc 8580

ES 2 568 803 T3

agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta 8640
 cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt 8700
 gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcgggc agctttgatc aacgacctt tggaaaacttc 8760
 ggcttcccc ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
 cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttggag aatggcagcg 8880
 caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt 8940
 gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt 9000
 tgatccgggt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa 9060
 ctcgccccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
 gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga 9180
 gcgcctgccc gcccgatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca 9240
 agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300
 cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
 cgcggcggcg cttactcaa gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttgatcca ttcccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccgggtg gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaatata 9840
 aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttctc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 ttttctgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta cttaaatttg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
 atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatctcttg aaattttgca 10560
 aatgaaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620

ES 2 568 803 T3

tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca atgacttgga acaaaaagaaa 10800
 gtgatataatt ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcggccgctt tcctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcatgctta attaaactag 11100
 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctctat 11160
 ttaaaggggt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg cttccgcaca cgatatccct acaaatttat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaacat tttcatattg aaatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata aacaaattct 11460
 ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaata tatttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgcaca actagccatt ttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
 gatttggttg atttctgaag caagtcatgt tatgcaaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
 ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
 ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
 taattagata taattaaaat attacttttt taattttaag ttttaattgtt gaatttgatga 11940
 ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagtttaa agtaaatata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatgggtg 12060
 actaattttc atatatctt tattgctttt accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgcat gacactctgt ggtcttttgg ttcatgcatg gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcy tccatgtatg tctaaatgcc 12300
 atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggct caccatctc aaccacaca 12360
 caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
 cgccacctca attttctcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgcgtgt catcccatgc 12480
 ccaaatctcc atgcatgttc caaccactt ctctcttata taatacctat aaatacctct 12540
 aatatcactc acttctttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
 taccccaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgcagggat ccaacaatgg 12660

ES 2 568 803 T3

ctgcacttga tagcatccct gaggacaaag caactagctc caagtcaacc cacatacagt 12720
 accaagaggt cacgtttagg aactgggtaca agaaaatcaa ctggctcaac acgacccttg 12780
 ttgtcctcat tcctgctcct gggttgtact tgacgagaac cacacctctc accagaccta 12840
 ccctcatttg gtctgttctc tactatttct gtacagcggt tggcatcact ggtggctacc 12900
 acagactttg gtcccatagg tcttacagtg cgaggttgcc attgagactc ttcctggctt 12960
 ttractggagc tggtgcgatc caaggttctg caagatgggt gtcagccaat catagggcac 13020
 atcaccggtg gacggacacc atgaaggacc cctactctgt gatgagagga ctgctgttct 13080
 cccacatagg ttggatggtt ctcaactctg atccaaaggt caaaggcaga acagatgttt 13140
 ctgatcttga ctctgatccc gtcgttgtgt ggcaacacaa aactatggc aagtgtttgc 13200
 tctttgccgc ttggatcttt ccgatgatag tggctgggct gggttgggga gattgggtggg 13260
 gtggacttgt ctatgctggc atcatacgtg cctgctttgt tcagcaagcc actttctgtg 13320
 tcaactcatt ggcacattgg ataggtgaac aaccgtttga tgacagacgt actccaaggg 13380
 atcatgttct gactgctgtg gtcacaatgg gagaaggata ccacaacttc caccatgagt 13440
 ttccgagtga ctacagaaat gccatcattt ggatcagta tgaccctaca aagtggctca 13500
 tctatctctt cagcttgggt cccttcccat tggcctactc tctcaagacc ttccgttcca 13560
 atgagattga gaaaggaagg cttcagcaac agcaaaaggc tcttgacaag aaaagaagtg 13620
 gtcttgattg gggacttctc ctcttccagc ttccagtgat ctcatgggat gactttcaag 13680
 ctctgtgcaa agaaagtgga gagatgcttg ttgctgttgc tggagtgatc catgatgtct 13740
 cccagttcat tgaagatcat cctggtggga ggagcctcat tagaagtgct gttgggaaag 13800
 atgggactgg catgttcaat ggtggagtgt atgaacattc aaacgccgca cacaacttgc 13860
 tgagcacaat gagagttgga gtcttgagag gtggacaaga agtggaggtt tggagaagaac 13920
 agagggtgga tgttcttggg aagtcagaca ttcttcgtca agtgacaagg gtggagcgtc 13980
 tgggtggaagg agctgttgcg gcgtgatgag tagttagctt aatcacctag agctcgggtca 14040
 cctcgagtat caaaatctat ttagaaatac acaatatttt gttgcaggct tgctggagaa 14100
 tcgatctgct atcataaaaa ttacaaaaaa attttatttg cctcaattat tttaggattg 14160
 gtattaagga cgcttaaatt atttgtcggg tctactacgca tcattgtgat tgagaagatc 14220
 agcgatacga aatattcgta gtactatcga taatttattt gaaaattcat aagaaaagca 14280
 aacgttacat gaattgatga aacaatacaa agacagataa agccacgcac atttaggata 14340
 ttggccgaga ttactgaata ttgagtaaga tcacggaatt tctgacagga gcatgtcttc 14400
 aattcagccc aaatggcagt tgaaatactc aaaccgcccc atatgcagga gcggatcatt 14460
 cattgtttgt ttggttgccct ttgccaacat gggagtccaa ggttggcgcg ccgaccacgc 14520
 tttc 14524

<210> 62
 <211> 18422
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7324

10

<400> 62

ES 2 568 803 T3

ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180
 ttgaaatggc actgttatth caaccatatac tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
 aagtaataa tagacgccgt tgttaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagaggaa 300
 tttgagcgtc agacctaatac aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg 360
 taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcatgatag 420
 ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
 caaatgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaca attgcctttg 540
 gggagacggt aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
 tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
 tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
 atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
 atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
 tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggccaagaaa 900
 agaactctga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga 960
 ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 1020
 tatcaciaag gaatcttata cccactact tatcctttta ttttttccg tgtcattttt 1080
 gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt 1140
 tgggtgaagc tttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt 1200
 gtaggtacca gatctggatc ccaaacatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg 1260
 ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg 1320
 tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag 1380
 aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgttg ggctggtatt 1440
 gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gactactggt 1500
 tacgtgtcac atagggatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
 aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
 ccatctgtta ggttgcataa ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct 1680
 ggatacaagc atggtgatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca 1740
 gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
 agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatccccgg ttgatcctat ctgtgttgaa 1860

ES 2 568 803 T3

atagttgCGG tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaaggTG 1920
 aggtgggcta tggctctcag ttccttGTGG aagcgcttGG tctaaggTGC agaggTgTta 1980
 gCGgggatGaa gcaaaaagTg cCGattGtaa caagatatGt tGatcctacG taaggatatt 2040
 aaagtatGta ttcataccta atataatcag tGtattccaa tatgtactac gatttccaat 2100
 gTctttattG tCGccgTatG taatCGgcGt cacaaaataa tccccgGtGa ctttctttta 2160
 atccaggatG aaataatatG ttattataat ttttGcgatt tGgtccGtta taggaattGa 2220
 agTgtGcttG aggtCGgtCG ccaccactcc catttcataa ttttcatGt atttgaaaaa 2280
 taaaaattta tGgtattcaA tttaaacacG tatacttGta aagaatgata tcttgaaaga 2340
 aatatagTtt aaatatttat tGataaaata acaagtcagg tattatagTc caagcaaaaa 2400
 cataaattta ttgatGcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct 2460
 ggtacattGc cGtagatGaa agactgagTg cGatattatG gtGtaataca taggaattCG 2520
 tttaaacgat ctGcgTctaa ttttcggtcc aacttGcaca ggaagacGt cGaccgCGgt 2580
 agctcttGcc cagcagactG ggcttccagT cctttcGctc gatCGggTcc aatgttGtcc 2640
 tcagctGtGa accggaagCG gacgaccaac agTggaagaa ctGaaaggaa cGagccGtct 2700
 ataccttGat gatCGgcctc tGgtgaaggG tatcatCGca gccaagcaag ctcatGaaag 2760
 gctGatgggg gaggtGtata attatgaggc ccacgCGggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctCGttG ctcaagTgca tggCGcaaag cagttattGG agTgCGgatt ttcGttggca 2880
 tattattCGc cagcagttag cagacgaaga gaccttcatG aacgtggcca aggccagagT 2940
 taagcagatG ttacGccctG ctGcaggcct ttctattatc caatagttGG ttgatctttG 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactGaa agagatCGat ggatatCGat atGCCatgtt 3060
 gtttGctagc cagaaccaga tcacatccga tatGctattG cagcttGacG cagatatGga 3120
 ggataagttG attcatggga tCGctcagga gtagctcatc catGcagccG gacaagaaca 3180
 gaaattccGt cGagttaaCG cagccGctta cGacggattc gaaggTcatc cattCGgaat 3240
 gtattagTtt gCaccagctc cGcgtcacac ctGtcttcat ttgaataaga tGttagcaat 3300
 tGtttttagc tttgtcttGt tGtggcaggG cggcaagTgC ttcagacatc attctGtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttGga aataatagac tGcgtcttaa 3420
 aattcagatG tctggatata gatatgattG taaaataacc tatttaagTg tcatttagaa 3480
 cataagTttt atgaatgttc ttccattttc gTcatCGaac gaataagagT aaatacacct 3540
 tttttaacat tacaaataag ttcttatacG ttgtttatac accggaatc atttccatta 3600
 ttttcGcgca aaagtcacgG atattcGtGa aagcGacata aactGcgaaa tttGcgggga 3660
 gTgtcttGag tttGcctcGa ggctagcGca tGcacataga cacacacatc atctcattGa 3720
 tGcttGgtaa taattGtcat tagattGttt ttatGcatag atGcactcGa aatcagccaa 3780
 ttttagaaca gtatcaaacG gatgtgactt cagTacatta aaaacGtccG caatgtGtta 3840
 ttaagttGtc taagcGtcaa tttgattttac aattgaatat atcctGcccc agccagccaa 3900

ES 2 568 803 T3

cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgcttttc cctataaata cgacggatcg taatttgtcg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat tttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggttaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggctg ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttcgcccggc aggggcgagc cccctggggg gatgggaggc ccgcttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccctcggc cgtgcgctg cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttga aatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccctcaa 4860
 gtgtcaagga tcgcccctt catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcggcgat ttgagaggct ggcagctcc acgtcgcggc ccgaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa gcgcccggc ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctg 5160
 cacacggcct cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcagggg aaccagcccg gtgagcgtc gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatcaa cggcgtcagc 5400
 cggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggccgtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccc 5520
 gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaaccag aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tgggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cacggcgcgg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca 5880
 tgatggcgtt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940

ES 2 568 803 T3

ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggtaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 gggatgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgct gccccgcgaa 6300
 accttcagc cctgctgctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcgcccg ccgtggagcg ttcgctcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggctag cgaggccaag 6540
 caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgagcgt ttcctgttc 6600
 gatattgctc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
 ctgttcacca cgcgcaaca gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaaca ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgccccg cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcga cccctatcgg cgagccgatc 6840
 accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccc aggaatgcct gtcgccccta caggcgaccg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcgttgggc acctggaatc ggtgctgctg ctgcaccgct tccgctcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcgac ggcccgacgg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttcgc 7200
 tcatgtgctg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgt 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggact gctcgacgca ctgcttcgc tcagtatcgc 7440
 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
 tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560
 gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgctcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
 aaaagccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggccctaca 7680
 tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
 acaaggcgca tctgtccggc gtttctgtg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggc 7800
 gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
 caacgggaat ctggtgatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaattatt tcgctattct 7920
 ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggccc ggtcgcggcg acggtaggcg 7980

ES 2 568 803 T3

ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc ccgatacgat 8040
 tgatggcggg cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg gtgttgacac 8100
 caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcgggggcg gtttccatgg 8160
 cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
 cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg tttgatccgc 8280
 caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag 8340
 cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt 8400
 ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
 gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggctt 8520
 aattcaggag ttaaacaatca tgaggaagc ggtgatcgcg gaagtatcga ctcaactatc 8580
 agaggtagtt ggcgtcatcg agcggcatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta 8640
 cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggg 8700
 gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgacctt tggaaacttc 8760
 ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
 cgacatcatt ccgtggcgtt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg 8880
 caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgacg gacattgatc tggctatctt 8940
 gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt 9000
 tgatccgggt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa 9060
 ctcgccgccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
 gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga 9180
 gcgcctgccg gccagatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttgaca 9240
 agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300
 cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
 cgcggcggcg cttaaactcaa gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttcccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccgggtg gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaatata 9840
 aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020

ES 2 568 803 T3

cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattatntt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaatntt ttactaacac 10320
 atatattttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataattttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccgggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggcc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaatnttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaatntt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatnttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgattttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaatacgc aatgacttgg acaaaaagaaa 10800
 gtgatataat ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgtctcct tcgttaca aaaatnttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 aaacaagaa gcgatcgcgc ggccgccatt gtactcccag tatcattata gtgaaagtntt 11100
 tggctctctc gccggtggtt ttttacctct atttaaaggg gttttccacc taaaaatntt 11160
 ggtatcattc tcactttact tgttacttta atttctcata atccttgggt gaaattatca 11220
 cgcttccgca cacgatatcc ctacaaatntt attatnttgtt aaacatnttc aaaccgcata 11280
 aaatnttatg aagtcccgtc tatctnttaat gtagtctaac atnttcatat tgaaatata 11340
 aatnttactta atntttagcgt tggtagaaag cataatgatt tnttcttatt cttcttcata 11400
 taaatgntta atatacaata taaacaaat ctttacctta agaaggatntt cccatnttat 11460
 atnttaaaaa tatatnttatc aaatatnttt caaccacgta aatctcataa taataagttg 11520
 tttcaaaagt aataaaatntt aactccataa tttntttatt cgactgatct taaagcaaca 11580
 cccagtgaca caactagcca tttntttctt tgaataaaaa aatccaatta tcattgtatt 11640
 tnttttatac aatgaaaatntt tcaccaacaa atgattnttgy gtatnttctga agcaagtcac 11700
 gttatgcaaa atntctataat tcccattntga cactacggaa gtaactgaag atctgctntt 11760
 acatgcgaga cacatcttct aaagtaatntt taataatagt tactatattc aagatnttcat 11820
 atatcaaaata ctcaatatta cttctaaaaa attaattaga tataattaaa atattactntt 11880
 tnttaatntta agtnttaattg ttgaatnttgt gactattgat ntattatntt actatgntta 11940
 aatntgntta tagatagntt aaagtaaaata taagtaatgt agtagagtgt tagagtntta 12000
 ccctaaacca taaactataa gatnttatggt ggactaatntt tcataatntt cttatntgctt 12060

ES 2 568 803 T3

ttaccttttc ttggtatgta agtccgtaac tggaattact gtggggtgcc atgacactct 12120
 gtggctctttt ggttcatgca tggatgcttg cgcaagaaaa agacaaagaa caaagaaaaa 12180
 agacaaaaca gagagacaaa acgcaatcac acaaccaact caaattagtc actggctgat 12240
 caagatcgcc gcgtccatgt atgtctaaat gccatgcaaa gcaacacgtg cttaacatgc 12300
 actttaaatg gctcacccat ctcaaccac acacaaacac attgcctttt tcttcatcat 12360
 caccacaacc acctgtatat attcattctc ttccgccacc tcaatttctt cacttcaaca 12420
 cacgtcaacc tgcataatgc tgcataatgc tgcccaaatc tccatgatg ttccaaccac 12480
 cttctctctt atataatacc tataatacc tctaataatca ctcaacttctt tcatcatcca 12540
 tccatccaga gtactactac tctactacta taatacccca acccaactca tattcaatac 12600
 tactctagga tccaacaatg tctgctccaa ccgctgacat cagggctagg gctccagagg 12660
 ctaagaaggt tcacatcgct gataccgcta tcaacaggca caattggtag aagcacgtga 12720
 actggctcaa cgtcttctc atcatcgga tcccactcta cggatgatc caagcttctt 12780
 gggttccact tcaactcaag accgctatct gggctgtgat ctactacttc ttcaccggac 12840
 ttggaatcac cgctggatac cacaggcttt gggctcactg ctactactct gctactcttc 12900
 cacttaggat ctggcttgc tctgttggag gaggagctgt tgaggatct atcagatggt 12960
 gggctagga tcacagggt catcataggt acaccgatac cgacaaggac ccatactctg 13020
 ttaggaaggg acttctctac tctcaccttg gatggatggt gatgaagcag aaccacaaga 13080
 ggatcggaag gaccgacatc tctgatctca acgaggacc agttgttgtt tggcaacaca 13140
 ggaactacct caaggttgtg ttcacatgg gacttgcctg tccaatgctt gttgctggac 13200
 ttggatgggg agattggctt ggaggattcg tgtacgctgg aatccttagg atcttcttcg 13260
 ttcaacaagc taccttctgc gtgaactctc ttgctcactg gcttggagat caaccattcg 13320
 atgatagga ctctcctagg gatcacgtga tcaccgctct tgttaccctt ggagagggat 13380
 accacaact ccaccagag ttcctatctg actacaggaa cgctatcgag tggcaccagt 13440
 acgatctac caagtgtct atctgggctt ggaagcaact tggattggct tacgatctca 13500
 agaagttcag ggctaacgag atcgagaag gaagggttca acaacttcag aagaagcttg 13560
 ataggaagag ggctactctt gattgggaa cccacttga tcaacttcca gtgatggaat 13620
 gggatgacta cgttgagcaa gctaagaacg gaaggggact tgttgctatc gctggagttg 13680
 ttcacgatgt taccgacttc atcaaggatc acccaggagg aaaggctatg atctctctg 13740
 gaatcggaaa ggatgctacc gctatgttca acggaggagt gtactaccac tctaacgcag 13800
 ctcaaacct tcttagcacc atgaggggtg gagtgatcag gggaggatgc gaggttgaga 13860
 tctggaagag ggctcagaag gagaacgttg agtacgttag ggatggatct ggacaaaggg 13920
 tgatcagggc tggagagcaa ccaaccaaga tcccagagcc aatccaacc gctgatgctg 13980
 cttgagtagt tagcttaac acctaggctc ccagatgaa ctaaaatgca tgtaggtgta 14040
 agagctcatg gagagcatgg aatattgtat ccgacctgt aacagtataa taactgagct 14100

ES 2 568 803 T3

ccatctcact tcttctatga ataaacaaag gatgttatga tatattaaca ctctatctat 14160
 gcaccttatt gttctatgat aaatttcctc ttattattat aaatcatctg aatcgtgacg 14220
 gcttatggaa tgcttcaaat agtacaaaaa caaatgtgta ctataagact ttctaaacaa 14280
 ttctaacttt agcatttgta acgagacata agtgттаага agacataaca attataatgg 14340
 aagaagtttg tctccattta tatattatat attaccact tatgtattat attaggatgt 14400
 taaggagaca taacaattat aaagagagaa gtttgatcc atttatatat tatatactac 14460
 ccatttatat attatactta tccacttatt taatgtcttt ataaggtttg atccatgata 14520
 tttctaatat tttagttgat atgtatatga aaaggtaacta tttgaactct cttactctgt 14580
 ataaaggttg gatcatcctt aaagtgggtc tatttaattt tattgcttct tacagataaa 14640
 aaaaaatta tgagttgggt tgataaaata ttgaaggatt taaaataata ataaataata 14700
 aataacatat aatatatgta tataaattta ttataatata acatttatct ataaaaagt 14760
 aaatattgtc ataaatctat acaatcgttt agccttgctg gaacgaatct caattattta 14820
 aacgagagta aacatatttg actttttggt tatttaacaa attattattt aacactatat 14880
 gaaatttttt ttttttatca gcaaagaata aaattaaatt aagaaggaca atgggtgtccc 14940
 aatccttata caaccaactt ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca 15000
 aaggaaattt ttttaattga gttgtcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta 15060
 cacataaccc ttttagcagt agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta 15120
 tttttttatc agcaaagaat aaataaaata aaatgagaca cttcagggat gtttcaaccc 15180
 ttatacaaaa ccccaaaaac aagtttccta gcaccctacc aacgaattcg cggccgcttt 15240
 cctgcatgac atcgtcctgc agagccaagc gcatgcttaa ttaaactagt ctcccagtat 15300
 cattatagtg aaagttttgg ctctctcgcc ggtggttttt tacctctatt taaaggggtt 15360
 ttccacctaa aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt tctcataatc 15420
 tttggttgaa attatcacgc ttccgcacac gatatcccta caaatattt atttggttaa 15480
 cttttcaaaa ccgcataaaa ttttatgaag tcccgtctat ctttaatgta gtctaacatt 15540
 ttcattatga aatataat ttacttaatt ttagcgttg tagaaagcat aatgatttat 15600
 tcttattctt ctccatataa atgtttaata tacaataaa acaaattctt taccttaaga 15660
 aggatttccc attttatatt ttaaaaatat atttatcaaa ttttttcaa ccacgtaa 15720
 ctcataataa taagttggtt caaaagtaat aaaatttaac tccataattt ttttattcga 15780
 ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccattt ttttcttga ataaaaaat 15840
 ccaattatca ttgtattttt tttatacaat gaaaatttca ccaacaatg atttggtgta 15900
 tttctgaagc aagtcatggt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta 15960
 actgaagatc tgcttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttaa taatagtac 16020
 tatattcaag atttcatata tcaaatctc aatattactt ctaaaaaatt aattagatat 16080
 aattaaata ttactttttt aattttaagt ttaattggtg aatttgtgac tattgattta 16140

ES 2 568 803 T3

ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagtttaaa gtaaatataa gtaatgtagt 16200
 agagtgttag agtgttaccc taaaccataa actataagat ttatggtgga ctaattttca 16260
 tatattttctt attgctttta ctttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg 16320
 ggttgccatg acactctgtg gtcttttggg tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac 16380
 aaagaacaaa gaaaaaagac aaaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaaa 16440
 ttagtcaactg gctgatcaag atcgccgcgt ccatgtatgt ctaaagcca tgcaaagcaa 16500
 cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac aaacacattg 16560
 cttttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc gccacctcaa 16620
 tttcttcaact tcaacacacg tcaacctgca tatgctgtgc atcccatgcc caaatctcca 16680
 tgcagtgtcc aaccaccttc tctcttatat aatacctata aatacctcta atatcaactca 16740
 cttctttcat catccatcca tccagagtac tactactcta ctactataat accccaaccc 16800
 aactcatatt caatactact ctaggtaccc tgcagggatc caacaatggc tcccaacatt 16860
 tctgaggatg tcaatggtgt tctttttgag tcagatgagg caaccctga tttggctctt 16920
 tccacaccac ctgtgcaaaa agctgacaac agacccaagc aacttgtgtg gaggaacatt 16980
 ttgcttttcg cttacttgca cctcgcagct ctctacggag gctatttgtt tctcttcagt 17040
 gcaaaatggc agaccgacat tttcgttac attctttatg tcatctctgg actggggata 17100
 actgtgggg cacatagact ctgggctcac aagtcataca aagccaagtg gccactcaga 17160
 gttatactgg tcatcttcaa cacggttgcc tttcaagacg ctgctatgga ttgggctcgt 17220
 gaccatagaa tgcatacaaa gtacagcgag accgacgcgg acccacacaa tgcaacgaga 17280
 ggtttcttct tctctcacaat tggctggctt cttgttagga aacatcctga tctgaaagaa 17340
 aaaggaagg gactcgacat gactgatctc cttgctgac caatactccg ttttcagaag 17400
 aagtactatc tgatcctcat gcctctggcc tgttttgtga tgccaaccgt tatcccgtt 17460
 tacttttggg gagaaacttg gacaaatgct ttcttcgtgg cagccatggt ccgttatgct 17520
 ttcacctga atgttacctg gttggtgaac tctgccgcac acaagtgggg agacaaaccc 17580
 tatgacaagt ccatcaagcc ttccgaaaac ctttcagtig cgatgtttgc tttgggagaa 17640
 ggatttcaca attaccatca cacttttccg tgggactaca agacagcaga gcttgaaac 17700
 aacaagtga acttcacaac aacgttcac aatctcttg cgaatcgg ttgggcctat 17760
 gattgaaga ctgtgagtga tgacattgtc aagaacagg tcaagagaac tggcgatgga 17820
 agccatcacc tctggggctg gggatgatgag aatcagagca aagaagagat agatgcagcc 17880
 attaggatca accctaaaga cgattgagta gtttagctta tcacctagag ctcggtcacc 17940
 tcgagtatca aaatctattt agaaatacac aatattttgt tgcaggcttg ctggagaatc 18000
 gatctgctat cataaaaatt acaaaaaaat tttatttgcc tcaattattt taggattggt 18060
 attaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcac attgtgattg agaagatcag 18120
 cgatacgaaa tattcgtagt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa 18180
 cgttacatga attgatgaaa caatacaaa acagataaa ccacgcacat ttaggatatt 18240
 ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc atgtcttcaa 18300
 ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat atgcaggagc ggatcattca 18360
 ttgtttgtt ggttgccctt gccaacatgg gactccaagg ttggcgcgcc gaccagctt 18420
 tc 18422

ES 2 568 803 T3

<211> 14233
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Plásmido pDAB7326

<400> 63

ttgtacaaag	tggttgcggc	cgcttaatta	aatttaaatt	caattaatgc	aatcttgatt	60
ttcaacaacg	aaggtaatgg	cgtaaaagaa	aaaatgtatg	ttattgtatt	gatctttcat	120
gatgttgaag	cgtgccataa	tatgatgatg	tataattaa	atattaactg	tcgcatttta	180
ttgaaatggc	actgttattt	caaccatatac	tttgattctg	ttacatgaca	cgactgcaag	240
aagtaataa	tagacgccgt	tgtaaagaa	ttgctatcat	atgtgcctaa	ctagagggaa	300
tttgagcgtc	agacctaatc	aaatattaca	aaatatctca	ctctgtcgcc	agcaatgggtg	360
taatcagcgc	agacaaatgg	cgtaaagatc	gcggaaaaac	ctccccgagt	ggcatgatag	420
ctgcctctgt	attgctgatt	tagtcagcct	tatttgactt	aaggggtgcc	tcgttagtga	480
caaattgctt	tcaaggagac	agccatgccc	cacactttgt	tgaaaaaca	attgcctttg	540
gggagacggt	aaagccagtt	gctcttcaat	aaggaatgtc	gaggaggcaa	tgtaaccgcc	600
tctggtagta	cacttctcta	atccaaaaat	caatttgtat	tcaagatacc	gcaaaaaact	660
tatggtttaa	accctgcagg	actagtccag	aaggttaatta	tccaagatgt	agcatcaaga	720
atccaatggt	tacgggaaaa	actatggaag	tattatgtaa	gctcagcaag	aagcagatca	780
atatgcggca	catatgcaac	ctatgttcaa	aaatgaagaa	tgtacagata	caagatccta	840
tactgccaga	atacgaagaa	gaatacgtag	aaattgaaaa	agaagaacca	ggcgaagaaa	900
agaatcttga	agacgtaagc	actgacgaca	acaatgaaaa	gaagaagata	aggtcgggtga	960
ttgtgaaaga	gacatagagg	acacatgtaa	ggtggaaaat	gtaagggcgg	aaagtaacct	1020
tatcacaaag	gaatcttatac	ccccactact	tatcctttta	tatttttccg	tgatcttttt	1080
gcccttgagt	tttctatat	aaggaaccaa	gttcggcatt	tgtgaaaaca	agaaaaaatt	1140
tggtgtaagc	tattttcttt	gaagtactga	ggatacaact	tcagagaaat	ttgtaagttt	1200
gtaggtacca	gatctggatc	ccaaaccatg	tctccggaga	ggagaccagt	tgagattagg	1260
ccagctacag	cagctgatat	ggccgcggtt	tgtgatatcg	ttaaccatta	cattgagacg	1320
tctacagtga	actttaggac	agagccacaa	acaccacaag	agtggattga	tgatctagag	1380
10 aggttgcaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgaggttg	aggggtgtgt	ggctggtatt	1440

ES 2 568 803 T3

gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactgtt 1500
tacgtgtcac atagggcatca aagggtgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtgggtgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
ccatctgtta ggttgcataa ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgagct 1680
ggatacaagc atgggtgatg gcatgatggt ggTTTTTggc aaagggattt tgagttgcca 1740
gctcctccaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatccccggg ttgatcctat ctgtgttgaa 1860
atagttgctg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg 1920
aggtgggcta tggctctcag ttcttctggt aagcgttgg tctaagggtgc agaggtgtta 1980
gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt 2040
aaagtatgta ttcactacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat 2100
gtctttattg tcgccgtatg taatcggcgt cacaaaataa tccccgggta ctttctttta 2160
atccaggatg aaataatag ttattataat ttttgcgatt tgggccgta taggaattga 2220
agtgtgcttg aggtcggctg ccaccactcc catttcataa ttttcatgt atttgaaaaa 2280
taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaga 2340
aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa 2400
cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct 2460
ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
tttaaacgat ctgctgctaa ttttcggctc aacttgaca ggaaagacgt cgaccgctg 2580
agctcttgcc cagcagactg ggctccagc cctttcgtc gatcgggtcc aatgttgctc 2640
tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
ataccttgat gatcggcctc tgggaaggg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgcggtt ttcgttggca 2880
tattattcgc cagcagttag cagacgaaga gaccttcag aacgtggcca aggccagagt 2940
taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg 3000
gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt 3060
gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga 3120
ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggtcatc cattcggaat 3240
gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtctcat ttgaataaga tgttagcaat 3300
tgTTTTtagc tttgtctgtg tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
caaatTTTat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa 3480

ES 2 568 803 T3

cataagtttt atgaatgttc ttccatthttc gtcacgaaac gaataagagt aaatacacct 3540
 tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcga tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgcgtgtcg aggaattctg 3960
 atctgcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgtcg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggctg ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttcgcgccg aggggcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggttagcg gtgcccgaaa aacgggcgga aacccttga aatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgag cccctcatct gtcagcactc tgccccctca 4860
 gtgtcaagga tcgccccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgcgat ttgagaggct ggccagctcc acgtcgcgg ccgaaatcga gcctgcccc 5040
 catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccc cgggtgtctg 5160
 cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
 cgggcaggat aggtgaagta ggcccaccg cgagcgggtg ttcttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgag aggctggccc gctaccgccc 5520

ES 2 568 803 T3

gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaacaccagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggttac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggccgcc 5760
 tgggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgaccgcg cacggcgcg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca 5880
 tgatgggcgt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgctcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 ggggtcaaactc aggaataaagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgac gcccccgcga 6300
 acctccagc ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacgcggcg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggctag cgaggccaag 6540
 caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttgctc 6600
 gatattgctc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
 ctgttaccac cgcgcaacaa gaaaatcccc cgcgaggcgc tgcaaaacaa ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcga ccctatcgg cgagccgatc 6840
 accttcagc tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcggac ggcccgcagg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttccgc 7200
 ctcatgtgct gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgt 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
 tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560

ES 2 568 803 T3

gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
aaaagcccat ggagggcgtt gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc ggcgccata 7680
tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
acaagggcga tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggc 7800
gtatgctgct gcggggcgtt ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatat tgcctattct 7920
ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcggcg acggtaggcg 7980
ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctc gctaggtagc ccgatacgat 8040
tgatggcggg cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctggtg gtggtgacac 8100
caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggggc gtttccatgg 8160
cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
cctggcaact ggcgccggga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt tttgatccgc 8280
caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag 8340
cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttggtt 8400
ccttactggg ttttctcagc ccccagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggctt 8520
aattcaggag ttaaacaatca tgagggagc ggtgatcgc gaagtatcga ctcaactatc 8580
agaggtagtt ggcgtcatcg agcgcctatc cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta 8640
cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt 8700
gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgacctt tggaaacttc 8760
ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
cgacatcatt ccgtggcgtt atccagctaa gcgcgaaactg caatttggag aatggcagcg 8880
caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt 8940
gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt 9000
tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa 9060
ctcgcgccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga 9180
gcgcctgccg gccagatc agccgctcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca 9240
agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300
cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
cgcgccgcg cttactcaa gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttga 9420
ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttgatcca ttccattcc gcgctcaaga 9480
tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
gggctgcact ccaacagaaa caatcaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600

ES 2 568 803 T3

caaattacaa cggatatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccgaa 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccgggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 aatataatagtt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattatft 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaatft ttactaacac 10320
 atatatftac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatata aaaccgaacc aactcggctc atttgcacc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatattctgg aaattttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtgggtgtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaatacga atgacttgg acaaaagaaa 10800
 gtgatataft ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaata aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgcc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gggccgctt tcctgcatga catcgtctg cagagccaag cgcagctta attaaactag 11100
 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctgc cggtggtttt ttacctctat 11160
 ttaaagggtt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg cttccgcaca cgatattcct acaaatttat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaacat tttcatattg aaatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata aacaaattct 11460
 ttactttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaaata tatttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgacaca actagccatt ttttctttg 11640

ES 2 568 803 T3

aataaaaaaa tccaattatc attgtatfff tttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
gatttggtgtg atttctgaag caagtcattgt tatgcaaaa tctataattc ccatttgaca 11760
ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgagagaca catcttctaa agtaatttta 11820
ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaaact caatattact tctaaaaaat 11880
taattagata taattaaaat attactffff taattttaag tttattgtt gaatttgatga 11940
ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagttaa agtaaatata 12000
agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatgggtg 12060
actaatfff atatatfff tattgctfff acctfffctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
gaattactgt gggttgcat gacactctgt ggtctfffgg ttcattgatg gatcttgccg 12180
aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaga caaaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgag tccatgtatg tctaaatgcc 12300
atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggct caccatctc aaccacaca 12360
caaacacatt gcctfffctt tcatctcac cacaaccacc tgtatatatt cattctctc 12420
cgccacctca atttctcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgctgt catcccatgc 12480
ccaaatctcc atgcatgtc caaccactt ctctcttata taatactat aaatactct 12540
aatatcactc acttcttca tcatccatcc atccagagta ctactactc actactataa 12600
taccacaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgagggat ccaacaatgg 12660
ctcccaacat ttctgaggat gtcaatgggt ttctfffga gtcagatgag gcaaccctg 12720
atftgctct tccacacca cctgtgcaa aagctgaca cagaccaag caactgtgt 12780
ggaggaacat tttgctfff gctacttgc acctcgagc tctctacgga ggctatttgt 12840
ttctctcag tgcaaatgg cagaccgaca tttctgctta cattcttctat gtcattctg 12900
gactggggat aactgctgg gcacatagac tctgggctca caagtcatac aaagccaagt 12960
ggccactcag agttatactg gtcattctca acacgggtgc cttcaagac gctgctatgg 13020
attgggctc tgaccataga atgcatcaca agtacagca gaccgacgag gaccacaca 13080
atgcaacgag aggttctct tctctcaca ttggctggct tctgttagg aaacatctg 13140
atctgaaaga aaaaggaag ggactcgaca tgagtgatct cctgctgat ccaatactc 13200
gtttctcaga gaagtactat ctgatcctca tgcctctggc ctgtttgtg atgccaaccg 13260
ttatcccgtt ttactttgg ggagaaactt ggacaaatgc tttctctgag gcagccatgt 13320
tccgttatgc tttcatctg aatgttacct ggttggtgaa ctctgccga cacaagtgg 13380
gagacaaacc ctatgacaag tccatcaagc cttccgaaa ctttctagtt gcgatgtttg 13440
ctttgggaga aggattctac aattaccatc acactttcc gtgggactac aagacagcag 13500
agcttggaag caacaagtg aactcaca caacgttcat caattcttt gcgaaaatc 13560
gttggccta tgatttgaag actgtgagtg atgacattgt caagaacag gtcaagagaa 13620
ctggcgatg aagccatcat ctctggggct ggggtgatga gaatcagagc aaagaagaga 13680

ES 2 568 803 T3

tagatgcagc cattaggatc aaccctaaag acgattgagt agtttagctta atcacctaga 13740
gctcgggtcac ctcgagtatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg ttgcaggcctt 13800
gctggagaat cgatctgcta tcataaaaat tacaaaaaaa ttttatttgc ctcaattatt 13860
ttaggattgg tattaaggac gcttaaatta tttgtcgggt cactacgcat cattgtgatt 13920
gagaagatca gcgatacgaa atattcgtag tactatcgat aatttatttg aaaattcata 13980
agaaaagcaa acgttacatg aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa gccacgcaca 14040
tttaggatat tggccgagat tactgaatat tgagtaagat cacggaattt ctgacaggag 14100
catgtcttca attcagccca aatggcagtt gaaatactca aaccgccccca tatgcaggag 14160
cggatcattc attgtttgtt tggttgcctt tgccaacatg ggagtccaag gttggcgcgc 14220
cgaccagct ttc 14233

<210> 64
<211> 14575
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Plásmido pDAB7328

<400> 64

ttgtacaaag tggttgctgc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180
ttgaaatggc actgttattt caaccatatac tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
aagtaataa tagacgccgt tgttaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctgaggggaa 300
tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg 360
taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcatgatag 420
ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaca attgcctttg 540
gggagacggg aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggccaagaaa 900
agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga 960
ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 1020
tatcacaag gaatcttata cccactact tatcctttta ttttttccg tgtcattttt 1080
gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt 1140

ES 2 568 803 T3

tgggtgaagc tattttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt 1200
 gtaggtacca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg 1260
 ccagctacag cagctgatat ggccgcgggt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg 1320
 tctacagtga acttttaggac agagccacaa acaccacaa agtggattga tgatctagag 1380
 aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgtgt ggctggtatt 1440
 gcttacgctg ggccttgaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactggt 1500
 tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
 aagctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtgggtgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
 ccatctgta ggttgcata ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgagct 1680
 ggatacaagc atgggtgatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca 1740
 gctcctcaa ggcagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
 agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgtttaa 1860
 atagttgcg tgggcaaggc tctcttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggt 1920
 aggtgggcta tggctctcag ttccttgtgg aagcgcttg tctaagggtc agaggtgta 1980
 gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt 2040
 aaagtatgta ttcactacta atataatcag tgtattcaa tatgtactac gatttccaat 2100
 gtccttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggta ctttcttta 2160
 atccaggatg aaataatag ttattataat ttttgcgatt tggccgta taggaattga 2220
 agtgtgcttg aggtcggctg ccaccactcc catttcataa ttttcatgt atttgaaaaa 2280
 taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttcta aagaatgata tcttgaaga 2340
 aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa 2400
 cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct 2460
 ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
 tttaaacgat ctgctctaa ttttcggctc aacttgaca ggaaagacgt cgaccgctg 2580
 agctcttgcc cagcagactg ggctccagc cctttcgctc gatcgggtcc aatggtgtcc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtgaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tgggaaggg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
 gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgcggatt ttcggttgca 2880
 tattattcgc cagcagttag cagacgaaga gaccttcag aacgtggcca aggccagagt 2940
 taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgcatggt 3060
 gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga 3120
 ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180

ES 2 568 803 T3

gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggatcattc cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat 3300
 tgttttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
 aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa 3480
 cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaaac gaataagagt aaatacacct 3540
 tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgcg tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgcgtgtcg aggaattctg 3960
 atctgcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgtcg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgtgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggtaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgcgagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtc ccatTTTTGG 4560
 ggtgaggccg ttcgcggccg aggggcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcgg cgtgcgaggc cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaga 4740
 caggttagcg gtggccgaaa aacggcgga aacccttgca atgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccccaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttgccgat ttgcgaggct ggcagctcc acgtcgcgg ccgaaatcga gcctgccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcgccc cggtgtctcg 5160
 cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220

ES 2 568 803 T3

cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggctg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aacctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
 cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccg 5520
 gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gcccaaccagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggccgcc 5760
 tggcgccct gctgaaactc tggctcaccg acgaccgcg cacggcgcg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggtca 5880
 tgatggcgct ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggcacaatc aggaataagg gcacattgcc cggcgctgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgac gcccccgaa 6300
 acctccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcgccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
 ctgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag 6540
 caggccgctg tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct ttccttgctc 6600
 gatattgctc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
 ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcga ccctatcgg cgagccgatc 6840
 acctcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcggac ggcccgacgg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttccgc 7200
 ctcatgtgct gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260

ES 2 568 803 T3

tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggccaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgct 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
 tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560
 gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
 aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc ggcgctaca 7680
 tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
 acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggcg 7800
 gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
 caacgggaat ctggtgtagt cgcatcttca tcctcggcgc acttaatatc tcgctattct 7920
 ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcggggcg acggtaggag 7980
 ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtagc ccgatacgat 8040
 tgatggcggg cctgggggct atttgcggaa ctgcccggct ggcgctggtg gtgttgacac 8100
 caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtc cagcgggcct ggcggggggc gtttccatgg 8160
 cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
 cctggcaact ggccggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagt tttgatccgc 8280
 caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag 8340
 cgggtttaac ctacttccct tggttccggg ggatctcggc actcgaacct acagtgttt 8400
 ccttactggg ctttctcagc ccccagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
 gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggtt 8520
 aattcaggag taaacatca tgaggaagc ggtgatcgcc gaagtatcga ctcaactatc 8580
 agaggtagtt ggcgtcatcg agcggcatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttcta 8640
 cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt 8700
 gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgacctt tggaaacttc 8760
 ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
 cgacatcatt ccgtggcgtt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg 8880
 caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt 8940
 gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt 9000
 tgatccgggt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa 9060
 ctcgccccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
 gtacagcgca gtaaccgca aaatcgccg gaaggatgct gctgccgact gggcaatgga 9180
 gcgcctgccg gccagatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttgaca 9240
 agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300

ES 2 568 803 T3

cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
 cgcggcgcgg cttaaactcaa gcgtagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttcccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatataat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccgaa 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccgggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaacaaa ccaaaatata 9840
 aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
 atatatattc ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggtcc atttgcacc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa ttttttaaa aaaatacgca atgacttga acaaaagaaa 10800
 gtgatataat ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttccttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttgac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgcc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcggccgctt tcctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcagctta attaaactag 11100
 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctctat 11160
 ttaaaggggt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg cttccgcaca cgatatccct acaaatat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340

ES 2 568 803 T3

agtctaacat tttcatattg aaatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata aacaaattct 11460
 ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaaata tatttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgcacaca actagccatt tttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
 gatttggttg atttctgaag caagtcattg tatgcaaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
 ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
 ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
 taattagata taattaaaat attacttttt taattttaag tttattggtt gaatttggtga 11940
 ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagttaa agtaaatata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtggtacc ctaaaccata aactataaga tttatggttg 12060
 actaattttc atatatttct tattgctttt accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcattgatg gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
 atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggt caccatctc aaccacaca 12360
 caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
 cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgcgtgt catcccatgc 12480
 ccaaactctc atgcatgttc caaccacctt ctctcttata taataacctat aaataacctt 12540
 aatatactc acttctttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
 taccccaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgcagggat ccaacaatgt 12660
 ctgctccaac cgctgacatc agggctaggg ctccagaggc taagaagggt cacatcgctg 12720
 ataccgctat caacaggcac aattggtaca agcacgtgaa ctggctcaac gtcttcctca 12780
 tcatcggaat cccactctac ggatgcattc aagctttctg ggttccactt caactcaaga 12840
 ccgctatctg ggctgtgatc tactacttct tcaccggact tggaatcacc gctggatacc 12900
 acaggctttg ggctcactgc tcatactctg ctactcttcc acttaggatc tggcttgctg 12960
 ctgttgagg aggagctggt gagggatcta tcagatggtg ggctagggat cacagggtc 13020
 atcataggta caccgatacc gacaaggacc cataactctg taggaaggga cttctctact 13080
 ctcaccttg atggatggtg atgaagcaga acccaaagag gatcggaagg accgacatct 13140
 ctgatctcaa cgaggacca gttgttgttt ggcaacacag gaactacctc aaggttgtgt 13200
 tcaccatggg acttgctggt ccaatgcttg ttgctggact tggatgggga gattggcttg 13260
 gaggattcgt gtacgctgga atccttagga tcttcttctg tcaacaagct accttctg 13320
 tgaactctct tgctcactgg cttggagatc aaccattcga tgataggaac tctcctagg 13380

ES 2 568 803 T3

atcacgtgat caccgctctt gttacccttg gagaggata ccacaacttc caccacgagt 13440
 tcccatctga ctacaggaac gctatcgagt ggcaccagta cgatectacc aagtggctta 13500
 tctgggcttg gaagcaactt ggattggctt acgatctcaa gaagttcagg gctaacgaga 13560
 tcgagaaggg aagggttcaa caacttcaga agaagcttga taggaagagg gctactcttg 13620
 attggggaac cccacttgat caacttcag tgatggaatg ggatgactac gttgagcaag 13680
 ctaagaacgg aaggggactt gttgctatcg ctggagttgt tcacgatggt accgacttca 13740
 tcaaggatca cccaggagga aaggctatga tctcttctgg aatcggaaag gatgctaccg 13800
 ctatgttcaa cggaggagtg tactaccact ctaacgcagc tcacaacctt cttagcacca 13860
 tgagggtggg agtgatcagg ggaggatgcg aggttgagat ctggaagagg gctcagaagg 13920
 agaacgttga gtacgttagg gatggatctg gacaaagggg gatcagggct ggagagcaac 13980
 caaccaagat cccagagcca atcccaaccg ctgatgctgc ttgagtagtt agcttaatca 14040
 cctaggtcac cagtatgaac taaaatgcat gtaggtgtaa gagctcggtc acctcgagta 14100
 tcaaaatcta tttagaaata cacaatattt tgttgaggc ttgctggaga atcgatctgc 14160
 tatcataaaa attacaaaa aattttattt gcctcaatta ttttaggatt ggtattaagg 14220
 acgcttaaat tatttgtcgg gtcactacgc atcattgtga ttgagaagat cagcgatacg 14280
 aatatctcgt agtactatcg ataatttatt tgaaaattca taagaaaagc aaacgttaca 14340
 tgaattgatg aaacaatata aagacagata aagccacgca catttaggat attggccgag 14400
 attactgaat attgagtaag atcacggaat ttctgacagg agcatgtctt caattcagcc 14460
 caaatggcag ttgaaatact caaaccgcc catatgcagg agcggatcat tcattgtttg 14520
 tttggttgcc tttgccaaca tgggagtcca aggttggcgc gccgaccag ctttc 14575

<210> 65
 <211> 14602
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7330

10

<400> 65
 ttgtacaaag tggttgaggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180
 ttgaaatggc actgttattt caaccatata tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
 aagtaaataa tagacgccgt tgtaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa 300
 tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatgggtg 360
 taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcgaaaaaac ctccccgagt ggcatgatag 420
 ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
 caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaacaa attgcctttg 540

ES 2 568 803 T3

gggagacggt aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
 tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
 tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
 atccaatgtt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
 atatgcgga catatgcaac ctatgttcaa aatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
 tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa 900
 agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga 960
 ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 1020
 taccacaaag gaatcttata cccactact taccctttta ttttttccg tgtcattttt 1080
 gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt 1140
 tgggtgaagc tttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt 1200
 gtaggtacca gatctggatc ccaaacatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg 1260
 ccagctacag cagctgatat ggcccggtt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg 1320
 tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag 1380
 aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggtt aggggtgtt ggctggtatt 1440
 gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gactactggt 1500
 tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
 aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
 ccatctgtta ggttgcatga ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgagct 1680
 ggatacaagc atggtgatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca 1740
 gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
 agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa 1860
 atagttgctg tgggcaaggc tctcttccag aaagacaggc ggccaaagga acccaaggty 1920
 aggtgggcta tggctctcag ttccttgctg aagcgcttg tctaagggtgc agaggtgtta 1980
 gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt 2040
 aaagtatgta ttcactacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat 2100
 gtccttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccgggta ctttctttta 2160
 atccaggatg aaataatag ttattataat ttttgcgatt tggccgta taggaattga 2220
 agtgtgcttg aggtcggctc ccaccactcc catttcataa ttttcatgt atttgaaaaa 2280
 taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga 2340
 aatatagttt aaatatttat tgataaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa 2400
 cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatacagct 2460
 ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
 tttaaacgat ctgctgctaa ttttcggctc aacttgcaaa ggaaagacgt cgaccgctg 2580

ES 2 568 803 T3

agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgctc gatcgggtcc aatgttgtcc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaaaga ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tggatgaagg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
 gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgcggtt ttcgttggca 2880
 tattattcgc cacgagttag cagacgaaga gaccttcatt aacgtggcca aggccagagt 2940
 taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt 3060
 gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga 3120
 ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
 gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggatcatt cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat 3300
 tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
 aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa 3480
 cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaac gaataagagt aaatacacct 3540
 ttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcaactga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgattttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgacg tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgtcg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat tttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgtgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggtaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgggaa cgaccaagca agcttggtc ccatTTTTGG 4560
 ggtgaggccg ttcgcccggc aggggcgcag cccctggggg gatgggaggc ccgcttagc 4620

ES 2 568 803 T3

gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcgg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgcaaatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgccccca 4860
 gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat cccaggtt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgccgat ttgagggct ggcagctcc acgtcgccgg cggaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgccg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctcg 5160
 cacacggcct cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aacctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgcaaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
 cgggcaggat aggtgaagta ggcccaccg cgagcgggtg ttccttctc actgtccctt 5460
 attcgacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggtggccg gctaccgccg 5520
 gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaccagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc ctccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tggcgccct gctgaaactc tggctcaccg acgaccgcg cacggcgcgg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggta 5880
 tgatggcgtt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggc caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggcaaatc aggaataaag gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 ggggtgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 tttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgctc gccccgcgaa 6300
 acctccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcgccg ccgtggagcg ttcgctcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag 6540
 caggccgct tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct ttcctgttc 6600
 gatattgctc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaaa acgacacggc ccgctctgcc 6660

ES 2 568 803 T3

ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg cgagccgatc 6840
 accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtc ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcggac ggcccgacgg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttccgc 7200
 ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggtcaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtgggttca gttccggctg ggggttcagc agccagcgt 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
 tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560
 gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
 aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc gggcctaca 7680
 tcgacggcga gatcattggg ctgtcgttct tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
 acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggc 7800
 gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
 caacgggaat ctggtgatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatatt tcgctattct 7920
 ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg acggtaggcg 7980
 ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctc gctaggtagc ccgatacgat 8040
 tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctggtg gtgttgacac 8100
 caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtc cagcgggcct ggcggggcg gtttccatgg 8160
 cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
 cctggcaact ggccggccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagtg tttgatccgc 8280
 caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtygctcggc ctgatcggag 8340
 cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgtt 8400
 ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
 gggagcacag gatgacgcct acaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggctt 8520
 aattcaggag ttaaacaatca tgagggaagc ggtgatcgc gaagtatcga ctcaactatc 8580
 agaggtagtt ggcgtcatcg agcgcctct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta 8640
 cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt 8700

ES 2 568 803 T3

gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc 8760
ggcttcccc ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
cgacatcatt ccgtggcggtt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg 8880
caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgacgac gacattgatc tggctatctt 8940
gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt 9000
tgatccgggtt cctgaacagc atctatctga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa 9060
ctcgcggccc gactgggctg gcgatgagcg aatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgac gctgccgact gggcaatgga 9180
gcgcctgccg gccagatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttgaca 9240
agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300
cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
cgcggcgcgg cttaaactca gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca tccccattcc gcgctcaaga 9480
tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
gggctgcact ccaacagaaa caatcaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacagc caaattcgct cttagccgta 9720
caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatggc gcgattaaa aatctcaatt 9780
atatttggc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
aatatatagt ttttatatat atgccttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
ttttattaac ttaataaat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
cgtcaatctc tttgttctc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt 10140
aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttg ttaactttga aagtgtacat 10200
caacgaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
gtttggttg attttgatat aaaccgaacc aactcggctc atttgcacc ctaatcataa 10500
tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgc aatatcctgg aaattttgca 10560
aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtgggtgtaa 10620
tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740

ES 2 568 803 T3

gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca atgacttggg acaaaaagaaa 10800
 gtgatataatt ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcgccgctt tcctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcatgctta attaaactag 11100
 tctccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctctat 11160
 ttaaagggtt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg cttccgcaca cgatatccct acaaatttat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaacat tttcatattg aaatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata aacaaattct 11460
 ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaaata tttttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgcaca actagccatt tttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatfff ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
 gatttggtgt atttctgaag caagtcatgt tatgcaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
 ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
 ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
 taattagata taattaaat attacttttt taattttaag ttttaattgt gaatttgatga 11940
 ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagttaa agtaaataata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatggtgg 12060
 actaattttc atatatctt tattgctttt accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcatgcatg gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
 atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggct cacccatctc aaccacaca 12360
 caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
 cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgcgtgt catcccatgc 12480
 ccaaatctcc atgcatgttc caaccactt ctctcttata taatacctat aaatacctct 12540
 aatatcactc acttctttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
 taccccaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgcagggat ccaacaatgg 12660
 ccagcagttc ttcaagtgtg ccagaacttg ccgcagcttt ccctgatggg acaacggact 12720
 tcaaacccat gaggaacacc aaaggctatg atgtctccaa acctcacatc tctgaaacac 12780

ES 2 568 803 T3

cgatgacttt gaagaactgg cacaaacatg tgaactggct caacaccaca ttcattctct 12840
 ttgttccact ggctggggtg atctcaacct attgggttcc tcttcaatgg aaaactgcag 12900
 tgtgggcagt tgtgtactac ttcaacactg gacttgggat cactgctggc taccatagat 12960
 tgtgggcaca ttctcttac aaggccagct tgccctcaa aatctacctt gccgcagttg 13020
 gtgctggagc cgttgaaggt tccataagat ggtggagcaa cggacacaga gcacatcaca 13080
 gatacacaga cacagagaaa gatccttact cagtgaggaa gggattgctc tacagccaca 13140
 tgggttggat gctcttgaag cagaatccaa agaagcaagg gaggacggac attactgatc 13200
 tgaatgagga cccagttgtg gtctggcaac ataggaactt tctcaagtgt gtgatcttca 13260
 tggctttggt ctttcccacc cttgttctg gcctgggatg ggggagctac tggggagggt 13320
 tcatctatgg agggatcttg agagtgttct ttgttcagca agccaccttc tgtgtcaact 13380
 cacttgacaca ttggcttggg gatcaaccgt ttgatgacag aaactctcca cgtgaccatg 13440
 tcataactgc tcttgtcacg ctgggtgaag gctatcacia ctttcaccat gagtttccgt 13500
 cagactatag aaatgcgatt gagtggatc agtatgacct cacgaagtgg agcatttggg 13560
 tttggaagca acttggactt gctcacaatc tcaagcagtt cagacagaat gagatagaga 13620
 agggaagggg tcaacagttg cagaagaaac tggatcagaa gagagcgaaa cttgattggg 13680
 gaataccggt ggaacaactc cctgttgtgt cttgggatga ctttgttgaa cagtcaaaga 13740
 atggcaaggc atggattgct gttgctggtg tcattcacga tgttgggtgac ttcacaaagg 13800
 atcatcctgg tggacgtgct ctcatcaact ctgcgattgg caaagatgcc acagcgatct 13860
 tcaatggagg tgtctacaat cattcaaatg ccgcacacia ctttctctcc accatgaggg 13920
 ttggtgtcct ccgtggaggg tgcgaagtgg agatatggaa acgtgctcaa agtgagaaca 13980
 aagatgtctc tactgtgggt gatagtctg gcaaccgtat tgtgagagct ggtggacaag 14040
 ctaccaaagt ggttcagcca gtccctggtg ctcaagcagc ttgatgagta gttagcttaa 14100
 tcacctagag ctcggtcacc tcgagtatca aaatctattt agaaatacac aatattttgt 14160
 tgcaggcttg ctggagaatc gatctgctat cataaaaatt acaaaaaaat tttatttggc 14220
 tcaattattt taggattggt attaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcatc 14280
 attgtgattg agaagatcag cgatacgaat tattcgtagt actatcgata atttatttga 14340
 aaattcataa gaaaagcaaa cgttacatga attgatgaaa caatacaaag acagataaag 14400
 ccacgcacat ttaggatatt ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc 14460
 tgacaggagc atgtcttcaa ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat 14520
 atgcaggagc ggatcattca ttgtttgtt ggttgccttt gccaacatgg gagtccaagg 14580
 ttggcgcgcc gacccagctt tc 14602

<210> 66
 <211> 10915
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Plásmido pDAB7331

10

<400> 66

ES 2 568 803 T3

taaatttaaa ttcaattaat gcaatcttga ttttcaacaa cgaaggtaat ggcgtaaaag 60
 aaaaaatgta tgttattgta ttgatctttc atgatggtga agcgtgccat aatatgatga 120
 tgtataatta aaatattaac tgtcgcattt tattgaaatg gcaactgttat ttcaaccata 180
 tctttgattc tgttacatga cacgactgca agaagtaa atagacgcc gttgttaaag 240
 aattgctatc atatgtgcct aactagaggg aatttgagcg tcagacctaa tcaaatatta 300
 caaaatatct cactctgtcg ccagcaatgg tgtaatcagc gcagacaaat ggcgtaaaga 360
 tcgcgaaaaa acctccccga gtggcatgat agctgcctct gtattgctga tttagtcagc 420
 cttatttgac ttaaggggtgc cctcgttagt gacaaattgc tttcaaggag acagccatgc 480
 cccacacttt gttgaaaaac aaattgcctt tggggagacg gtaaagccag ttgctcttca 540
 ataaggaatg tcgaggaggc aatgtaaccg cctctggtag tacacttctc taatccaaaa 600
 atcaatttgt attcaagata ccgcaaaaaa cttatggttt aaaccctgca ggactagtcc 660
 agaaggaat tatccaagat gtagcatcaa gaatccaatg tttacgggaa aactatgga 720
 agtattatgt aagctcagca agaagcagat caatatgcgg cacatatgca acctatgttc 780
 aaaaatgaag aatgtacaga tacaagatcc tatactgcca gaatacgaag aagaatacgt 840
 agaaattgaa aaagaagaac caggcgaaga aaagaatctt gaagacgtaa gcaactgacga 900
 caacaatgaa aagaagaaga taaggctcggg gattgtgaaa gagacataga ggacacatgt 960
 aagggtgaaa atgtaagggc ggaaagtaac cttatcacia aggaatctta tccccacta 1020
 cttatccttt tatatctttc cgtgtcattt ttgcccttga gttttcctat ataaggaacc 1080
 aagttcggca tttgtgaaaa caagaaaaaa tttgggtgaa gctatcttct ttgaagtact 1140
 gaggatacaa cttcagagaa atttgtaagt ttgtaggtac cagatctgga tcccaaacca 1200
 tgtctccgga gaggagacca gttgagatta ggccagctac agcagctgat atggccgagg 1260
 tttgtgatat cgtaaccat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg acagagccac 1320
 aaacaccaca agagtggtt gatgatctag agaggttgca agatagatac cttggttgg 1380
 ttgctgaggt tgaggggtgt gtggctggta ttgcttacgc tgggccctgg aaggctagga 1440
 acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttacgtgtc acataggcat caaaggttgg 1500
 gcctaggatc tacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcgcaa ggttttaagt 1560
 ctgtggttgc tgttataggc cttccaaacg atccatctgt taggttgcat gaggctttgg 1620
 gatacacagc ccggggtaca ttgcgcgag ctggatacaa gcatggtgga tggcatgatg 1680
 ttggtttttg gcaaagggat tttgagttgc cagctcctcc aaggccagtt aggccagtta 1740
 cccaaatctg agtagttagc ttaatcacct agagctcgat cggcggcaat agcttcttag 1800
 cgccatcccg ggttgatcct atctgtgttg aaatagttgc ggtgggcaag gctctctttc 1860
 agaaagacag gcggccaaag gaaccaagg tgaggtgggc tatggctctc agttccttgt 1920

ES 2 568 803 T3

ggaagcgctt ggtctaaggt gcagagggtg tagcgggatg aagcaaaagt gtccgattgt 1980
 aacaagatat gttgatccta cgtaaggata ttaaagtatg tattcatcac taatataatc 2040
 agtgtattcc aatatgtact acgatttcca atgtctttat tgtcgccgta tgtaatcggc 2100
 gtcacaaaat aatccccggt gactttcttt taatccagga tgaataata tgttattata 2160
 atttttgcga tttgggtccg tataggaatt gaagtgtgct tgaggctcgg cgccaccact 2220
 cccatttcat aattttacat gtatttgaaa aataaaaatt tatggatttc aatttaaaca 2280
 cgtatacttg taaagaatga tatcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa 2340
 taacaagtca ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt 2400
 cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag 2460
 tgcgatatta tgggtgtaata cataggaatt cgtttaaacg atctgctctt aattttcggg 2520
 ccaacttgca caggaaagac gtcgaccgcg gtagctcttg cccagcagac tgggcttcca 2580
 gtcctttcgc tcgatcgggt ccaatgttgt cctcagctgt gaaccggaag cggacgacca 2640
 acagtggaag aactgaaagg aacgagccgt ctataccttg atgatcggcc tctggtggaag 2700
 ggtatcatcg cagccaagca agctcatgaa aggctgatgg gggagggtga taattatgag 2760
 gccacggcgg ggtttattct ttagggagga tctatctcgt tgctcaagtg catggcgcaa 2820
 agcagttatt ggagtgcgga ttttcgttgg catattattc gccacgagtt agcagacgaa 2880
 gagaccttca tgaacgtggc caaggccaga gttaagcaga tgttacgccc tgctgcaggc 2940
 ctttctatta tccaatagtt ggttgatcct tggaaagagc ctcggctgag gcccatactg 3000
 aaagagatcg atggatatcg atatgccatg ttgtttgcta gccagaacca gatcacatcc 3060
 gatatgctat tgcagcttga cgagatatg gaggataagt tgattcatgg gatcgctcag 3120
 gagtagctca tccatgcacg ccgacaagaa cagaaattcc gtcgagttaa cgcagccgct 3180
 tacgacggat tcgaaggcca tccattcggg atgtattagt ttgcaccagc tccgcgtcac 3240
 acctgtcttc atttgaataa gatgttagca attgttttta gctttgtctt gttgtggcag 3300
 ggcggcaagt gcttcagaca tcattctggt ttcaaatatt atgctggaga acagcttctt 3360
 aattcctttg gaaataatag actgcgtctt aaaattcaga tgcttgata tagatatgat 3420
 tgtaaaataa cctatttaag tgcatttag aacataagtt ttatgaatgt tcttccattt 3480
 tcgtcatcga acgaataaga gtaatacac ctttttaac attacaaata agttcttata 3540
 cgttgtttat acaccgggaa tcatttccat tttttcgcg caaaagtcac ggatattcgt 3600
 gaaagcgaca taaactgcga aatttgccc gagtgccttg agttgcctc gaggctagcg 3660
 catgcacata gacacacaca tcatctcatt gatgcttggg aataattgtc attagattgt 3720
 ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aattttagac aagtatcaa cggatgtgac 3780
 ttcagtacat taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgattt 3840
 acaattgaa atatcctgcc ccagccagcc aacagctcga tttacaattg aatatacct 3900
 gccggccggc ccacgcgtgt cgaggaattc tgatctggcc cccatttga cgtgaatgta 3960

ES 2 568 803 T3

gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt cgcctataaa 4020
tacgacggat cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata ataacgctgc 4080
ggacatctac atttttgaaat tgaaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt ttctccatat 4140
tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt 4200
gaatataatcc tgccgcccgt gccgctttgc acccggtgga gcttgcattg tggtttctac 4260
gcagaactga gccggtttag cagataatth ccattgagaa ctgagccatg tgcaccttcc 4320
ccccaacacg gtgagcgcg gggcaacgga gtgatccaca tgggactttt aaacatcatc 4380
cgtcggatgg cgttgcgaga gaagcagtcg atccgtgaga tcagccgacg caccgggcag 4440
gcgcgcaaca cgatcgcaaa gtatttgaac gcaggtaaaa tcgagccgac gttcacgcgg 4500
aacgaccaag caagcttggc tgccattttt ggggtgaggc cgttcgcggc cgagggggcg 4560
agcccctggg gggatgggag gcccgcgtaa gcgggccggg agggttcgag aagggggggc 4620
accccccttc ggcgtgcgcg gtcacgcgca cagggcgag ccctgggtaa aaacaagggt 4680
tataaatatt ggtttaaaag caggtaaaaa gacaggtagg cggtgggcga aaaacgggag 4740
gaaacccttg caaatgctgg attttctgcc tgtggacagc ccctcaaag tcaataggtg 4800
cgcccctcat ctgtcagcac tctgccctc aagtgtcaag gatcgcgccc ctcatctgtc 4860
agtagtcgcg cccctcaagt gtcaataacc cagggcactt atccccaggc ttgtccacat 4920
catctgtggg aaactcgcgt aaaaacaggc gttttcgccg atttgcgagg ctggccagct 4980
ccacgtcgcc ggccgaaatc gagcctgcc ctcatctgtc aacgccgagc cgggtgagtc 5040
ggcccctcaa gtgtcaacgt ccgcccctca tctgtcagtg agggccaagt tttccgagc 5100
gtatccacaa gcgccggcgc cgcggtgtct cgcacacggc ttcgacggcg tttctggcgc 5160
gtttgcaggg ccatagacgg ccgccagccc agcggcgagg gcaaccagcc cggtgagcgt 5220
cggaaagggg cgacggatct tttccgctgc ataaccctgc ttcgggggta ttatagcgat 5280
tttttcggta tatccatcct ttttcgcagc atatacagga ttttgccaaa ggggttcgtg 5340
agactttcct tgggtgatcc aacggcgta gccgggcagg ataggtgaag taggcccacc 5400
cgcgagcggg tgttccttct tctactgtcc ttattcgcac ctggcgggtc tcaacgggaa 5460
tcctgctctg cgaggctggc cggctaccgc cggcgttaaca gatgagggca agcggatggc 5520
tgatgaaacc aagccaacca ggaagggcag cccacctatc aagggtgact gccttccaga 5580
cgaacgaaga gcgattgagg aaaaggcggc ggcggccggc atgagcctgt cggcctacct 5640
gctggccgct gccagggct acaaaatcac gggcgtcgtg gactatgagc acgtccgca 5700
gctggcccgc atcaatggcg acctgggccc cctgggcggc ctgctgaaac tctggctcac 5760
cgacgacccg cgcacggcgc ggttcgggta tgccacgac ctgcacctgc tggcgaagat 5820
cgaagagaag caggacgagc ttggcaagg catgatggc gtggtccgcc cgagggcaga 5880
gccatgactt ttttagccgc taaaacggc ggggggtgcg cgtgattgcc aagcacgtcc 5940
ccatgcgctc catcaagaag agcgacttcg cggagctggg attcgtgcag ggcaagattc 6000

ES 2 568 803 T3

ggaataccaa gtacgagaag gacggccaga cgggtctacgg gaccgacttc attgccgata 6060
 aggtggatta tctggacacc aaggcaccag gcgggtcaaa tcaggaataa gggcacattg 6120
 ccccggcgtg agtcggggca atcccgaag gaggggtaat gaatcggacg tttgaccgga 6180
 aggcatacag gcaagaactg atcgacgcgg ggttttccgc cgaggatgcc gaaaccatcg 6240
 caagccgcac cgtcatgcgt gcgccccgcg aaaccttcca gtccgtcggc tcgatgggcc 6300
 agcaagctac ggccaagatc gagcgcgaca gcgtgcaact ggctccccct gccctgcccg 6360
 cgccatcggc cgccgtggag cgttcgcgtc gtctcgaaca ggaggcggca ggtttggcga 6420
 agtcgatgac catcgacacg cgaggaacta tgacgaccaa gaagcgaaaa accgccggcg 6480
 aggacctggc aaaacaggtc agcgaggcca agcaggccgc gttgctgaaa cacacgaagc 6540
 agcagatcaa ggaaatgcag ctttccttgt tcgatattgc gccgtggccg gacacgatgc 6600
 gagcgatgcc aaacgacacg gcccgcctctg ccctgttcac cacgcgcaac aagaaaatcc 6660
 cgcgcgagggc gctgcaaac aaggtcattt tccacgtcaa caaggacgtg aagatcacct 6720
 acaccggcgt cgagctgcgg gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag gtgttggagt 6780
 acgcaagcg caccctatc ggcgagccga tcacctcac gttctacgag ctttgccagg 6840
 acctgggctg gtcgatcaat ggccggtatt acacgaaggc cgaggaatgc ctgtcgcgcc 6900
 tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg accgcgttgg gcacctgaa tcggtgtcgc 6960
 tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg gcaagaaac gtcccgttgc caggtcctga 7020
 tcgacgagga aatcgtcgtg ctgtttgctg gcgaccacta cacgaaattc atatgggaga 7080
 agtaccgcaa gctgtcgcgg acggcccgcg ggatgttcga ctatttcagc tcgcaccggg 7140
 agccgtaccc gctcaagctg gaaaccttcc gcctcatgtg cggatcggat tccaccgcg 7200
 tgaagaagtg gcgagcagc gtcggcgaag cctgcgaaga gttgcgaggc agcggcctgg 7260
 tggaacacgc ctgggtcaat gatgacctgg tgcattgcaa acgctagggc cttgtgggg 7320
 cagttccggc tgggggttca gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa caagcgggca 7380
 ctgctcgacg cacttgcttc gctcagtatc gctcgggacg cacggcgcgc tctacgaact 7440
 gccgataaac agaggattaa aattgacaat tgtgattaag gctcagattc gacggcttgg 7500
 agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga aagctccaga 7560
 gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt tcgctgaacg 7620
 gttgcgagat gccgtggcat tcgggccta catcgacggc gagatcattg ggctgtcgg 7680
 cttcaaacag gaggacggcc ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg gcgtttcgt 7740
 ggagcccga cagcagggcc gaggggtcgc cggatgctg ctgcgggcgt tgccggcggg 7800
 tttattgctc gtgatgatcg tccgacagat tccaacggga atctggtgga tgcgcatctt 7860
 catcctcggc gcacttaata tttcgtatt ctggagcttg ttgtttattt cggctaccg 7920
 cctgccgggc ggggtcgcgg cgacggtagg cgctgtgacg ccgctgatgg tcgtgttcat 7980
 ctctgccgct ctgctaggtg gcccgatacg attgatggcg gtccctggggg ctatttgccg 8040

ES 2 568 803 T3

aactgcgggc gtggcgctgt tgggtttgac accaaacgca gcgctagatc ctgtcggcgt 8100
cgcagcgggc ctggcggggg cggtttccat ggcgttcggg accgtgctga cccgcaagtg 8160
gcaacctccc gtgcctctgc tcacctttac cgcttgcaa ctggcggccg gaggacttct 8220
gctcgttcca gtagctttag tgttgatcc gccaatcccg atgcctacag gaaccaatgt 8280
tctcggcctg gcgtggctcg gcctgatcgg agcgggttta acctacttcc tttggttccg 8340
ggggatctcg cgactcgaac ctacagttgt ttccttactg ggctttctca gccccgagc 8400
gcttagtggg aatttgtacc cttatcgaa cggggagcac aggatgacgc ctaacaattc 8460
attcaagccg acaccgcttc gcggcgggc ttaattcagg agttaaacat catgagggaa 8520
gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgtcat cgagcgccat 8580
ctcgaaccga cgttgctggc cgtaacattg tacggctccg cagtggatgg cggcctgaag 8640
ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga aacaacgcgg 8700
cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc ctggagagag cgagattctc 8760
cgcgctgtag aagtcaccat tgttgtgcac gacgacatca ttccgtggcg ttatccagct 8820
aagcgcgaac tgcaatttgg agaatggcag cgcaatgaca ttcttgcagg tatcttcgag 8880
ccagccacga tcgacattga tctggtatc ttgctgacaa aagcaagaga acatagcgtt 8940
gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc tttgatccgg ttctgaaca ggatctattt 9000
gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgcgc cggactgggc tggcgatgag 9060
cgaatgtag tgcttacgtt gtcccgcatt tggtagcagc cagtaaccgg caaatcgcg 9120
ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc cggcccagta tcagcccgtc 9180
atacttgaag ctaggcaggc ttatcttga caagaagatc gcttggcctc gcgcgagat 9240
cagttggaag aatttgttca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt cggcaaataa 9300
tgtctaacia ttcgttcaag ccgacgccgc ttcgcgccgc ggcttaactc aagcgttaga 9360
gagctgggga agactatgcg cgatctggtt aagggtgttc taagcctcgt cttgcatgag 9420
catttcgatc cattcccatt ccgcgctcaa gatggcttcc cctcggcagt tcatcagggc 9480
taaatacaatc tagccgactt gtccggtgaa atgggctgca ctccaacaga aacaatcaaa 9540
caaacataca cagcgactta ttcacacgag ctcaaattac aacggtatat atcctgccag 9600
tcagcatcat cacacaaaaa gttaggcccc aatagtttga aattagaaag ctcgcaattg 9660
aggctctacg gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctaccggat cctaaccggt 9720
gtgatcatgg gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttgg tctaatttag tttggtattg 9780
agtaaaacia attcgaacca aacaaaaata taaatatata gtttttatat atatgccttt 9840
aagacttttt atagaatttt ctttaaaaaa tatctagaaa tatttgcgac tcttctggca 9900
tgtaaatatt cgtaaataat gaagtgtctc atttttatta actttaaata attggttgta 9960
cgatcacttt cttatcaagt gttactaaaa tgcgtcaatc tctttgttct tccatattca 10020
tatgtcaaaa cctatcaaaa ttcttatata tctttttcga atttgaagtg aaatttcgat 10080

ES 2 568 803 T3

aattttaa at taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt tataacttaat 10140
 tactaaat ggttaacttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa acgactaaaa 10200
 taaataaata tcatgtgtta ttaagaaaat tctcctataa gaatatttta atagatcata 10260
 tgtttgtaaa aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa aatttgacaa 10320
 agtaagatta aaataatatt catctaacaa aaaaaaac agaaaatgct gaaaaccgg 10380
 caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt tggtttggtt tgattttgat ataaaccgaa 10440
 ccaactcggc ccatgtgcac ccctaatacat aatagcttta atatttcaag atattattaa 10500
 gttaacgttg tcaatatcct ggaaattttg caaatgaat caagcctata tggctgtaat 10560
 atgaatttaa aagcagctcg atgtgggttg aatatgtaat ttacttgatt ctaaaaaat 10620
 atcccaagta ttaataatct ctgctaggaa gaaggttagc tacgatttac agcaaagcca 10680
 gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca aatattttta 10740
 aaaaaatag caatgacttg gaacaaaaga aagtgatata tttttgttc ttaacaagc 10800
 atcccctcta aagaatggca gtttccctt gcatgtaact attatgctcc cttcgttaca 10860
 aaaattttgg actactattg ggaacttctt ctgaaaatag tggccaccgc ttaat 10915

<210> 67
 <211> 1448
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Promotor de PvPhas v2

10

<400> 67

ctcccagtat cattatagtg aaagttttgg ctctctcgcc ggtggttttt tacctctatt 60
 taaaggggtt ttccacctaa aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt 120
 tctcataatc tttggttgaa attatcacgc ttccgcacac gatatcccta caaatttatt 180
 atttgttaaa cattttcaaa ccgcataaaa tttatgaag tcccgtctat ctttaatgta 240
 gtctaacatt tcatattga aatatataat ttacttaatt ttagcgttg tagaaagcat 300
 aatgatttat tcttattctt ctcatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt 360
 taccttaaga aggatttccc atttatatt ttaaaaat atttatcaa ttttttcaa 420
 ccacgtaaat ctcataataa taagttggtt caaagtaat aaaatttaac tccataattt 480
 ttttattcga ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccattt ttttctttga 540
 ataaaaaat ccaattatca ttgtattttt tttatacaat gaaaatttca ccaaacaatg 600
 atttgtgta tttctgaagc aagtcatggt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac 660
 tacggaagta actgaagatc tgcttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttaa 720
 taatagttac tatattcaag atttcatata tcaaaactc aatattactt ctaaaaaatt 780
 aattagatat aattaaata ttactttttt aattttaagt ttaattgttg aattgtgac 840
 tattgattta ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagtttaaa gtaaatataa 900

ES 2 568 803 T3

	gtaatgtagt agagtgttag agtgttacc taaaccataa actataagat ttatgggtgga	960
	ctaattttca tatatttctt attgctttta ccttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg	1020
	aattactgtg ggttgccatg acactctgtg gtcttttgg tcatgcatgg atcttgcgca	1080
	agaaaaagac aaagaacaaa gaaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa	1140
	ccaactcaaa ttagtctactg gctgatcaag atcgccgct ccatgtatgt ctaaagtcca	1200
	tgcaaagcaa cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac	1260
	aaacacattg ctttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc	1320
	gccacctcaa tttcttctact tcaacacacg tcaacctgca tatgctgtgc atcccatgcc	1380
	caaatctcca tgcattgtcc aaccaccttc tctcttatat aatacctata aatacctcta	1440
	atatcact	1448
	<210> 68	
	<211> 85	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> PvPhas 5' UTR	
10	<400> 68	
	cacttcttcc atcatccatc catccagagt actactactc tactactata atacccaac	60
	ccaactcata ttcaatacta ctcta	85
15	<210> 69	
	<211> 129	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> PvPhas 3' UTR v1	
	<400> 69	
	agtatgaact aaaatgcatg taggtgtaag agctcatgga gagcatggaa tattgtatcc	60
	gaccatgtaa cagtataata actgagctcc atctcacttc ttctatgaat aaacaaagga	120
25	tgttatgat	129
	<210> 70	
	<211> 1088	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> PvPhas 3' MAR v2	
35	<400> 70	
	atattaacac tctatctatg caccttattg ttctatgata aatttcctct tattattata	60
	aatcatctga atcgtgacgg cttatggaat gcttcaaata gtacaaaaac aaatgtgtac	120
	tataagactt tctaaacaat tctaacttta gcattgtgaa cgagacataa gtgttaagaa	180
	gacataacaa ttataatgga agaagtttgt ctccatttat atattatata ttaccactt	240

ES 2 568 803 T3

	atgtattata ttaggatggt aaggagacat aacaattata aagagagaag tttgtatcca	300
	tttatatatt atatactacc catttatata ttatacttat ccacttattt aatgtcttta	360
	taaggtttga tccatgatat ttctaataatt ttagttgata tgtatatgaa aaggactat	420
	ttgaactctc ttactctgta taaaggttg atcatcctta aagtgggtct atttaatttt	480
	attgcttctt acagataaaa aaaaaattat gagtgggttt gataaaatat tgaaggattt	540
	aaaataataa taaataataa ataacatata atatatgtat ataaatttat tataatataa	600
	catttatcta taaaaaagta aatattgtca taaatctata caatcgttta gccttgctgg	660
	aacgaatctc aattatftaa acgagagtaa acatatttga ctttttggtt atttaacaaa	720
	ttattattta acactatag aaattttttt tttttatcag caaagaataa aattaaatta	780
	agaaggacaa tgggtgtccca atccttatac aaccaacttc cacaagaaag tcaagtcaga	840
	gacaacaaaa aaacaagcaa aggaaatttt ttaatttgag ttgtcttggt tgctgcataa	900
	tttatgcagt aaaacactac acataaccct tttagcagta gagcaatggt tgaccgtgtg	960
	cttagcttct tttattttat tttttatca gcaaagaata aataaataa aatgagacac	1020
	ttcagggatg tttcaaccct tatacaaaac cccaaaaaca agtttcctag caccctacca	1080
	acgaattc	1088
	<210> 71	
	<211> 457	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> AtuORF 3' UTR v1	
10	<400> 71	
	tatcaaaatc tatttagaaa tacacaatat tttgttgag gcttgctgga gaatcgatct	60
	gctatcataa aaattacaaa aaaattttat ttgcctcaat tatttttagga ttggtattaa	120
	ggacgcttaa attatttgtc gggtcactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata	180
	cgaaatattc gtagtactat cgataattta tttgaaaatt cataagaaa gcaaacgtta	240
	catgaattga tgaacaata caaagacaga taaagccacg cacatttagg atattggccg	300
	agattactga atattgagta agatcacgga atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag	360
	cccaaatggc agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca ggagcggatc attcattggt	420
	tgtttggttg cctttgcaa catgggagtc caaggtt	457
15	<210> 72	
	<211> 68	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Restos N-terminales 1-68 de AnD9DS	
	<400> 72	
25	Met Ser Ala Pro Thr Ala Asp Ile Arg Ala Arg Ala Pro Glu Ala Lys	

ES 2 568 803 T3

<220>

<223> Plásmido pDAB110110

<400> 74

5

```

gtacaaaaaa gcaggcttct agacctaggt ggagtcatca cgcagactat ctcagcatgt      60
gcgtagcacg cggccgcctc ccagtatcat tatagtgaaa gttttggctc tctcgccggt      120
ggttttttac ctctatttaa aggggttttc cacctaaaaa ttctggtatc attctcactt      180
tacttgttac tttatattct cataatcttt ggttgaatt atcacgcttc cgcacacgat      240
atccctacaa atttattatt tgttaaacat tttcaaaccg cataaaattt tatgaagtcc      300
cgtctatctt taatgtagtc taacattttc atattgaaat atataattta cttaatttta      360
gcgttggtag aaagcataat gatttattct tattcttctt catataaatg tttaatatac      420
aatataaaca aattctttac cttaagaagg atttcccatt ttatatttta aaaatatatt      480
tatcaaatat ttttcaacca cgtaaatctc ataataataa gttgtttcaa aagtaataaa      540
atttaactcc ataatttttt tattcgactg atcttaaagc aacaccagt gacacaacta      600
gccatttttt tctttgaata aaaaaatcca attatcattg ttttttttt atacaatgaa      660
aatttcacca aacaatgatt tgtggtattt ctgaagcaag tcatgttatg caaaattcta      720
taattcccat ttgacactac ggaagtaact gaagatctgc ttttacctgc gagacacatc      780
ttctaaagta attttaataa tagttactat attcaagatt tcatatatca aatactcaat      840
attacttcta aaaaattaat tagatataat taaaatatta cttttttaat ttttaagtta      900
attgttgaat ttgtgactat tgatttatta ttctactatg tttaaattgt tttatagata      960
gtttaaagta aatataagta atgtagtaga gtgttagagt gttaccctaa accataaact     1020
ataagattta tgggtggacta attttcatat atttcttatt gcttttacct tttcttggtta     1080
tgtaagtccg taactggaat tactgtgggt tgccatgaca ctctgtggtc ttttggttca     1140
tgcatggatc ttgcgcaaga aaaagacaaa gaacaaagaa aaaagacaaa acagagagac     1200
aaaacgcaat cacacaacca actcaaatta gtcactggct gatcaagatc gccgctcca     1260
tgtatgtcta aatgccatgc aaagcaacac gtgcttaaca tgcactttaa atggctcacc     1320
catctcaacc cacacacaaa cacattgcct ttttcttcat catcaccaca accacctgta     1380
tatattcatt ctcttcgccc acctcaattt cttcacttca acacacgtca acctgcatat     1440
gcggtgcatc ccatgcccaa atctccatgc atgtccaac caccttctct cttatataat     1500
acctataaat acctctaata tcaactcactt ctttcatcat ccatccatcc agagtactac     1560
tacttacta ctataatacc ccaacccaac tcatattcaa tactactcta ggatccaaca     1620

```

ES 2 568 803 T3

atggctgcac ttgatagcat ccctgaggac aaagcaacta gctccaagtc aaccacata 1680
 cagtaccaag aggtcacggt taggaactgg tacaagaaaa tcaactggct caacacgacc 1740
 cttgttgcc tcattcctgc tcttgggttg tacttgacga gaaccacacc tctcaccaga 1800
 cctaccctca tttggtctgt tctctactat ttctgtacag cgtttggcat cactggtggc 1860
 taccacagac tttggtccca taggtcttac agtgcgaggt tgccattgag actcttctctg 1920
 gctttcactg gagctggtgc gatccaaggt tctgcaagat ggtggtcagc caatcatag 1980
 gcacatcacc gttggacgga caccatgaag gaccctact ctgtgatgag aggactgctg 2040
 ttctcccaca taggttggat ggttctcaac tctgatccaa aggtcaaagg cagaacagat 2100
 gtttctgatc ttgactctga tcccgtcgtt gtgtggcaac acaaacacta tggcaagtgt 2160
 ttgctctttg ccgcttggat ctttccgatg atagtggctg ggctgggttg gggagattgg 2220
 tggggtggac ttgtctatgc tggcatcata cgtgcctgct ttgttcagca agccactttc 2280
 tgtgtcaact cattggcaca ttggataggt gaacaaccgt ttgatgacag acgtactcca 2340
 agggatcatg ttctgactgc gttggtcaca atgggagaag gataaccaca cttccaccat 2400
 gagtttccga gtgactacag aaatgccatc atttggtatc agtatgacc tacaagtgg 2460
 ctcatctatc tcttcagctt gggctccctc ccattggcct actctctcaa gaccttccgt 2520
 tccaatgaga ttgagaaagg aaggcttcag caacagcaaa aggctcttga caagaaaaga 2580
 agtggctttg attggggact tcctctcttc cagcttcag tgatctcatg ggatgacttt 2640
 caagctggtt gcaaagaaag tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt gatccatgat 2700
 gtctcccagt tcattgaaga tcaccttggg gggaggagcc tcattagaag tgctgttggg 2760
 aaagatggga ctggcatggt caatggtgga gtgtatgaac attcaaacgc cgcacacaac 2820
 ttgctgagca caatgagagt tggagtcttg agagggtggac aagaagtgga ggtttggag 2880
 aaacagaggg tggatgttct tgggaagtca gacattcttc gtcaagtgac aagggtggag 2940
 cgtctggtg aaggagctgt tgcagcgtga tgagtagtta gcttaatcac ctgagctcg 3000
 gtcaccagta tgaactaaaa tgcattgtag tgtaagagct catggagagc atggaatatt 3060
 gtatccgacc atgtaacagt ataataactg agctccatct cacttcttct atgaataaac 3120
 aaaggatggt atgatatatt aacctctat ctatgcacct tattgttcta tgataaattt 3180
 cctcttatta ttataaatca tctgaatcgt gacggcttat ggaatgcttc aaatagtaca 3240
 aaaacaaatg tgtactataa gactttctaa acaattctaa ctttagcatt gtgaacgaga 3300
 cataagtgtt aagaagacat acaattata atggaagaag tttgtctcca tttatatatt 3360
 atatattacc cacttatgta ttatattagg atgttaagga gacataacaa ttataaagag 3420
 agaagtttgt atccatttat atattatata ctaccattt atatattata cttatccact 3480
 tatttaagt ctttataagg tttgatccat gatatttcta atattttagt tgatatgtat 3540
 atgaaaagg actatttgaa ctctctfact ctgtataaag gttggatcat ccttaaagt 3600
 ggtctattta attttattgc ttcttacaga taaaaaaaa attatgagtt ggtttgataa 3660

ES 2 568 803 T3

aatattgaag gatttaaaat aataataaat aataaataac atataatata tgtatataaa 3720
tttattataa tataacattt atctataaaa aagtaaatat tgtcataaat ctatacaatc 3780
gtttagcctt gctggaacga atctcaatta tttaaacgag agtaaacata tttgactttt 3840
tggttattta acaaattatt atttaacact atatgaaatt tttttttttt atcagcaaag 3900
aataaaatta aattaagaag gacaatggtg tcccaatcct tataacaacca acttccacaa 3960
gaaagtcaag tcagagacaa caaaaaaaca agcaaaggaa attttttaat ttgagttgtc 4020
ttgtttgctg cataatttat gcagtaaaac actacacata acccttttag cagtagagca 4080
atggttgacc gtgtgcttag cttctttttt tttatttttt tatcagcaaa gaataaataa 4140
aataaaatga gacacttcag ggatgtttca acccttatac aaaaccccaa aaacaagttt 4200
cctagcacc taccaacgaa ttcgcgccg ctttaattaag atgagtgata ctcaggactc 4260
aggactcact ctgctgatca ctagtgctag cctcgaggtc gaccagcttt cttgtacaaa 4320
gtggttgctg ccgcttaatt aaatttaaatt tcaattaatg caatcttgat tttcaacaac 4380
gaaggtaatg gcgtaaaaga aaaaatgtat gttattgtat tgatctttca tgatgttgaa 4440
gcgtgccata atatgatgat gtataattaa aatattaact gtcgcatttt attgaaatgg 4500
cactgttatt tcaaccatat ctttgattct gttacatgac acgactgcaa gaagtaataa 4560
atagacgccg ttgttaaaga attgctatca tatgtgccta actagagggg atttgagcgt 4620
cagacctaata caaatattac aaaaatctc actctgtcgc cagcaatggt gtaatcagcg 4680
cagacaaatg gcgtaaaagat cgcggaaaaa cctccccgag tggcatgata gctgcctctg 4740
tattgctgat ttagtcagcc ttatttgact taaggggtgcc ctcgttagtg acaaattgct 4800
ttcaaggaga cagccatgcc ccacactttg ttgaaaaaca aattgccttt ggggagacgg 4860
taaagccagt tgctcttcaa taaggaatgt cgaggaggca atgtaaccgc ctctggtagt 4920
acacttctct aatccaaaaa tcaatttgta ttcaagatac cgcaaaaaac ttatggttta 4980
aacctgcag gactagtcca gaaggtaatt atccaagatg tagcatcaag aatccaatgt 5040
ttacgggaaa aactatggaa gtattatgta agctcagcaa gaagcagatc aatatgcggc 5100
acatatgcaa cctatgttca aaaaatgaaga atgtacagat acaagatcct atactgccag 5160
aatacgaaga agaatacgtg gaaattgaaa aagaagaacc aggcgaagaa aagaatcttg 5220
aagacgtaag cactgacgac aacaatgaaa agaagaagat aaggtcggtg attgtgaaag 5280
agacatagag gacacatgta aggtggaaaa tgtaagggcg gaaagtaacc ttatcacaaa 5340
ggaatcttat cccccactac ttatcctttt atatttttcc gtgtcatttt tgcccttgag 5400
ttttcctata taaggaacca agttcggcat ttgtgaaaac aagaaaaaat ttggtgtaag 5460
ctattttctt tgaagtactg aggatacaac ttcagagaaa tttgtaagtt tgtaggtacc 5520
agatctggat cccaaacat gtctccggag aggagaccag ttgagattag gccagctaca 5580
gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gtttaaccatt acattgagac gtctacagtg 5640
aactttagga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg atgatctaga gaggttgcaa 5700

ES 2 568 803 T3

gatagatacc cttggttggg tgctgagggt gaggggtgtg tggctgggat tgcttacgct 5760
gggccctgga aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt ttacgtgtca 5820
cataggcatc aaaggttggg cctaggatct acattgtaca cacatttgct taagtctatg 5880
gaggcgcaag gttttaagtc tgtggttgct gttataggcc ttccaaacga tccatctggt 5940
aggttgcatg aggctttggg atacacagcc cggggtacat tgcgcgagc tggatacaag 6000
catggtggat ggcacgatgt tggtttttgg caaagggtatt ttgagttgcc agctcctcca 6060
aggccagtta ggccagttac ccaaactctga gtagttagct taatcaccta gagctcgatc 6120
ggcggcaata gcttcttagc gccatcccgg gttgatccta tctgtgttga aatagttgcg 6180
gtgggcaagg ctctctttca gaaagacagg cggccaaagg aaccaaggt gaggtgggct 6240
atggctctca gttccttctg gaagcgcttg gtctaagggtg cagagggtgt agcgggatga 6300
agcaaaagtg tccgattgta acaagatatg ttgatcctac gtaaggatat taaagtatgt 6360
attcatcact aatataatca gtgtattcca atatgtacta cgatttccaa tgtctttatt 6420
gtcgcggtat gtaatcgcg tcacaaaata atccccggtg actttctttt aatccaggat 6480
gaaataatat gttattataa tttttgcat ttggtccgtt ataggaattg aagtgtgctt 6540
gaggtcggtc gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa ataaaaattt 6600
atggtattca atttaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag aaatatagtt 6660
taaataattt ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt 6720
attgatgcaa gtttaaatc agaaatattt caataactga ttatcagc tggtagattg 6780
ccgtagatga aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac ataggaattc gtttaaacga 6840
tctgcttca attttcggtc caacttgac aggaaagacg tcgaccgagg tagctcttgc 6900
ccagcagact gggcttccag tcctttcgct cgatcgggtc caatggtgtc ctcagctgtg 6960
aaccggaagc ggacgaccaa cagtgaaga actgaaagga acgagccgtc tataccttga 7020
tgatcggcct ctggtgaagg gtatcatcgc agccaagcaa gctcatgaaa ggctgatggg 7080
ggaggtgat aattatgagg cccacggcg gcttattctt tagggaggat ctatctcggt 7140
gctcaagtgc atggcgcaaa gcagttattg gagtgcggat ttcggttggc atattattcg 7200
ccacgagtta gcagacgaag agaccttcat gaacgtggcc aaggccagag ttaagcagat 7260
gttacgccct gctgcaggcc tttctattat ccaatagttg gttgatcttt ggaaagagcc 7320
tcggctgagg ccactactga aagagatcga tggatcga tatgccatgt tgtttgctag 7380
ccagaaccag atcacatccg atatgctatt gcagcttgac gcagatatgg aggataagtt 7440
gattcatggg atcgcctcagg agtagctcat ccatgcacgc cgacaagaac agaaattccg 7500
tcgagttaac gcagccgctt acgacggatt cgaaggatc ccatcggaa tgtattagtt 7560
tgcaccagct ccgctcaca cctgtcttca tttgaataag atgttagcaa ttgttttag 7620
ctttgtctt ttgtggcagg gcggcaagt cttcagacat cattctgttt tcaaatttta 7680
tgctggagaa cagcttctta attccttgg aaataataga ctgctctta aaattcagat 7740

ES 2 568 803 T3

gtctggatat agatatgatt gtaaaataac ctatttaagt gtcatttaga acataagttt 7800
 tatgaatgtt cttccatfff cgtcatcgaa cgaataagag taaatacacc ttttttaaca 7860
 ttacaataaa gttcttatac gttgtttata caccgggaat catttccatt attttcgcgc 7920
 aaaagtcacg gatattcgtg aaagcgacat aaactgcgaa atttgcgggg agtgccttga 7980
 gtttgccctg aggctagcgc atgcacatag acacacacat catctcattg atgcttggtg 8040
 ataattgtca ttagattggt tttatgcata gatgcaactg aaatcagcca attttagaca 8100
 agtatcaaac ggatgtgact tcagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtggt attaagttgt 8160
 ctaagcgtca atttgattta caattgaata tatcctgccc cagccagcca acagctcgat 8220
 ttacaattga atatatcctg ccggccggcc cacgcgtgtc gaggaattct gatctggccc 8280
 ccatttgac gtgaatgtag acacgtcgaa ataaagattt ccgaattaga ataattggtt 8340
 tattgctttc gcctataaat acgacggatc gtaatttgtc gttttatcaa aatgtacttt 8400
 cttttataa taacgctgcg gacatctaca tttttgaatt gaaaaaaaaat tggtaattac 8460
 tctttctttt tctccatatt gaccatcata ctcatgctg atccatgtag atttcccgga 8520
 catgaagcca tttacaattg aatatacct gccgccgctg ccgctttgca cccggtggag 8580
 cttgcatggt ggtttctacg cagaactgag ccggttaggc agataatttc cattgagaac 8640
 tgagccatgt gcaccttccc cccaacacgg tgagcgacgg ggcaacggag tgatccacat 8700
 gggactttta aacatcatcc gtcggatggc gttgcgagag aagcagtcga tccgtgagat 8760
 cagccgacgc accgggcagg cgcgcaacac gatcgcaaag ttttgaacg caggtacaat 8820
 cgagccgacg ttcacgcgga acgaccaagc aagcttggct gccatttttg gggtgaggcc 8880
 gttcgcggcc gaggggcgca gcccttggg ggatgggagg cccgcgttag cgggccggga 8940
 gggttcgaga agggggggca ccccccttcg gcgtgcgcgg tcacgcgcac agggcgcagc 9000
 cctggttaaa aacaaggttt ataaatattg gtttaaaagc aggttaaaag acaggttagc 9060
 ggtggccgaa aaacgggcgg aaacccttgc aaatgctgga tttctgcct gtggacagcc 9120
 cctcaaatgt caataggtgc gccctcacc tgtcagcact ctgccctca agtgtcaagg 9180
 atcgcgcccc tcatctgtca gtagtcgcgc cctcaagtg tcaataaccg agggcactta 9240
 tccccaggct tgtccacatc atctgtggga aactcgcgta aaatcaggcg ttttcgccga 9300
 tttgcgaggc tggccagctc cacgtcgcgg gccgaaatcg agcctgcccc tcatctgtca 9360
 acgccgcgcc gggtagtcg gccctcaag tgtcaacgtc cggcctcat ctgtcagtga 9420
 gggccaagtt ttccgcgagg tatccacaac gccggcggcc gcggtgtctc gcacacggct 9480
 tcgacggcgt ttctggcgcg tttgcagggc catagacggc cggcagccca gcggcgaggg 9540
 caaccagccc ggtgagcgtc ggaaagggtc gacggatctt ttccgctgca taaccctgct 9600
 tcggggctcat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga tatacaggat 9660
 tttgccaaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag ccgggcagga 9720
 taggtgaagt aggcccaccc gcgagcgggt gttccttctt cactgtccct tattcgcacc 9780

ES 2 568 803 T3

tggcgggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggctggcc ggctaccgcc ggcgtaacag 9840
 atgagggcaa gcggatggct gatgaaacca agccaaccag gaagggcagc ccacctatca 9900
 aggtgtactg ccttcagac gaacgaagag cgattgagga aaagggcggc gcggccggca 9960
 tgagcctgtc ggctacctg ctggccgtcg gccagggcta caaaatcacg ggcgtcgtgg 10020
 actatgagca cgtccgcgag ctggcccga tcaatggcga cctgggccgc ctgggcggcc 10080
 tgctgaaact ctggctcacc gacgaccgc gcacggcgcg gttcgggtgat gccacgatcc 10140
 tcgccctgct ggcaagatc gaagagaagc aggacgagct tggcaaggtc atgatgggcg 10200
 tggtcgccc gagggcagag ccatgacttt tttagccgct aaaacggccg ggggggtgcgc 10260
 gtgattgcca agcacgtccc catgcgtcc atcaagaaga gcgacttcgc ggagctggta 10320
 ttcgtgcagg gcaagattcg gaataccaag tacgagaagg acggccagac ggtctacggg 10380
 accgacttca ttgccgataa ggtggattat ctggacacca aggcaccagg cgggtcaaat 10440
 caggaataag ggcacattgc cccggcgtga gtcggggcaa tcccgaagg aggggtgaatg 10500
 aatcggagct ttgaccgga ggcatacagg caagaactga tcgacgcggg gttttccgcc 10560
 gaggatgcc aaaccatcgc aagccgcacc gtcatgcgtg cccccgcga aacctccag 10620
 tccgtcggct cgatggcca gcaagctacg gccaaagatcg agcgcgacag cgtgcaactg 10680
 gctccccctg ccctgcccgc gccatcggcc gccgtggagc gttcgcgtcg tctcgaacag 10740
 gaggcggcag gtttggcga gtcgatgacc atcgacacgc gaggaactat gacgaccaag 10800
 aagcgaaaaa ccgccggcga ggacctggca aaacaggtca gcgaggcaa gcaggccgcg 10860
 ttgtgaaac acacgaagca gcagatcaag gaaatgcagc tttccttgtt cgatattgcg 10920
 ccgtggccgg acacgatcgc agcgatgcca aacgacacgc cccgctctgc cctgttcacc 10980
 acgcgcaaca agaaaatccc gcgcgaggcg ctgcaaaaca aggtcatttt ccacgtcaac 11040
 aaggacgtga agatcaccta caccggcgtc gagctgcggg ccgacgatga cgaactgggtg 11100
 tggcagcagg tggtggagta cgcgaagcgc acccctatcg gcgagccgat caccttcacg 11160
 ttctacgagc tttgccagga cctgggctgg tcgatcaatg gccggtatta cacgaaggcc 11220
 gaggaatgcc tgtcgcgcct acaggcgacg gcgatgggct tcacgtccga ccgcgttggg 11280
 cacctggaat cgggtgtcgt gctgcaccgc ttccgcgtcc tggaccgtgg caagaaaacg 11340
 tcccgttgcc aggtcctgat cgacgaggaa atcgctcgtc tgtttgctgg cgaccactac 11400
 acgaaattca tatgggagaa gtaccgcaag ctgtcgcga cggcccagc gatgttcgac 11460
 tatttcagct cgcaccggga gccgtaccg ctcaagctgg aaaccttcg cctcatgtgc 11520
 ggatcggatt ccacccgcgt gaagaagtgg cgcgagcagg tcggcgaagc ctgcgaagag 11580
 ttgcgaggca gcggcctggt ggaacacgcc tgggtcaatg atgacctggt gcattgcaaa 11640
 cgtagggcc ttgtggggtc agttccggct gggggttcag cagccagcgc tttactggca 11700
 tttcaggaac aagcgggcac tgctcgacgc acttgcttcg ctcagtatcg ctcgggacgc 11760
 acggcgcgct ctacgaactg ccgataaaca gaggattaaa attgacaatt gtgattaagg 11820

ES 2 568 803 T3

ctcagattcg acggccttga gcggccgacg tgcaggattt ccgagagatc cgattgtcgg 11880
ccctgaagaa agctccagag atgttcgggt ccgtttacga gcacgaggag aaaaagccca 11940
tggagggcgtt cgctgaacgg ttgcgagatg ccgtggcatt cggcgcctac atcgacggcg 12000
agatcattgg gctgtcggtc ttcaaacagg aggacggccc caaggacgct cacaaggcgc 12060
atctgtccgg cgttttcgtg gagcccgaac agcgaggccg aggggtcgcc ggtatgctgc 12120
tgcggggcgtt gccggcgggt ttattgctcg tgatgatcgt ccgacagatt ccaacgggaa 12180
tctggtggat gcgcatctc atcctcggcg cacttaatat ttcgctattc tggagcttgt 12240
tgtttatttc ggtctaccgc ctgcccggcg gggctcggcg gacggtaggc gctgtgcagc 12300
cgctgatggc cgtgttcac tctgccgctc tgctaggtag cccgatacga ttgatggcgg 12360
tcctgggggc tatttgcgga actgcggggc tggcgctggt ggtgttgaca ccaaacgcag 12420
cgctagatcc tgctggcgtc gcagcgggccc tggcgggggc ggtttccatg gcgttcggaa 12480
ccgtgctgac ccgcaagtgg caacctcccg tgcctctgct cacctttacc gcctggcaac 12540
tggcggccgg aggacttctg ctggttccag tagctttagt gtttgatccg ccaatcccga 12600
tgcctacagg aaccaatggt ctccgcttgg cgtggctcgg cctgatcggg gcgggtttaa 12660
cctacttctt ttggttccgg gggatctcgc gactcgaacc tacagttggt tccttactgg 12720
gctttctcag cccccgagcg cttagtggga atttgtaccc cttatcgaac cgggagcaca 12780
ggatgacgcc taacaattca ttcaagccga caccgcttcg cggcgcggct taattcagga 12840
gttaaacatc atgaggggaag cggatgatcgc cgaagtatcg actcaactat cagaggtagt 12900
tggcgtcatc gagcgccatc tcgaaccgac gttgctggcc gtacatttgt acggctccgc 12960
agtggatggc ggcctgaagc cacacagtga tattgatttg ctggttacgg tgaccgtaag 13020
gcttgatgaa acaacgcggc gagctttgat caacgacctt ttggaaactt cggcttcccc 13080
tggagagagc gagattctcc gcgctgtaga agtcaccatt gttgtgcacg acgacatcat 13140
tccgtggcgt tatccagcta agcgcgaact gcaatttggg gaatggcagc gcaatgacat 13200
tcttgacagg atcttcgagc cagccacgat cgacattgat ctggctatct tgctgacaaa 13260
agcaagagaa catagcgttg ccttggtagg tccagcggcg gaggaactct ttgatccggc 13320
tcctgaacag gatctatttg aggcgctaaa tgaaacctta acgctatgga actcgcggcc 13380
cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt gcttacgttg tcccgcattt ggtacagcgc 13440
agtaaccggc aaaatcgcgc cgaaggatgt cgctgccgac tgggcaatgg agcgcctgcc 13500
ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc taggcaggct tatcttggac aagaagatcg 13560
cttggcctcg cgcgagatc agttggaaga atttgtcac tacgtgaaag gcgagatcac 13620
caaggtagtc ggcaaataat gtctaacaat tcgttcaagc cgacgccgct tcgcggcgcg 13680
gcttaactca agcgttagag agctggggaa gactatgccc gatctgttga aggtggttct 13740
aagcctcgtc ttgcgatggc atttcgatcc attcccattc cgcgctcaag atggcttccc 13800
ctcggcagtt catcagggct aatcaatct agccgacttg tccggtgaaa tgggctgcac 13860
tccaacagaa acaatcaaac aaacatacac agcgacttat tcacacgagc tcaaattaca 13920
acggtatata tcctgccagt cagcatcatc acaccaaaag ttaggcccga atagtttgaa 13980
attagaaagc tcgcaattga ggtctacagg ccaaattcgc tcttagccgt acaatattac 14040
tcaccggatc ctaaccggtt taattaaggc gcgccatgcc cgggcaagcg gccgcacaag 14100
ttt 14103

ES 2 568 803 T3

<211> 13812
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Plásmido pDAB110112

<400> 75

cttgtacaaa	gtggttgcgg	ccgcttaatt	aaatttaa	tcaattaatg	caatcttgat	60
tttcaacaac	gaaggtaatg	gcgtaaaaga	aaaaatgtat	gttattgtat	tgatctttca	120
tgatgttgaa	gcgtgccata	atatgatgat	gtataattaa	aatattaact	gtcgcatttt	180
attgaaatgg	cactgttatt	tcaaccatat	ctttgattct	gttacetgac	acgactgcaa	240
gaagtaaata	atagacgccg	ttgttaaaga	attgctatca	tatgtgccta	actagagggga	300
atgtgagcgt	cagacctaat	caaataattac	aaaatatctc	actctgtcgc	cagcaatggt	360
gtaatcagcg	cagacaaatg	gcgtaaagat	cgcggaaaaa	cctccccgag	tggcatgata	420
gctgcctctg	tattgctgat	ttagtcagcc	ttatgtgact	taaggggtgcc	ctcgttagtg	480
acaaattgct	ttcaaggaga	cagccatgcc	ccacactttg	ttgaaaaaca	aattgccttt	540
ggggagacgg	taaagccagt	tgctcttcaa	taaggaatgt	cgaggaggca	atgtaaccgc	600
ctctggtagt	acacttctct	aatccaaaaa	tcaatttgta	ttcaagatac	cgcaaaaaac	660
ttatggttta	aaccctgcag	gactagtcca	gaaggtaatt	atccaagatg	tagcatcaag	720
aatccaatgt	ttacgggaaa	aactatggaa	gtattatgta	agctcagcaa	gaagcagatc	780
aatatgcggc	acatatgcaa	cctatgttca	aaaatgaaga	atgtacagat	acaagatcct	840
atactgccag	aatacgaaga	agaatacgta	gaaattgaaa	aagaagaacc	aggcgaagaa	900
aagaatcttg	aagacgtaag	cactgacgac	aacaatgaaa	agaagaagat	aaggtcgggtg	960
attgtgaaag	agacatagag	gacacatgta	aggtggaaaa	tgtaagggcg	gaaagtaacc	1020
ttatcacaaa	ggaatcttat	ccccacttac	ttatcctttt	atatttttcc	gtgtcatttt	1080
tgcccttgag	ttttcctata	taaggaacca	agttcggcat	ttgtgaaaac	aagaaaaaat	1140
ttgggtgaag	ctatcttctt	tgaagtactg	aggatacaac	ttcagagaaa	tttghtaagtt	1200
tgtaggtacc	agatctggat	cccaaaccat	gtctccggag	aggagaccag	ttgagattag	1260
gccagctaca	gcagctgata	tggccgcggt	ttgtgatatc	gttaaccatt	acattgagac	1320
gtctacagtg	aacttttaga	cagagccaca	aacaccacaa	gagtggttg	atgatctaga	1380
10 gaggtgcaa	gatagatacc	cttggttggg	tgctgagggt	gaggggtgtg	tggctgggat	1440

ES 2 568 803 T3

tgcttacgct gggccctgga aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt 1500
 ttacgtgtca cataggcatc aaaggttggg cctaggatct acattgtaca cacatttgct 1560
 taagtctatg gagggcgaag gttttaagtc tgtggttgct gttataggcc ttccaaacga 1620
 tccatctggt aggttgcatg aggctttggg atacacagcc cggggtacat tgcgcgcagc 1680
 tggatacaag catggtggat ggcatgatgt tggtttttgg caaagggatt ttgagttgcc 1740
 agctcctcca aggccagtta ggccagttac ccaaactctga gtagttagct taatcaccta 1800
 gagctcgatc ggcggcaata gcttcttagc gccatcccgg gttgatccta tctgtgttga 1860
 aatagttgcg gtgggcaagg ctctctttca gaaagacagg cggccaaagg aaccceaagg 1920
 gaggtgggct atggctctca gttccttgtg gaagcgcttg gtctaagggtg cagaggtggt 1980
 agcgggatga agcaaaagtg tccgattgta acaagatatg ttgatcctac gtaaggatat 2040
 taaagtatgt attcatcact aatataatca gtgtattcca atatgtacta cgatttccaa 2100
 tgtctttatt gtcgccgat gtaatcggcg tcacaaaata atccccggtg actttctttt 2160
 aatccaggat gaaataatat gttattataa tttttgcgat ttggtccggt ataggaattg 2220
 aagtgtgctt gaggtcggtc gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa 2280
 ataaaaattt atggtattca atttaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag 2340
 aatatagtt taaatattta ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa 2400
 acataaattt attgatgcaa gtttaaatc agaaatattt caataactga ttatatcagc 2460
 tggtagattg ccgtagatga aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac ataggaattc 2520
 gtttaaacga tctgcttcta attttcggtc caacttgcac aggaaagacg tcgaccgagg 2580
 tagctcttgc ccagcagact gggcttccag tcctttcgct cgatcgggtc caatgttgtc 2640
 ctcagctgtg aaccggaagc ggacgaccaa cagtggaaga actgaaagga acgagccgtc 2700
 tataccttga tgatcggcct ctggtgaagg gtatcatcgc agccaagcaa gctcatgaaa 2760
 ggctgatggg ggaggtgat aattatgagg ccacagggcg gcttattctt tagggaggat 2820
 ctatctcggt gctcaagtgc atggcgcaaa gcagttattg gagtgcggat tttcgttggc 2880
 atattattcg ccacgagtta gcagacgaag agacctcat gaacgtggcc aaggccagag 2940
 ttaagcagat gttacgccct gctgcaggcc tttctattat ccaatagttg gttgatcttt 3000
 ggaaagagcc tcggctgagg cccatactga aagagatcga tggatatcga tatgccatgt 3060
 tgtttgctag ccagaaccag atcacatccg atatgctatt gcagcttgac gcagatatgg 3120
 aggataagtt gattcatggg atcgtcagg agtagctcat ccatgcacgc cgacaagaac 3180
 agaaattccg tcgagttaac gcagccgctt acgacggatt cgaaggtcat ccattcggaa 3240
 tgtattagtt tgcaccagct ccgctcaca cctgtcttca tttgaataag atgtagcaa 3300
 ttgtttttag ctttgtcttg ttgtggcagg gcggcaagtg cttcagacat cattctgttt 3360
 tcaaatttta tgctggagaa cagcttctta attcctttgg aaataataga ctgcttcta 3420
 aaattcagat gtctggatat agatatgatt gtaaaataac ctatttaagt gtcatttaga 3480

ES 2 568 803 T3

acataagttt tatgaatgtt cttccatttt cgtcatcgaa cgaataagag taaatacacc 3540
 ttttttaaca ttacaaataa gttcttatac gttgtttata caccgggaat catttccatt 3600
 attttcgcbc aaaagtcacg gatattcgtg aaagcgacat aaactgcgaa atttgcgggg 3660
 agtgtcttga gtttgcctcg aggctagcgc atgcacatag acacacacat catctcattg 3720
 atgcttggtg ataattgtca ttagattggt tttatgcata gatgcactcg aaatcagcca 3780
 attttagaca agtatcaaac ggatgtgact tcagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtggt 3840
 attaagttgt ctaagcgtca atttgattta caattgaata tatcctgccc cagccagcca 3900
 acagctcgat ttacaattga atatacctg cgggccggcc cacgcgtgtc gaggaattct 3960
 gatctggccc ccatttgac gtgaatgtag acacgtcgaa ataaagattt ccgaattaga 4020
 ataatttgtt tattgcttcc gcctataaat acgacggatc gtaatttgtc gttttatcaa 4080
 aatgtacttt cattttataa taacgctgcg gacatctaca tttttgaatt gaaaaaaaaat 4140
 tggtaattac tctttctttt tctccatatt gaccatcata ctcatgtctg atccatgtag 4200
 atttcccgga catgaagcca tttacaattg aatatacct gccgccgctg ccgctttgca 4260
 cccggtggag cttgcatggt ggtttctacg cagaactgag ccggttaggc agataatttc 4320
 cattgagaac tgagccatgt gcaccttccc cccaacacgg tgagcgacgg ggcaacggag 4380
 tgatccacat gggactttta aacatcatcc gtcggatggc gttgcgagag aagcagtcga 4440
 tccgtgagat cagccgacgc accgggcagg cgcgcaacac gatcgcaaag tatttgaacg 4500
 caggtacaat cgagccgacg ttcacgcgga acgaccaagc aagcttggct gccatttttg 4560
 gggtgaggcc gttcgcggcc gaggggcgca gcccctgggg ggatgggagg cccgcgttag 4620
 cgggccggga gggttcgaga agggggggca ccccccttcg gcgtgcgagg tcacgcgcac 4680
 agggcgcagc cctgggttaa aacaaggttt ataaatattg gtttaaaagc aggttaaaag 4740
 acaggttagc ggtggccgaa aaacgggcgg aaacccttgc aaatgctgga ttttctgcct 4800
 gtggacagcc cctcaaatgt caataggtgc gcccctcatc tgtcagcact ctgcccctca 4860
 agtgtcaagg atcgcgcccc tcatctgtca gtagtcgcbc ccctcaagtg tcaataccgc 4920
 agggcactta tccccaggct tgtccacatc atctgtggga aactcgcgta aaatcaggcg 4980
 ttttcgccga tttgcgaggc tggccagctc cacgtcgcg gccgaaatcg agcctgcccc 5040
 tcatctgtca acgcccgcgc gggtgagtcg gcccctcaag tgtcaacgtc cgcccctcat 5100
 ctgtcagtga gggccaagtt ttccgcgagg tatccacaac gccggcggcc gcggtgtctc 5160
 gcacacggct tcgacggcgt ttctggcgcg tttgcagggc catagacggc cgccagccca 5220
 gcggcgaggg caaccagccc ggtgagcgtc ggaaagggc gacggatctt ttccgctgca 5280
 taaccctgct tcggggtcat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga 5340
 tatacaggat tttgccaaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag 5400
 cgggcagga taggtgaagt agggccaccc gcgagcgggt gttccttctt cactgtccct 5460
 tattcgcacc tggcgggtct caacgggaat cctgctctgc gaggctggcc ggctaccgcc 5520

ES 2 568 803 T3

ggcgtaacag atgagggcaa gcggatggct gatgaaacca agccaaccag gaagggcagc 5580
 ccacctatca aggtgtactg ccttccagac gaacgaagag cgattgagga aaaggcggcg 5640
 gcggccggca tgagcctgtc ggcctacctg ctggccgtcg gccagggcta caaaatcacg 5700
 ggcgtcgtgg actatgagca cgtccgcgag ctggcccgca tcaatggcga cctgggccgc 5760
 ctgggcggcc tgctgaaact ctggctcacc gacgaccgc gcacggcgcg gtccggtgat 5820
 gccacgatcc tcgccctgct ggcgaagatc gaagagaagc aggacgagct tggcaaggtc 5880
 atgatgggag tggctccgcc gagggcagag ccatgacttt ttagccgct aaaacggccg 5940
 gggggtgctg gtgattgcc a gcacgtccc catgctctcc atcaagaaga gcgacttcgc 6000
 ggagctggta ttcgtgcagg gcaagattcg gaataccaag tacgagaagg acggccagac 6060
 ggtctacggg accgacttca ttgccgataa ggtggattat ctggacacca aggcaccagg 6120
 cgggtcaaat caggaataag ggcacattgc cccggcgtga gtcggggcaa tcccgcgaag 6180
 aggttgaatg aatcggacgt ttgaccggaa ggcatacagg caagaactga tcgacgcggg 6240
 gttttccgcc gaggatgccg aaaccatcgc aagccgcacc gtcattgctg cgccccgcga 6300
 aaccttcag tccgtcggct cgatggtcca gcaagctacg gccaagatcg agcgcgacag 6360
 cgtgcaactg gctccccctg ccctgccgc gccatcggcc gccgtggagc gtccgcgtcg 6420
 tctcgaacag gaggcggcag gtttggcgaa gtcgatgacc atcgacacgc gaggaactat 6480
 gacgaccaag aagcgaaaaa ccgccggcga ggacctggca aaacaggcca gcgaggccaa 6540
 gcaggccgcg ttgctgaaac acacgaagca gcagatcaag gaaatgcagc tttccttgtt 6600
 cgatattgcg ccgtggccgg acacgatgcg agcgatgcca aacgacacgg cccgctctgc 6660
 cctgttcacc acgcgcaaca agaaaatccc gcgcgaggcg ctgcaaaaca aggtcatttt 6720
 ccacgtcaac aaggacgtga agatcaccta caccggcgtc gagctgctgg cgcacgatga 6780
 cgaactggtg tggcagcagg tgttggagta cgcgaagcgc acccctatcg gcgagccgat 6840
 caccttcacg ttctacgagc tttgccagga cctgggctgg tcgatcaatg gccggtatta 6900
 cacgaaggcc gaggaatgcc tgtcgcgcct acaggcgacg gcgatgggct tcacgtccga 6960
 ccgcgttggg cacctggaat cgggtgctgct gctgcaccgc ttccgcgtcc tggaccgtgg 7020
 caagaaaacg tcccgttgcc aggtcctgat cgacgaggaa atcgtcgtgc tgtttgctgg 7080
 cgaccactac acgaaattca tatgggagaa gtaccgcaag ctgtcgccga cggcccgcag 7140
 gatgttcgac tatttcagct cgcaccggga gccgtaccgg ctcaagctgg aaaccttcg 7200
 cctcatgtgc ggatcggatt ccaccgcgt gaagaagtgg cgcgagcagg tcggcgaagc 7260
 ctgcgaagag ttgcgaggca gcggcctggt ggaacacgcc tgggtcaatg atgacctggt 7320
 gcattgcaaa cgctagggcc ttgtggggtc agttccggct gggggttcag cagccagcgc 7380
 tttactggca tttcaggaac aagcgggcac tgctcgacgc acttgcttcg ctcagtatcg 7440
 ctcgggacgc acggcgcgct ctacgaactg ccgataaaca gaggattaa attgacaatt 7500
 gtgattaagg ctcagattcg acggcttggg gcggccgcag tgcaggattt ccgcgagatc 7560

ES 2 568 803 T3

cgattgtcgg ccctgaagaa agctccagag atgttcgggt ccgtttacga gcacgaggag 7620
 aaaaagccca tggaggcggt cgctgaacgg ttgcgagatg ccgtggcatt cggcgcctac 7680
 atcgacggcg agatcattgg gctgtcggtc ttcaaacagg aggacggccc caaggacgct 7740
 cacaaggcgc atctgtccgg cgttttcgtg gagcccgaac agcgaggccg aggggtcggc 7800
 ggtatgctgc tgcgggcggt gccggcgggt ttattgctcg tgatgatcgt ccgacagatt 7860
 ccaacgggaa tctggtggat gcgcatcttc atcctcggcg cacttaatat ttcgctattc 7920
 tggagcttgt tgtttatttc ggtctaccgc ctgccgggcg gggtcgcggc gacggtaggc 7980
 gctgtgcagc cgctgatggg cgtgttcac tctgccgctc tgctaggtag cccgatacga 8040
 ttgatggcgg tcctgggggc tatttgcgga actgcgggcg tggcgtgtt ggtgttgaca 8100
 ccaaacgcag cgctagatcc tgtcggcgtc gcagcgggccc tggcgggggc ggtttccatg 8160
 gcgttcggaa ccgtgctgac ccgcaagtgg caacctcccg tgcctctgct cacctttacc 8220
 gccctggcaac tggcggccgg aggacttctg ctcgttccag tagctttagt gtttgatccg 8280
 ccaatcccga tgccctacagg aaccaatggt ctcggcctgg cgtggctcgg cctgatcggg 8340
 gcgggtttaa cctacttctt ttggttccgg gggatctcgc gactcgaacc tacagtgtt 8400
 tccttactgg gctttctcag cccccgagcg cttagtggga attgtacc cttatcgaac 8460
 cgggagcaca ggatgacgcc taacaattca ttcaagccga caccgcttcg cggcgcggct 8520
 taattcagga gttaaacatc atgaggggaag cgggtgatcgc cgaagtatcg actcaactat 8580
 cagaggtagt tggcgtcatc gagcgcacatc tcgaaccgac gttgctggcc gtacatttgt 8640
 acggctccgc agtggatggc ggcctgaagc cacacagtga tattgatttg ctggttacgg 8700
 tgaccgtaag gcttgatgaa acaacgcggc gagctttgat caacgacctt ttgaaactt 8760
 cggcttcccc tggagagagc gagattctcc gcgctgtaga agtcaccatt gttgtgcacg 8820
 acgacatcat tccgtggcgt tatccagcta agcgcgaact gcaatttggg gaatggcagc 8880
 gcaatgacat tcttgtaggt atcttcgagc cagccacgat cgacattgat ctggctatct 8940
 tgctgacaaa agcaagagaa catagcgttg ccttggtagg tccagcggcg gaggaactct 9000
 ttgatccggt tcctgaacag gatctatttg aggcgctaaa tgaaacctta acgctatgga 9060
 actcgcggcc cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt gcttacgttg tcccgcattt 9120
 ggtacagcgc agtaaccggc aaaatcgcgc cgaaggatgt cgctgccgac tgggcaatgg 9180
 agcgcctgcc ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc taggcaggct tatcttggac 9240
 aagaagatcg cttggcctcg cgcgcagatc agttggaaga atttgttcac tacgtgaaag 9300
 gcgagatcac caaggtagtc ggcaataat gtctaacaat tcgttcaagc cgacgccgct 9360
 tcgcggcgcg gcttaactca agcgttagag agctggggaa gactatgcgc gatctgttga 9420
 aggtggttct aagcctcgtc ttgcgatggc atttcgatcc attcccattc cgcgctcaag 9480
 atggcttccc ctcggcagtt catcagggct aatcaatct agccgacttg tccggtgaaa 9540
 tgggctgcac tccaacagaa acaatcaaac aaacatacac agcgacttat tcacacgagc 9600

ES 2 568 803 T3

tcaaattaca acggtatata tctgcccagt cagcatcatc acacccaaaag ttaggcccga 9660
atagtttgaa attagaaaagc tcgcaattga ggtctacagg ccaaattcgc tcttagccgt 9720
acaatattac tcaccggatc ctaaccgggt taattaaggc gcgccatgcc cgggcaagcg 9780
gccgcacaag tttgtacaaa aaagcaggct tctagacctt ggtggagtca tcacgcagac 9840
tatctcagca tgtgcgtagc acgcggccgc ctcccagtat cattatagtg aaagttttgg 9900
ctctctcgcc ggtgggtttt tacctctatt taaaggggtt ttccacctaa aaattctggt 9960
atcattctca ctttacttgt tactttaatt tctcataatc tttggttgaa attatcacgc 10020
ttccgcacac gatatcccta caaatttatt atttgttaa cattttcaa ccgcataaaa 10080
ttttatgaag tcccgtctat ctttaatgta gtctaacatt ttcattatga aatatataat 10140
ttacttaatt ttagcgttgg tagaaagcat aatgatttat tcttattctt cttcatataa 10200
atgtttaata tacaatataa acaaattctt taccttaaga aggatttccc attttatatt 10260
ttaaaaatat atttatcaa ttttttcaa ccacgtaaat ctcataataa taagttggtt 10320
caaaaagtaat aaaatttaac tccataatth ttttattcga ctgatcttaa agcaacaccc 10380
agtgacacaa ctagccattt tttctttga ataaaaaat ccaattatca ttgtattttt 10440
tttatacaat gaaaatttca ccaacaatg atttgtggtt tttctgaagc aagtcattgtt 10500
atgcaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta actgaagatc tgcttttaca 10560
tgcgagacac atcttctaaa gtaattttta taatagttac tatattcaag atttcatata 10620
tcaaatactc aatattactt ctaaaaaatt aatagatat aattaaata ttactttttt 10680
aattttaagt ttaattgttg aatttgtgac tattgattta ttattctact atgtttaaat 10740
tgttttatag atagttttaa gtaaatataa gtaatgtagt agagtgttag agtgttacc 10800
taaaccataa actataagat ttatgggtgga ctaattttca tatatttctt attgctttta 10860
ccttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg ggttgccatg acactctgtg 10920
gtcttttggg tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac aaagaacaaa gaaaaaagac 10980
aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaa ttagtcaactg gctgatcaag 11040
atgcgccggt ccatgtatgt ctaaagcca tgcaaaagcaa cacgtgctta acatgcactt 11100
taaattggctc acccatctca acccacacac aaacacattg cttttttctt catcatcacc 11160
acaaccacct gtatatattc attctcttcc gccacctcaa tttcttctact tcaacacacg 11220
tcaacctgca tatgcgtgtc atcccatgcc caaatctcca tgcattttcc aaccaccttc 11280
tctcttatat aatacctata aatacctcta atactactca cttctttcat catccatcca 11340
tccagagtac tactactcta ctactataat accccaacc aactcatatt caatactact 11400
ctaggatcca acaatggctc ccaacatttc tgaggatgtc aatgggtgtc tttttgagtc 11460
agatgcggca acccctgatt tggctctttc cacaccacct gtgcaaaaag ctgacaacag 11520
accaagcaa cttgtgtgga ggaacatttt gcttttcgct tacttgcacc tcgcagctct 11580
ctacggaggc tatttgtttc tcttcagtgc aaaatggcag accgacattt tcgcttacat 11640

ES 2 568 803 T3

tctttatgtc atctctggac tggggataac tgctggggca catagactct gggctcacia 11700
 gtcatacaaa gccaaagtggc cactcagagt tatactgggc atcttcaaca cggttgcctt 11760
 tcaagacgct gctatggatt gggctcgtga ccatagaatg catcacaagt acagcgagac 11820
 cgacgcggac ccacacaatg caacgagagg tttcttcttc tctcacattg gctggcttct 11880
 tgttaggaaa catcctgatc tgaagaaaa agggaaggga ctcgacatga gtgatctcct 11940
 tgctgatcca atactccggt ttcagaagaa gtactatctg atcctcatgc ctctggcctg 12000
 ttttgggatg ccaaccgta tcccggttta cttttgggga gaaacttggg caaatgcttt 12060
 cttctgggca gccatgttcc gttatgcttt catcctgaat gttacctggt tggatgaactc 12120
 tgccgcacac aagtggggag acaaaccta tgacaagtcc atcaagcctt ccgaaaacct 12180
 ttcagttgcg atgtttgctt tgggagaagg atttcacaat taccatcaca cttttccgtg 12240
 ggactacaag acagcagagc ttggaacaaa caagttgaac ttcacaacaa cgttcatcaa 12300
 tttctttgcg aaaatcggtt gggcctatga tttgaagact gtgagtgatg acattgtcaa 12360
 gaacagggtc aagagaactg gcgatggaag ccatcatctc tggggctggg gtgatgagaa 12420
 tcagagcaaa gaagagatag atgcagccat taggatcaac cctaaagacg attgagtagt 12480
 tagcttaatc acctagagct cggtcaccag tatgactaa aatgcatgta ggtgtaagag 12540
 ctcatggaga gcatggaata ttgtatccga ccatgtaaca gtataataac tgagctccat 12600
 ctcacttctt ctatgaataa acaaaggatg ttatgatata ttaacactct atctatgcac 12660
 cttattgttc tatgataaat ttctcttat tattataaat catctgaatc gtgacggctt 12720
 atggaatgct tcaaatagta caaaaacaaa tgtgtactat aagactttct aaacaattct 12780
 aactttagca ttgtgaacga gacataagt ttaagaagac ataacaatta taatggaaga 12840
 agtttgtctc cttttatata ttatatatta cccacttatg tattatatta ggatgtaag 12900
 gagacataac aattataaag agagaagttt gtatccattt atatattata tactacccat 12960
 ttatatatta tacttatcca cttatttaat gtctttataa ggtttgatcc atgatatttc 13020
 taatatttta gttgatatgt atatgaaaag gtactatttg aactctctta ctctgtataa 13080
 aggttgatc atccttaaag tgggtctatt taattttatt gcttcttaca gataaaaaaa 13140
 aaattatgag ttggtttgat aaaatattga aggatttaa ataataataa ataataataa 13200
 acatataata tatgtatata aatttattat aatataacat ttatctataa aaaagtaaat 13260
 attgtcataa atctatacaa tcgtttagcc ttgctggaac gaatctcaat tatttaaacg 13320
 agagtaaaca ttttgactt tttggttatt taacaaatta ttatttaaca ctatatgaaa 13380
 tttttttttt ttatcagcaa agaataaaat taaattaaga aggacaatgg tgtcccaatc 13440
 cttatacaac caacttcac aagaaagtca agtcagagac acaaaaaaa caagcaaagg 13500
 aaatttttta atttgagttg tcttgtttgc tgcataattt atgcagtaaa acactacaca 13560
 taaccctttt agcagtagag caatgggtga ccgtgtgctt agcttctttt attttatttt 13620
 tttatcagca aagaataaat aaaataaaat gagacacttc agggatgttt caacccttat 13680
 acaaaacccc aaaaacaagt ttcctagcac cctaccaacg aattcgcggc cgcttaatta 13740
 agatgagtga tactcaggac tcaggactca ctctgctgat cactagtgtc agcctcgagg 13800
 tcgaccagct tt 13812

- 5 <210> 76
- <211> 1434
- <212> ADN
- <213> Magnaporthe grisea

ES 2 568 803 T3

<400> 76

```

gaattcatgg cttcgtcatc ttcctccgtg ccggagttgg ctgccgcctt ccctgatggc      60
actaccgact tcaagcccat gaggaacacc aagggtctacg acgtcagcaa gccgcacatt      120
tccgagacac ctatgacact caagaactgg cataagcacg tcaactggct caacaccacc      180
ttcatcttgt ttgtgcccct ggctggtctc atatccactt actgggtccc tctgcagtgg      240
aagacggctg tatgggctgt cgtctactac ttcaacaccg gcctgggaat tactgccggt      300
taccaccgac tttgggctca cagctcgtac aaggcctcgc ttccgctcaa aatctacctt      360
gccgccgttg gcgctggtgc cgtcagggc tccatcagat ggtggtccaa cggtcaccgc      420
gcacaccacc gatacaccga taccgagaag gaccctact cagtccgcaa gggctcctg      480
tactcacaca tgggatggat gcttctgaag cagaacccca agaagcaggg ccgcaccgac      540
atcaccgacc tgaacgagga ccccgttgtc gtttggcagc accgcaactt cctcaagtgt      600
gttatcttca tggccctcgt cttccccaca cttgtggctg gccttggctg gggtgactac      660
tggggagggt tcatctacgg aggtattctg cgtgtcttct tcgtccagca ggccaccttc      720
tgcgtcaact cgcttgccca ctggctcggg gaccagcctt tcgacgatcg caactcgcgc      780
cgtgatcacg tcatcacagc cctggtcacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac      840
gagttccctt cggactaccg caacgctatt gagtgggtacc agtatgacct caccaagtgg      900
tcaatctgga tctggaagca gcttggctct gccacaaacc tgaagcagtt ccgccaaaac      960
gagattgaga agggacgcgt ccagcagctg cagaagaagc tcgaccagaa gcgcgccaaag     1020
cttgattggg gtattccctt ggagcagctt cccggttgta gctgggatga ctttgttgag     1080
cagtccaaga acgaaaaggc ttggattgca gttgccgggt tcatccacga tgttggtgac     1140
ttcatcaagg accaccctgg tggcagagct ctcatcaact cggccattgg caaggacgca     1200
accgcaatct tcaacggcgg tgtttacaac cactccaacg ccgctcacia cctgctctcg     1260
actatgcgtg tgggtgtttt gcgtggcggc tgcgaggttg agatctggaa gcgcgcccag     1320
tccgaaaaca aggacgtctc aaccgtcgtt gattcttcgg gtaaccgcat cgtccgcgcg     1380
ggtagggcaag cgaccaaggt cgtccagcct gttccgggtg ctcaggccgc gtga         1434

```

5

<210> 77

<211> 212

<212> PRT

<213> Leptosphaeria nodorum

10

<400> 77

ES 2 568 803 T3

Tyr Tyr Phe Cys Thr Ala Phe Gly Ile Thr Gly Gly Tyr His Arg Leu
1 5 10 15

Trp Ser His Arg Ser Tyr Ser Ala Arg Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu
20 25 30

Ala Phe Thr Gly Ala Gly Ala Ile Gln Gly Ser Ala Arg Trp Trp Ser
35 40 45

Ala Asn His Arg Ala His His Arg Trp Thr Asp Thr Met Lys Asp Pro
50 55 60

Tyr Ser Val Met Arg Gly Leu Leu Phe Ser His Ile Gly Trp Met Val
65 70 75 80

Leu Asn Ser Asp Pro Lys Val Lys Gly Arg Thr Asp Val Ser Asp Leu
85 90 95

Asp Ser Asp Pro Val Val Val Trp Gln His Lys His Tyr Gly Lys Cys
100 105 110

Leu Leu Phe Ala Ala Trp Ile Phe Pro Met Ile Val Ala Gly Leu Gly
115 120 125

Trp Gly Asp Trp Trp Gly Gly Leu Val Tyr Ala Gly Ile Ile Arg Ala
130 135 140

Cys Phe Val Gln Gln Ala Thr Phe Cys Val Asn Ser Leu Ala His Trp
145 150 155 160

Ile Gly Glu Gln Pro Phe Asp Asp Arg Arg Thr Pro Arg Asp His Val
165 170 175

Leu Thr Ala Leu Val Thr Met Gly Glu Gly Tyr His Asn Phe His His
180 185 190

Glu Phe Pro Ser Asp Tyr Arg Asn Ala Ile Ile Trp Tyr Gln Tyr Asp
195 200 205

Pro Thr Lys Trp
210

<210> 78

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Helicoverpa zea

<400> 78

10 Leu Tyr Val Ile Ser Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ala His Arg Leu
1 5 10 15

ES 2 568 803 T3

Trp Ala His Lys Ser Tyr Lys Ala Lys Trp Pro Leu Arg Val Ile Leu
 20 25 30

Val Ile Phe Asn Thr Val Ala Phe Gln Asp Ala Ala Met Asp Trp Ala
 35 40 45

Arg Asp His Arg Met His His Lys Tyr Ser Glu Thr Asp Ala Asp Pro
 50 55 60

His Asn Ala Thr Arg Gly Phe Phe Phe Ser His Ile Gly Trp Leu Leu
 65 70 75 80

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

Ser Asp Leu Leu Ala Asp Pro Ile Leu Arg Phe Gln Lys Lys Tyr Tyr
 100 105 110

Leu Ile Leu Met Pro Leu Ala Cys Phe Val Met Pro Thr Val Ile Pro
 115 120 125

Val Tyr Phe Trp Gly Glu Thr Trp Thr Asn Ala Phe Phe Val Ala Ala
 130 135 140

Met Phe Arg Tyr Ala Phe Ile Leu Asn Val Thr Trp Leu Val Asn Ser
 145 150 155 160

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

Ser Glu Asn Leu Ser Val Ala Met Phe Ala Leu Gly Glu Gly Phe His
 180 185 190

Asn Tyr His His Thr Phe Pro Trp Asp Tyr Lys Thr Ala Glu Leu Gly
 195 200 205

Asn Asn Lys Leu Asn Phe Thr Thr
 210 215

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima de delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:12, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:9, and SEQ ID NO:15.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima de delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:12, en donde la molécula de ácido nucleico comprende además un elemento regulador del gen seleccionado del grupo que consiste en el promotor de delta-9 desaturasa de *Saccharomyces cerevisiae* el terminador 3' UTR de delta-9 desaturasa, el promotor del gen *ole1*, el promotor de faseolina, la región 5' no traducida de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, la región 3' no traducida de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, la región unida a la matriz de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, la región 3' no traducida de ORF23 de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor del virus del mosaico de la vena de Cassava, la región 3' no traducida de ORF1 de *Agrobacterium tumefaciens*, la región de unión de la matriz RB7 de *Nicotiana tabacum*, Overdrive, las secuencias de borde de la hebra T, el promotor LfKCS3, el promotor FAE 1 , SEQ ID NO:40 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, una etiqueta Myc, y una etiqueta de hemaglutinina.
3. Un método para disminuir la cantidad de ácidos grasos en una célula, el método comprende:
transformar una célula de planta con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, tal que la cantidad de ácidos grasos saturados en la célula disminuya.
4. El método según la reivindicación 3, que comprende transformar además la célula de la planta con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:12.
5. El método según la reivindicación 4, en donde la posterior transformación de la célula de la planta introduce dentro de la célula de la planta medios adicionales para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula de la planta.
6. El método según la reivindicación 5, en donde los medios para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula de la planta es una desaturasa extraplasmidial, preferiblemente la desaturasa es la MgD9DS desaturasa.
7. Una planta de semilla oleaginosa que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1.
8. Una semilla de planta que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que expresa una desaturasa extraplasmidial que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica a SEQ ID NO:12.
9. La semilla de la reivindicación 8, en donde la semilla es una semilla de una línea de *Brassica napus* transgénica, la semilla tiene niveles disminuidos de 16:0, con relación a una versión isogénica de la línea transgénica de *Brassica napus*.
10. Un método para crear una planta por ingeniería genética que comprende cantidades disminuidas de ácidos grasos saturados en la planta comparado con la planta de tipo silvestre, el método comprende:
transformar el material de la planta con una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:12; y
cultivar el material de la planta transformada para obtener una planta, en donde la semilla de la planta exprese la enzima delta-9 desaturasa .
11. El método de las reivindicaciones 3 o 10, en donde la célula de la planta o la planta se selecciona de un género seleccionado del grupo que consiste en *Arabidopsis*, *Borago*, Canola, *Ricinus*, *Theobroma*, *Zea*, *Gossypium*, *Crambe*, *Cuphea*, *Linum*, *Lesquerella*, *Limnanthes*, Linola, *Tropaeolum*, *Oenothera*, *Olea*, *Elaeis*, *Arachis*, rapeseed, *Carthamus*, *Glycine*, *Soja*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Vernonia*, *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Sorghum*, *Secale*, y los otros miembros de las *Gramineas*.
12. Una planta que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, obtenida por el método de la reivindicación 10.
13. Un material de planta que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, obtenido de la planta de la reivindicación 12, preferiblemente el material de la planta es una semilla.
14. La semilla de la planta de la reivindicación 8, en donde la desaturasa extraplasmidial comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:12.

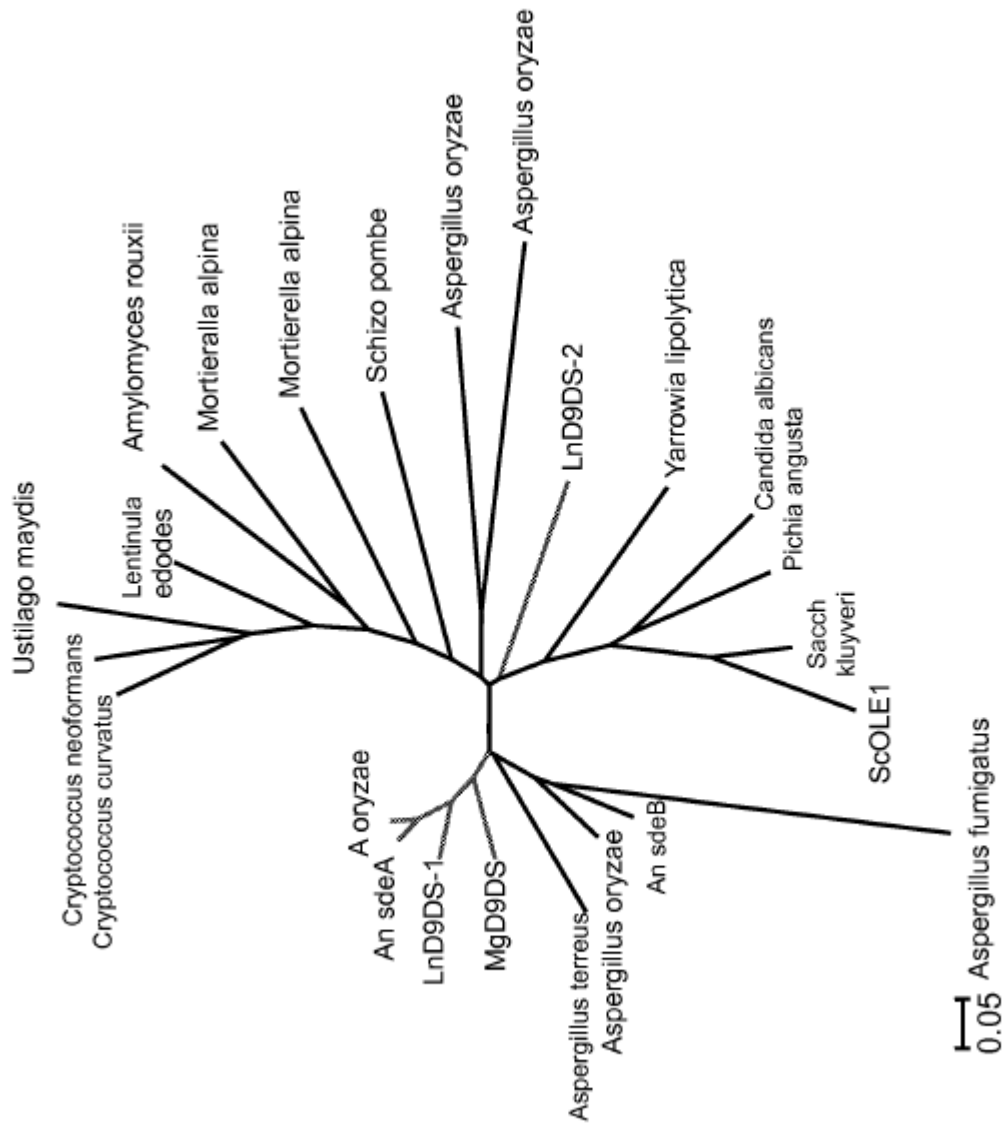


Fig. 1

LnD9DS-1 (SEQ ID NO:5) (1) cccgattcattaatgcagctggcagcacaggtttcc
LnD9DS-2 (SEQ ID NO:8) (1) -----
MgD9DS (SEQ ID NO:76) (1) -----

(37) cgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcatta
(1) -----
(1) -----

(94) caggctttacactttatgcttccggctcgtatggtgtgtggaattgtgagggcacc
(1) -----
(1) -----

(151) cggataacaatttcacacaggaacagctatgaccatgattacgccaagctcgaat
(1) -----
(1) -----

(208) taaccctcactaaaggaacaaaagctggagctccaccgcggtggcggccgctctag
(1) -----
(1) -----

(265) aactagtggatccccgggctgcaggaattcggcagcagatagccttcccaccAggc
(1) -----
(1) -----gAatt

(322) tgTtGCTggcatgcaggCCatCGacCCcGAGTTtGtcaaGCAGCCgTCTC--CTaTG
(1) -----GgAtCCaTggCgGCctTG
(6) caTgGCTtctcatcttCCtcCGtgCCgGAGTTgGc--tGCcGCctTCcCtGaTggc

(377) GCgAGCAcCTCgGAGCCCAaccGcAACTCCAAG---TACGAtcCtAAgAAGCCGCAC
(19) GacAGCAttcCaGAGgatAAGgctAcCTC---G---T-----CgAAatcGaCtCAt
(61) aCtAcCgaCTtcaAGCCCAtGaGgAACcCAAGggcTACGAcgtcAgcAAGCCGCAC

(431) ATTaCAGAcAtgCCcATcACgCggtcaAACTGGTAccAGCAtGTCAACTGGCTCAAC
(64) ATTcaAtatcaAgaagTaACttTtcgGAACTGGTATAAGaAgaTaAAtTGGCTCAAC
(118) ATTtCcGAgAcACcTATgACaCTcaaGAACTGGcATAAGCacGTCAACTGGCTCAAC

(488) gtCAtCTTCATCaTeggCGTGCCtCTCGCTGGCTgCGTCgCCgCCTtCTGGaCCcCT
(121) ACgACgcTggTggTGcTCaTaCC---CGCT--CTTgGaCTcTAcCTAacacGCaCCa
(175) ACCACCTTCATCtTGtTtGTGCCcTgGCTGGtcTCaTaTCCAcTACTGGGtCCCT

(545) CTGCAGTGGAA-GACCGCTGCg----TGGGCTGTcATCTACTAtTTCTGgACTGGCC
(173) CgcCAcTtacAcGACctacGCTcateTGGtCcGTCcTgTACTACTTCTGCACaGctt
(232) CTGCAGTGGAA-GACgGCTGta----TGGGCTGTcTCTACTACTTCaaCACcGGCC

Fig. 2a

(597) TCGGtATCACcGCCGGATACCATCGtCTcTGGGCaCACAagTCaTACAACGCCgGTC
 (230) TCGGcATCACaGgCGGATAtCATCGACTaTGGagTCAtcGCagcTACTcCGCtcGTC
 (284) TgGGaATtACTGCCGGtTACCAcCGACTtTGGGCTCACAGCTCgTACAAGGCtCgC

(654) TTCCtCTgAGgATCTggCTcGCCGCCGTcGGCGCTGGTGctGttGAGGGTTCCATCC
 (287) TaCCGCTacGctTaTtCCTaGCcttCacaGGCGCcGGaGCCaTCCaAGGTagtgtcC
 (341) TTCCGCTcAaaATCTaCCTtGCCGCCGTtGGCGCTGGTGCCGTCGAGGGcTCCATCa

(711) GcTGGTGGAGCcgtGAcCACCgCGCCACCACCGcTACACCGACACCAAcAAGGACC
 (344) GATGGTGGAGCgcaaATCACCgCGCCACCACCGATggACCGACACaAtGAAGGACC
 (398) GATGGTGGtcCaacGgTCACCgCGCaCACCACCGATACACCGAtACCgAGAAGGACC

(768) CCTACagtGTCCGCAAGGGCCTtCTcTACagcCAtcTCGGATGGATGGTcaTGAAGC
 (401) CCTACTCcGTtatgCgcGGCCTatTaTtCTCgCACATCGGATGGATGGTatTGAACA
 (455) CCTACTCaGTCCGCAAGGGtCTcCTgTACTCaCACATgGGATGGATGcTtTGAAGC

(825) AGAACCCCAAGcgtAtcGGCCGCACCgACATCACCGACTTGAACGAGGACCCCGTTG
 (458) gcgACCCCAAAgtcAAaGGCCGaACaGACgTCagtGAtCTcgACagcGACCCCGTcG
 (512) AGAACCCCAAGaagcAgGGCCGCACCgACATCACCGACCTGAACGAGGACCCCGTTG

(882) TCGTCTGGCAGCACAAGAActACaTCAAGgcCGTcgTCacCATGGgCTTGATCTTtC
 (515) TaGTCTGGCAGCACAAGcACTACggCAAGTGCCcTgcTgTTCgcccGcTgGATaTTCC
 (569) TCGTtTGGCAGCACcgcAACTtCcTCAAGTgTGTaTCTTCATGGCCcTcgTCTTCC

(939) CCtCtgcCGTcGCCGGtCTCatgTGGGGcGATTGGatGGGtGGCTTCATCTACGctG
 (572) CCAAtgaTCGTaGCCGGCTCGGaTGGGGaGATTGGTGGGGAGGcCttgTCTACGcG
 (626) CCACacTtGTgGctGGCCTtGGcTGGGGtGAcTAcTGGGGAGGtTTCATCTACGgaG

(996) GTATCCTcCGTaTCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGCGTCAACTCGCTTGctC
 (629) GcATCaTtCGaGcgTgtTTCGTCCAGCAGGCgACaTtTTCGTgAACTCtCTcGCgC
 (683) GTATtCTgCGTGTCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGCGTCAACTCGCTTGccC

(1053) ACTGGCTCGGTGACCAGCCcTTCGACGACCGCAACTCtCCTCGTGACCACGTCAAtA
 (686) AtTGGaTCCGcGAgCAGCCgTTCGACGACaCaGacgCaCGCCTCGaGACCAGTtTgA
 (740) ACTGGCTCGGTGACCAGCCtTTCGACGAtCGCAACTCGCCgCGTGAtCACGTCAAtA

(1110) CcGctCTtGTCACtCTcGGAGAGGGcTACCACAActTCCACCACGAGTTCCcTCCG
 (743) CAGCgtTGGTaACgaTgGGAGaAGGATatCatAACTTCCACCACGAaTTCCCAagCG
 (797) CAGCcCTGGTCACcCTtGGAGAGGGATACCACAActTCCACCACGAGTTCCcTTCgG

(1167) ACTACCGCAACGCcATCGAGTGGcACCAGTACGACCCTACCAAGTGGTCCATCTGGC
 (800) AtTAtCGCAACGCgATCAtcTGGTACCAaTACGACCCTACCAaTGGctCATtTacC
 (854) ACTACCGCAACGCtATtGAGTGGTACCAGTatGACCCcACCAAGTGGTCAATCTGGA

Fig. 2b

(1224) TgTGGG-----GCaAGCTCGGCCTCGCCTcCAACCTCAAGCAGTTCCGCTCCAACG
 (857) TCTtctccctcgGCCcctTCccCCTCGCaTACtctcgCTCAAaaccTTCCGgTCCAAtG
 (911) TCTGGA-----agCAGCTtGGtCTtGCCcACAACCTgAAGCAGTTCCGcCaaAACG

(1275) AaATcGAGAAGGGtCGtGTCCAGCAGCTcCAGAAGAAGaTtGACCAGAAGCGCGCCA
 (914) AGATTGAaAAaGGgCGgtTgCAaCAaCAaAAagccCTgGACaAGAAGCGCtCag
 (962) AGATTGAGAAGGGaCGcGTCCAGCAGCTgCAGAAGAAGCTcGACCAGAAGCGCGCCA

(1332) AGCTcGAcTGGGGTgTcCCtCTCGACCAGCTgCCTGTcATAgaaTGGGACGACTaTG
 (971) gaCTTGATTGGGGccTaCCCCtCtCCaACTcCCTGTcATAtcgTGGGACGACTTcc
 (1019) AGCTTGATTGGGGTaTtCCtTgGAgCAGCTtCCcGtTgTtagcTGGGAtGACTTTG

(1389) TcGAGCAG-GCCAAGAA-CgGcCGtGGT-CTcATcGCTGTcGCTGGTGTcGTTcATg
 (1028) aaGcGCgttGCaAAGAgTCCGGCGAGaTgCTGgTTGCTGTcGCaGGTGTgATTcAG
 (1076) TtGAGCAG-tCCAAGAA--CGGaaAGGcttgGATTGCaGtTGCcGGTGTcATcCAGC

(1443) ACGTTAcCGACTTCATCAAcGAgCACCCcGGTGGCAaGACgCTtATCAAGAGcGgCG
 (1085) ACGTcAGCcAgTTtATtgAaGAtCACCCCTGGaGGCAGGAgTtTgATtctgGAGtGCgG
 (1130) AtGTgTgTgACTTCATCAAgGAcCACCCCTGGTGGCAGagCTCTcATCAActcgGCCa

(1500) TTGGCAAGGATGcCACCcCATGTTCAACGGCGGTGTcTACTtCCACTCCAACGgaG
 (1142) TgGGCAaAGATGggACaGggATGTTtAAtGGaGGcGTaTAtgAgCACagtAAtGCgG
 (1187) TTGGCAAGGAcGCaACCcCaATcTTCAACGGCGGTGTtTACaACCActCCAACGcCg

(1557) CcCACAACTcCTtTCtAcCATGAGGGTtGGTGTcaTcCGcGGTGGCTGtGAaGTTG
 (1199) CgCAtAAtCTGtTgTCGACaATGAGGGTGGGAGTgcTtaGaGGTGGgcagGAGGTgG
 (1244) CtCACAACTGCTcFCGACTATGcGtGTGGGTGTtTgCGtGGcGGCTGcGAGGTTG

(1614) AGATCTGGAAGCGCGCtCAGcGTGAgAACAAAGGATGTcGGtctGGTC--CTgGAcGA
 (1256) AGgTgTGGAAAGaa-GCagAGaGTg-----AtGtTtTaGGgAaGagCGaCaTttTGA
 (1301) AGATCTGGAAGCGCGCcCAGtccGAaAACAAAGAcGTcTcaAccGTcG--TTGATtc

(1669) cgCAGGcAACCCaATCaTCaGGGCTGGTaaCAGattACCAAGGTTGCGCAaCCcAT
 (1307) gaCAGGTtACgCgggtGgagaGGtTGGTt--gAGGgGgCtgtGGcTGCGtAGCtaAc
 (1356) ttCgGGTAACCgcATCGTCcGcGCgGGTgggCAaGcGACCAAGGTcGtcCAGCctgT

(1726) TCAGaGTGCTagtGCaGCaTagattggatcttcatcttcacgagcgatgtatggcgt
 (1362) TgAccaTGg-----
 (1413) TCcGgGTGCTcagGCCGCgTga-----

Fig. 2c

```
(1783) ttggttgtctctctcttcttggcgggacagagtaaatattcaatttcttagcgcgatcgta  
(1371) -----  
(1435) -----  
  
(1840) gaaagcatcatggttacgatgctcagtcagttagatggcgtatgttttagccttc  
(1371) -----  
(1435) -----  
  
(1897) ctcgagtgattggstatgaaaagtagcctcacggcctagaccaagaatgaaaacatt  
(1371) -----  
(1435) -----  
  
(1954) cacgatttcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgagggggggcc  
(1371) -----  
(1435) -----
```

Fig. 2d

```

LnD9DS-2 (SEQ ID NO:14)          (1) -----
LnD9DS-1 (SEQ ID NO:49)         (1) -----
AnD9DS (SEQ ID NO:50)           (1) -----
MgD9DS (SEQ ID NO:12)           (1) -----
ScOLE1 AAA34826 (SEQ ID NO:52)  (1) MPTSGTTIELIDDQFPKDDSA

(1) -----MAALDSI
(1) -----MPSHQAVAGMQAIDPEFVKQPSMASTSEPN
(1) -----MSAPTADI
(1) -----MASSSSVPELAAAFPDGTTDFKPM
(23) SGIVDEVLDLTEANILATGLNKKAPRIVNGFGSLMGSKEMVSVFDDKKGNEKKSNDLRL

(8) PEDKA----TSSKSTHIQYQEVTFRNWYKKNWLNNTTLVVLIIPALGLYLTRT--TPLT
(32) RNSK----YDPKPHITDMPITRSNWyQHVNWLNVIIFIIGVPLAGCVAAFW--TPLQ
(9)  RARA----PEAKKVHIADTAIRHNWYKHVNWLNVFLIIGIPLYGCIQAFW--VPLQ
(26) RNTKG---YDVSKPHISETPMTLKNWKKHVNWLNNTTFILFVPLAGLISTYW--VPLQ
(81) LEKDNQEKEEAKTKIHISEQPWTLNWQHHLNWNLMVLCGMPMIGWYFALSGKVPFH

(60) RPTLIWSVLYYFCTAFGITGGYHRLWHSRYSARLPLRLFLAFTGAGAIQGSARWWSA
(83) WKTAAWAVIYYFWTGLGITAGYHRLWAHKSYNAGLPLRIWLAAVGGAGAVEGSIRWWSR
(60) LKTAIWAVIYYFFTGLGITAGYHRLWAHCSYATLPLRIWLAAVGGGAVEGSIRWWAR
(78) WKTAVWAVVYYFNTGLGITAGYHRLWAHSSYKASLPLKIYLAAVGGAGAVEGSIRWWSN
(139) LNVFLFSVFYYAVGGVSITAGYHRLWHSRYSAHWPLRLFYAIFGCASVEGSAKWWGH

(118) NHRRAHHRWTDTMKDPYSVMRGLLFSHIGWMLNSDPKVKGRTEVSELDSDPVVVWQHK
(141) DHRRAHRYTDTNKDPYSVRKGLLYSHLGWMMKQNPKRIGRTDITDLNEDPVVVWQHK
(118) DHRRAHRYTDTDKDPYSVRKGLLYSHLGWMMKQNPKRIGRTDISDLNEDPVVVWQHR
(136) GHRRAHRYTDTTEKDPYSVRKGLLYSHMGWMLLKQNPKKQGRTDITDLNEDPVVVWQHR
(197) SHRIHRYTDTLRDPYDARRGLWYSHMGWMLLKPNPKYKARADITDMDTDDWTIRFQHR

(176) HYGKCLLFAAWIFPMIVAGLGWGDWGGGLVYAGIIRACFVQOATFCVNSLAHWIGEQP
(199) NYIKAVVTMGLIFPSAVAGLMWGDWGGFIYAGILRIFVQOATFCVNSLAHWLGDQP
(176) NYLKVVFTMGLAVPMLVAGLGWGDWLGCFVYAGILRIFVQOATFCVNSLAHWLGDQP
(194) NFLKCVIFMALVPPTLVAGLGWGDYWGCFIYGGILRVFFVQOATFCVNSLAHWLGDQP
(255) HYILLMLLTAFVIPTLICGYFFNDYMGGLIYAGFIRVFVIOOATFCINSMAHYIGTQP

(234) FDDRRTPRDHVLTALVLTMGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIHWYQYDPTKWLIIYLFSLGPPF
(257) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIEWHQYDPTKWSIWLWSK--LG
(234) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIEWHQYDPTKWSIWAWKQ--LG
(252) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIEWYQYDPTKWSIWIWKQ--LG
(313) FDDRRTPRDNWITAIVTFGEGYHNFHHEFPTDYRNAIKWYQYDPTKVIILYLTSL--VG

```

Fig. 3a

(292) LAYSLKTFRSNEIEKGRLOQQQKALDKKRSGLDWGLPLFQLFVISWDDFQARCKESGE
 (313) LASNLKQFRSNEIEKGRVQQLQKKIDQKRAKLDWGVPLDQLFVIEWDDYVEQAK-NGR
 (290) LAYDLKKFRANEIEKGRVQQLQKKLDRKRATLDWGTPLDQLPVMWDDYVEQAK-NGR
 (308) LAHNLKQFRONEIEKGRVQQLQKKLDQKRAKLDWGIPLDQLPVVSWDDFVEQSK-NGK
 (369) LAYDLKKFSQNAIEEALIQEQKINKKKAKINWGPVLTDLPMWDKQTFLLAKSK-ENK

(350) MLVAVAGVIHDVVSQFIEDHPGGRSLIRSAVGKDGTMFNNGGVYHSNAAHNLSTMRV
 (370) GLIAVAGVVHDVTDFINEHPGGKTLKSGVGKDATAMFNNGGVYFHSNGAHNLSTMRV
 (347) GLVAIAGVVHDVTDFIKDHPGGKAMISSGIGKDATAMFNNGGVYHSNAAHNLSTMRV
 (365) AWIAVAGVIHDVGDVFIKDHPGGRALINSAIGKDATAIFNNGGVYHSNAAHNLSTMRV
 (426) GLVIIISGIVHDVSGYI SEHPGGETLIKALGKDATKAFSGGVYRHSNAAQNVLADMRV

(408) GVL RGGQEVEVWKKQR-----VDVLGKSD----ILRQVTRVERLVEGAVAA
 (428) GVIRGGCEVEIWKRAQRENKDVGLVLDDAGNPIIRAGNQITKVAQPIQSASAA
 (405) GVIRGGCEVEIWKRAQKEN--VEYVRDGGSGQRVIRAGEQPTKIPEPIPTADAA
 (423) GVL RGGCEVEIWKRAQSENKDVSTVVDSSGNRIVRAGGQATKVVQPVPGAQAA
 (484) AVIK-----ESKN-S-----AIRMASKRGEIYETGKFF

Fig. 3b

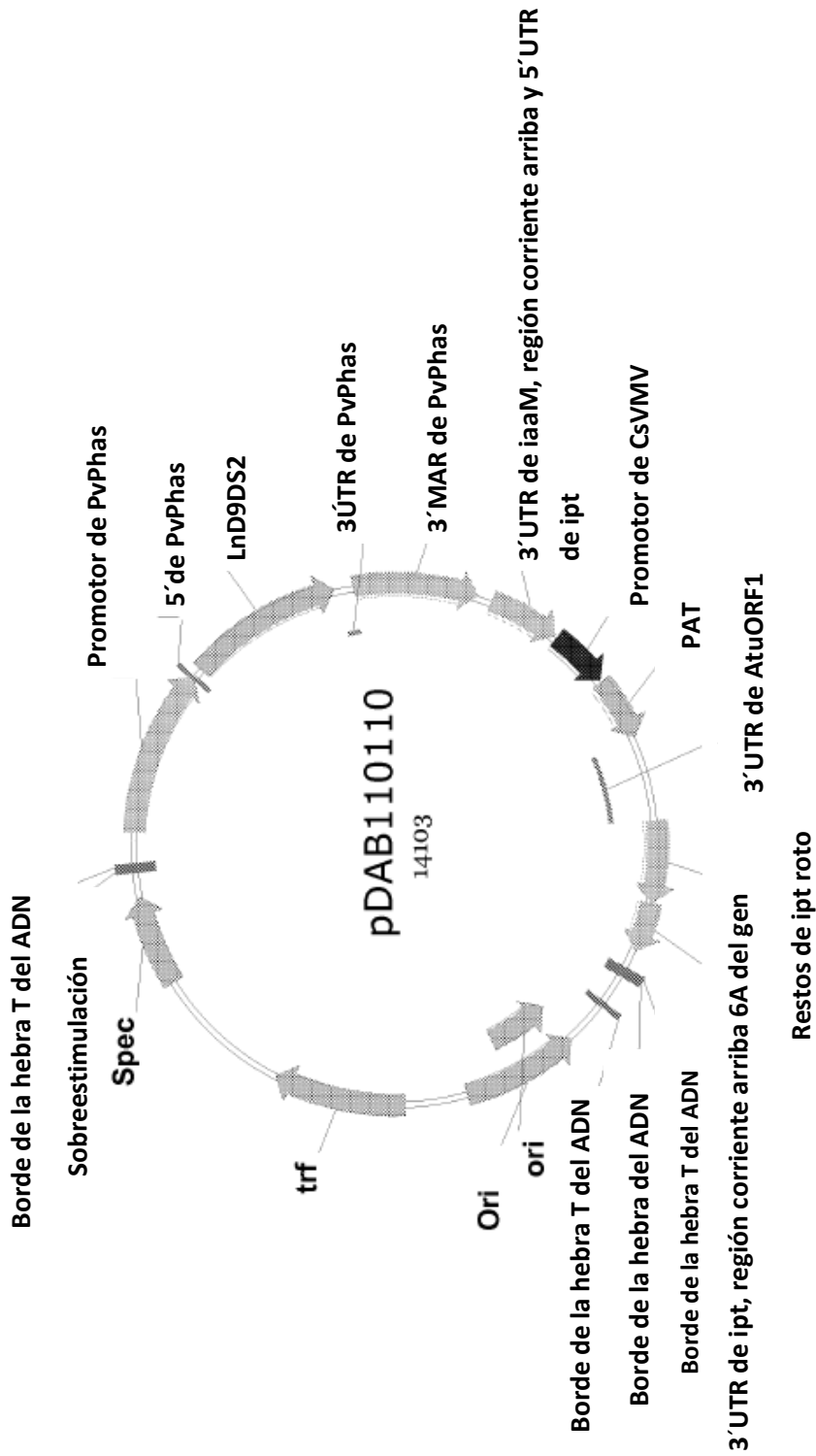


Fig. 4a

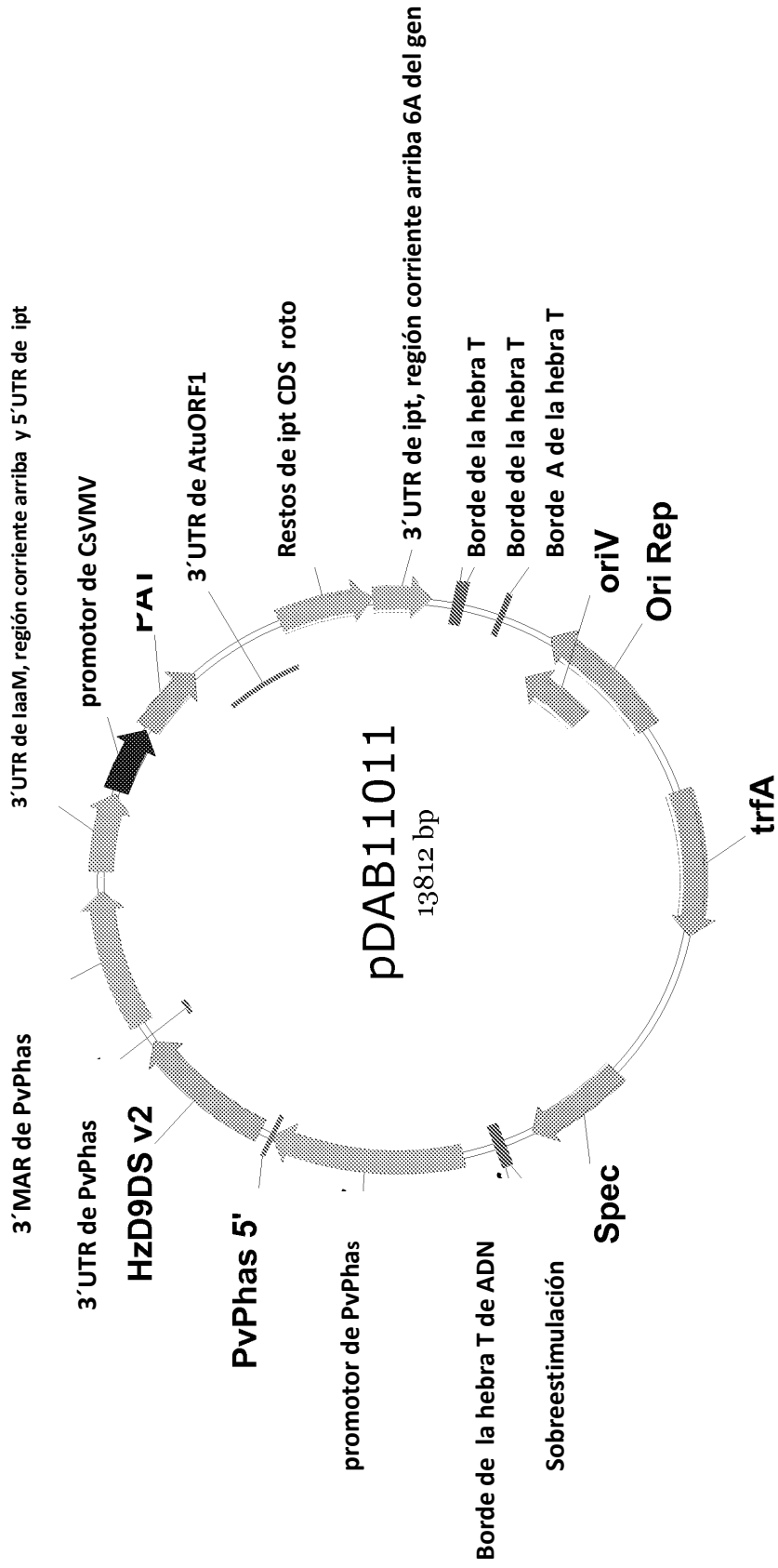


Fig. 4b

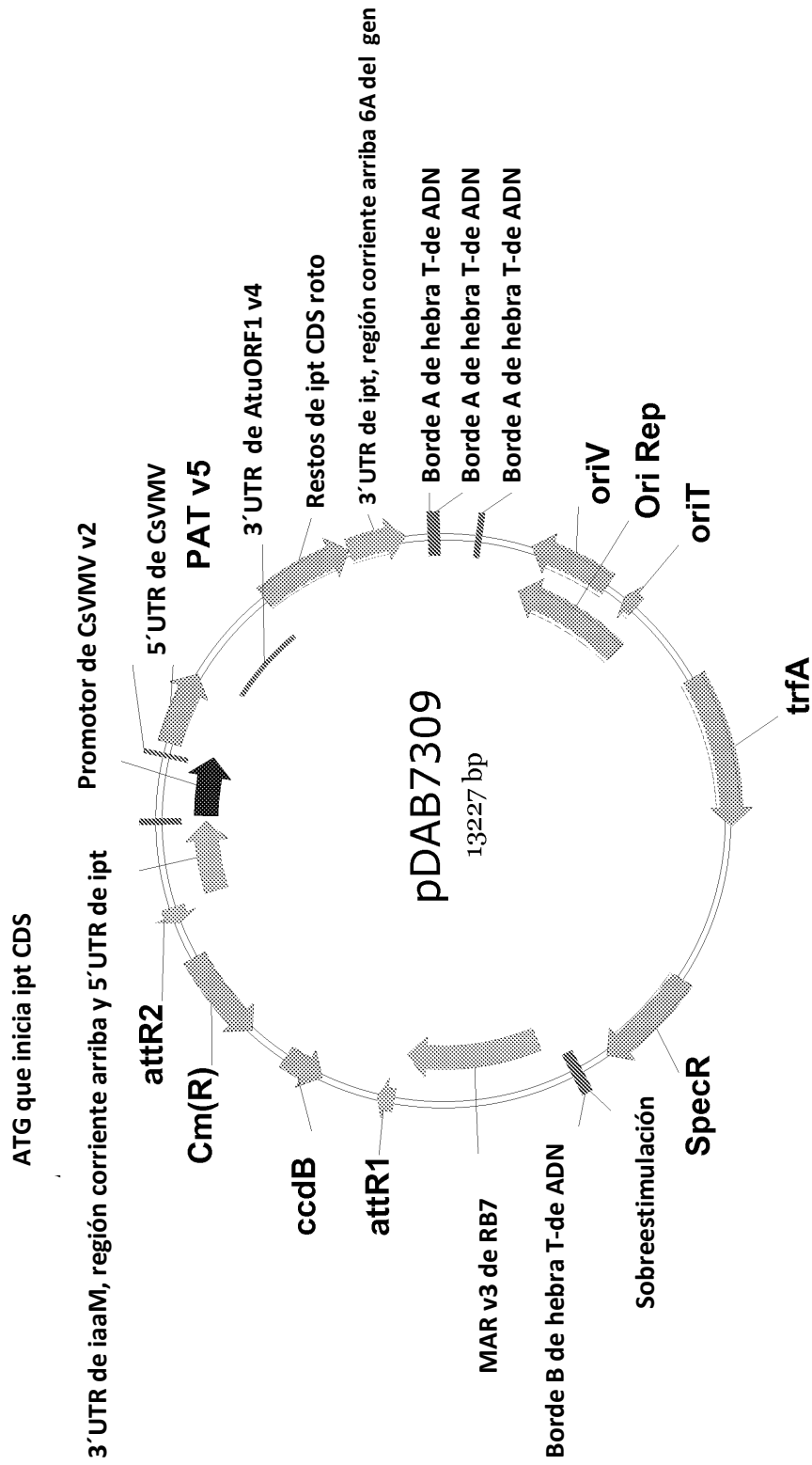


Fig. 5

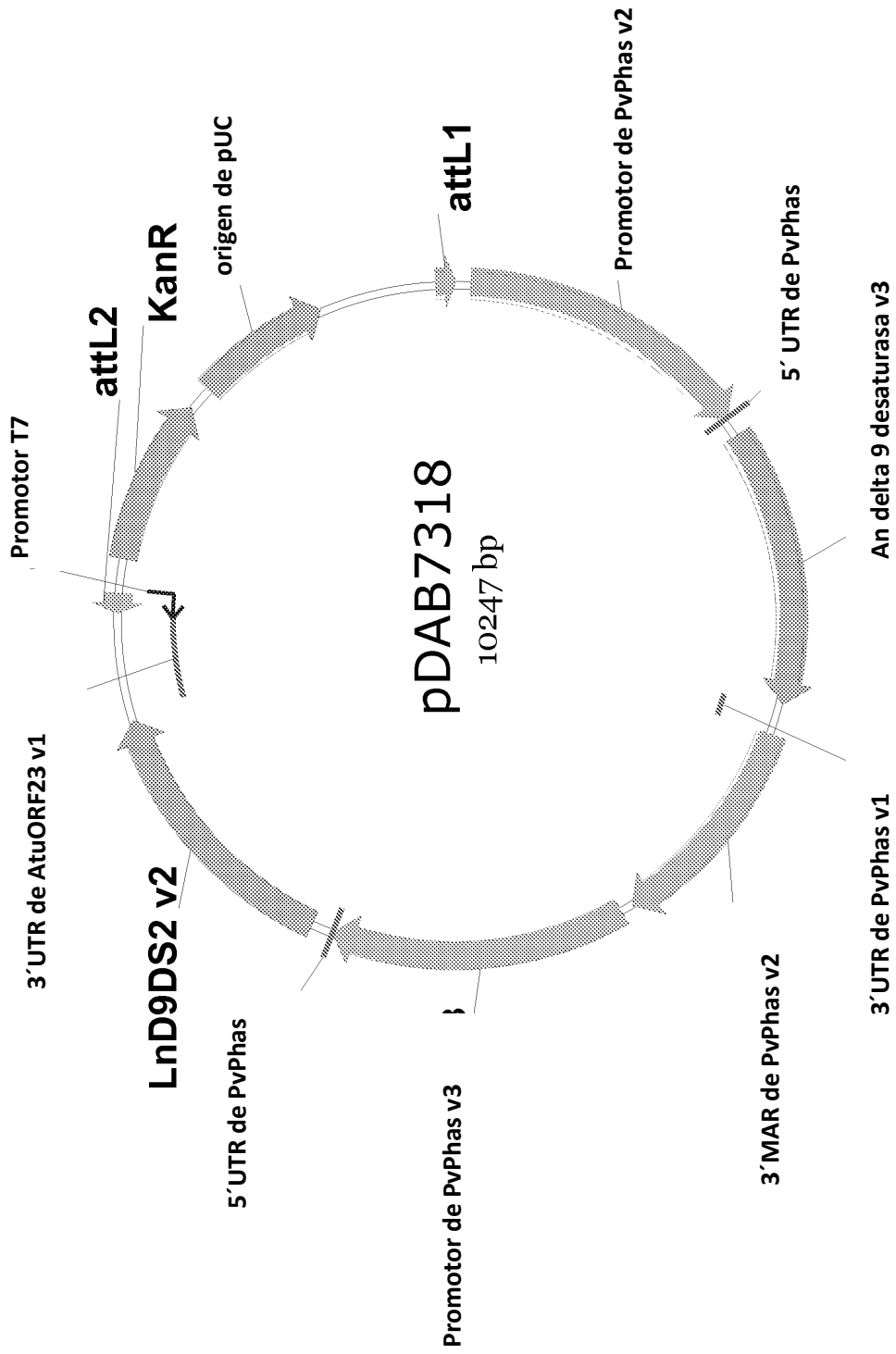


Fig. 6

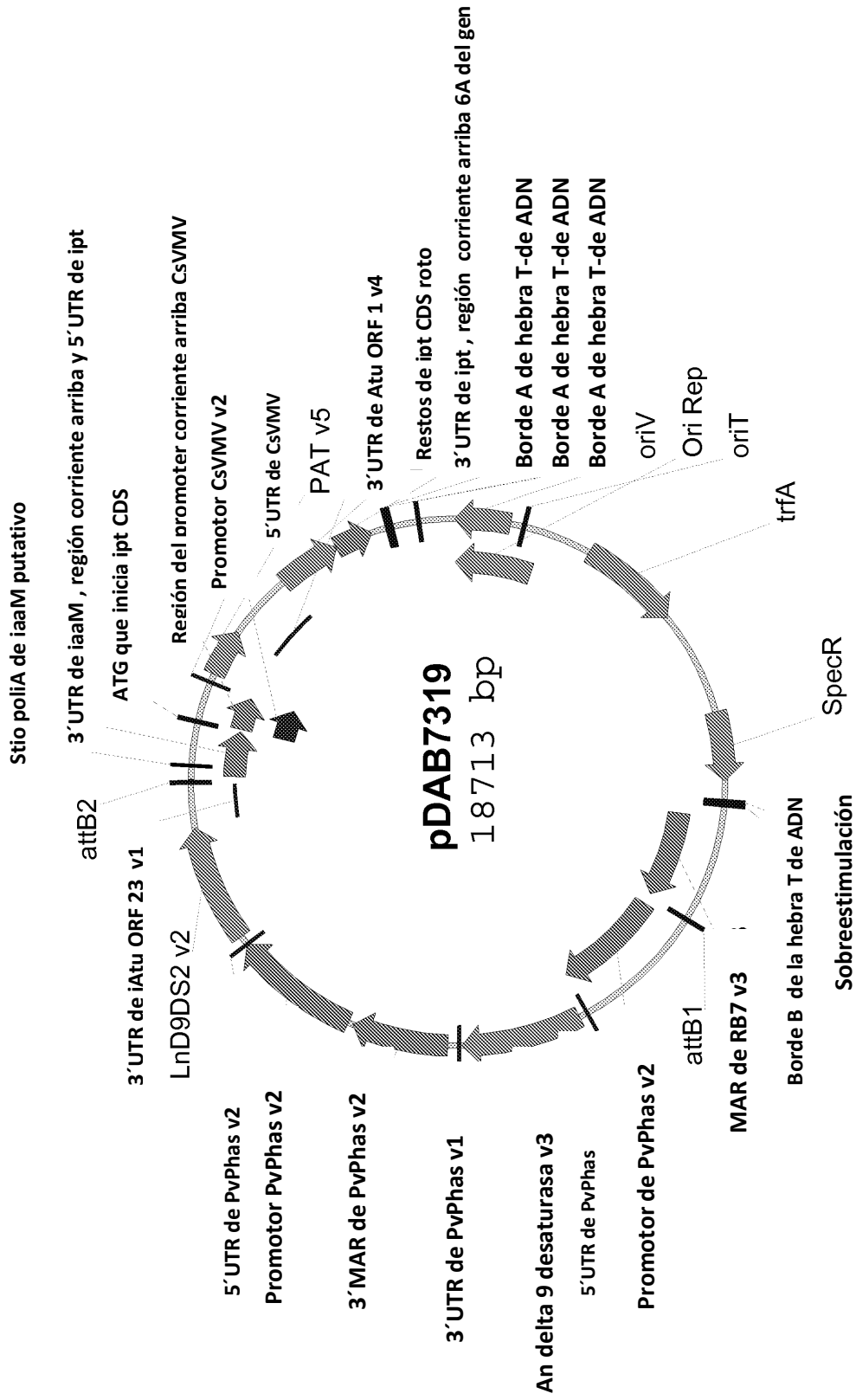


Fig. 7

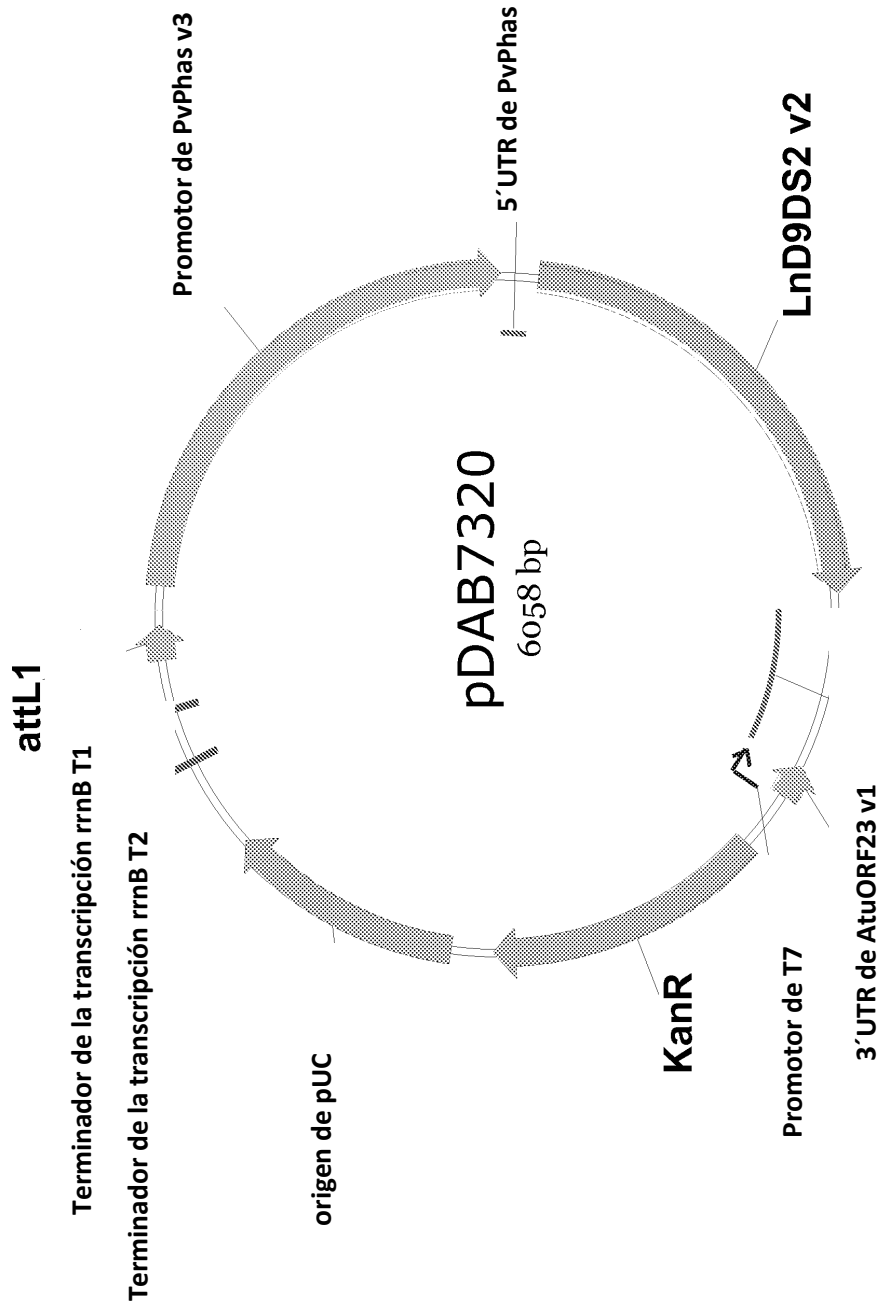


Fig. 8

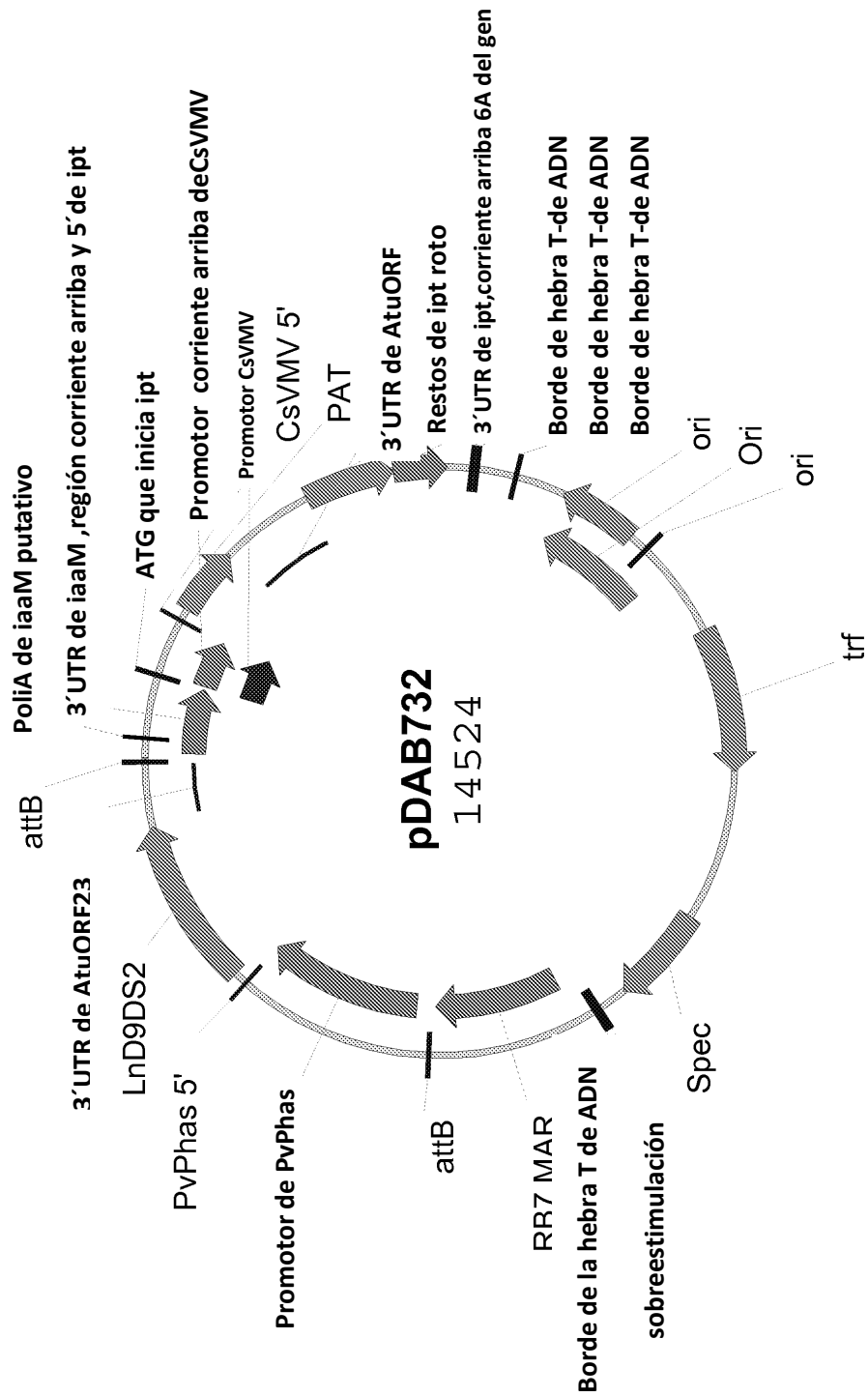


Fig. 9

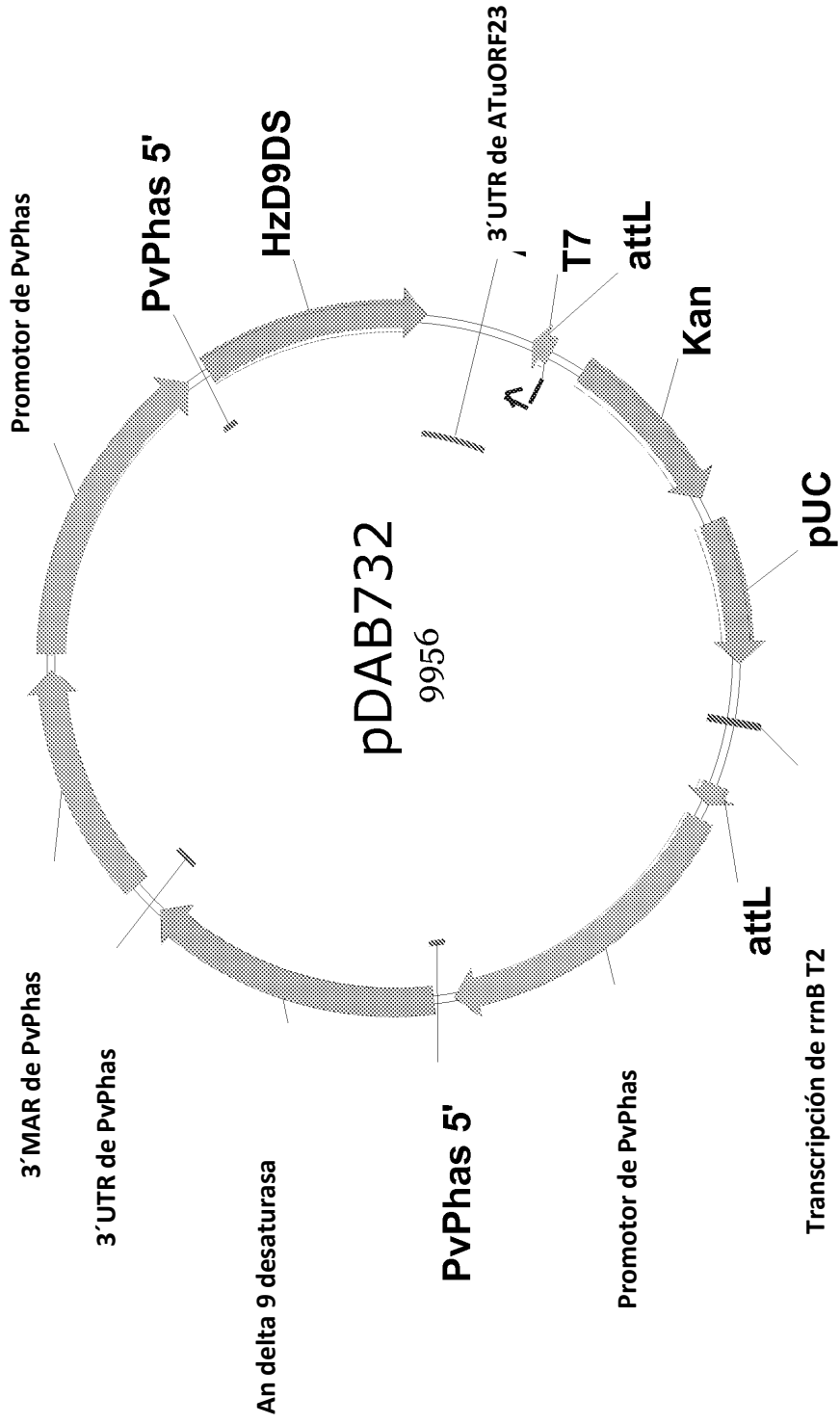


Fig. 10

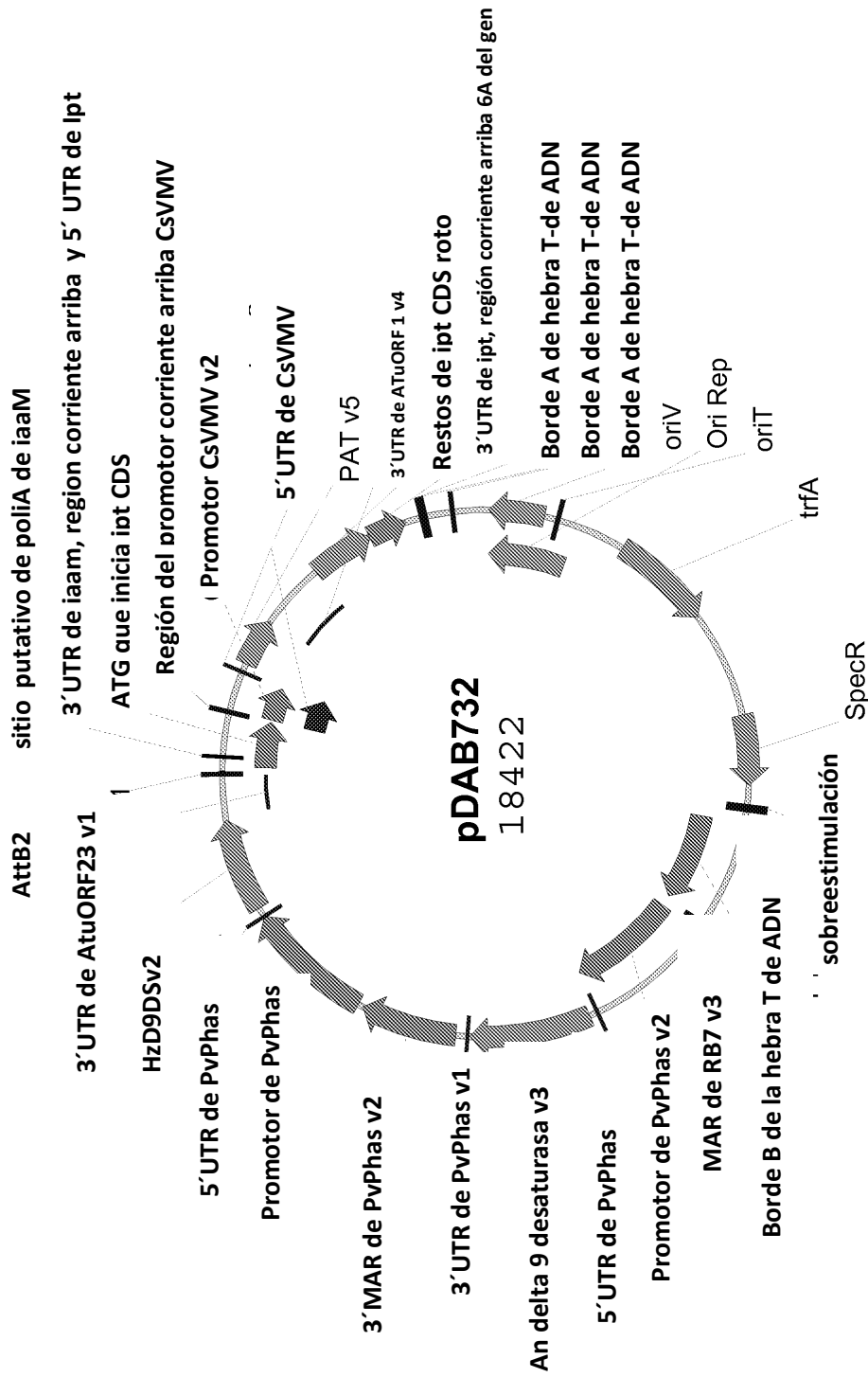


Fig. 11

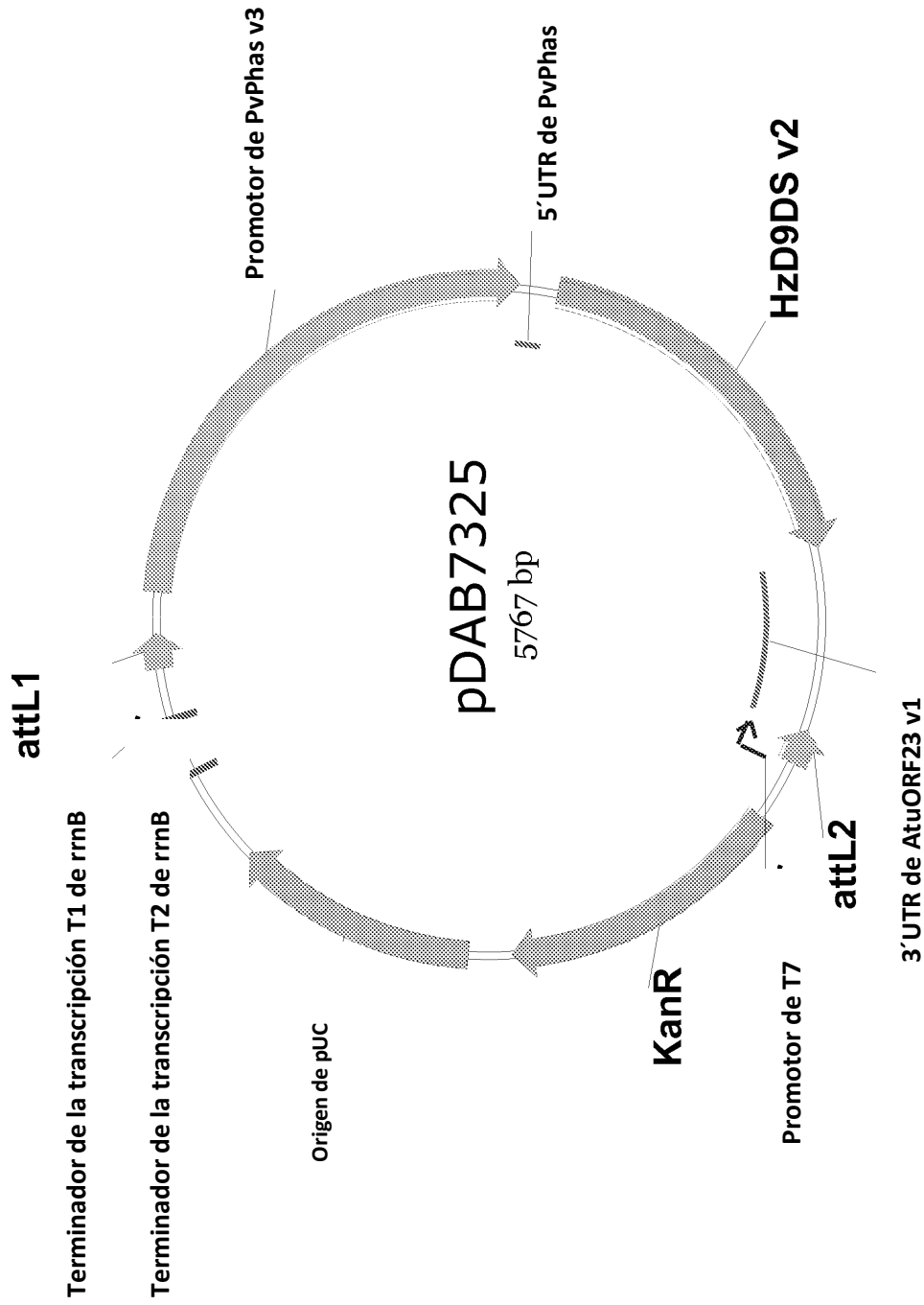


Fig. 12

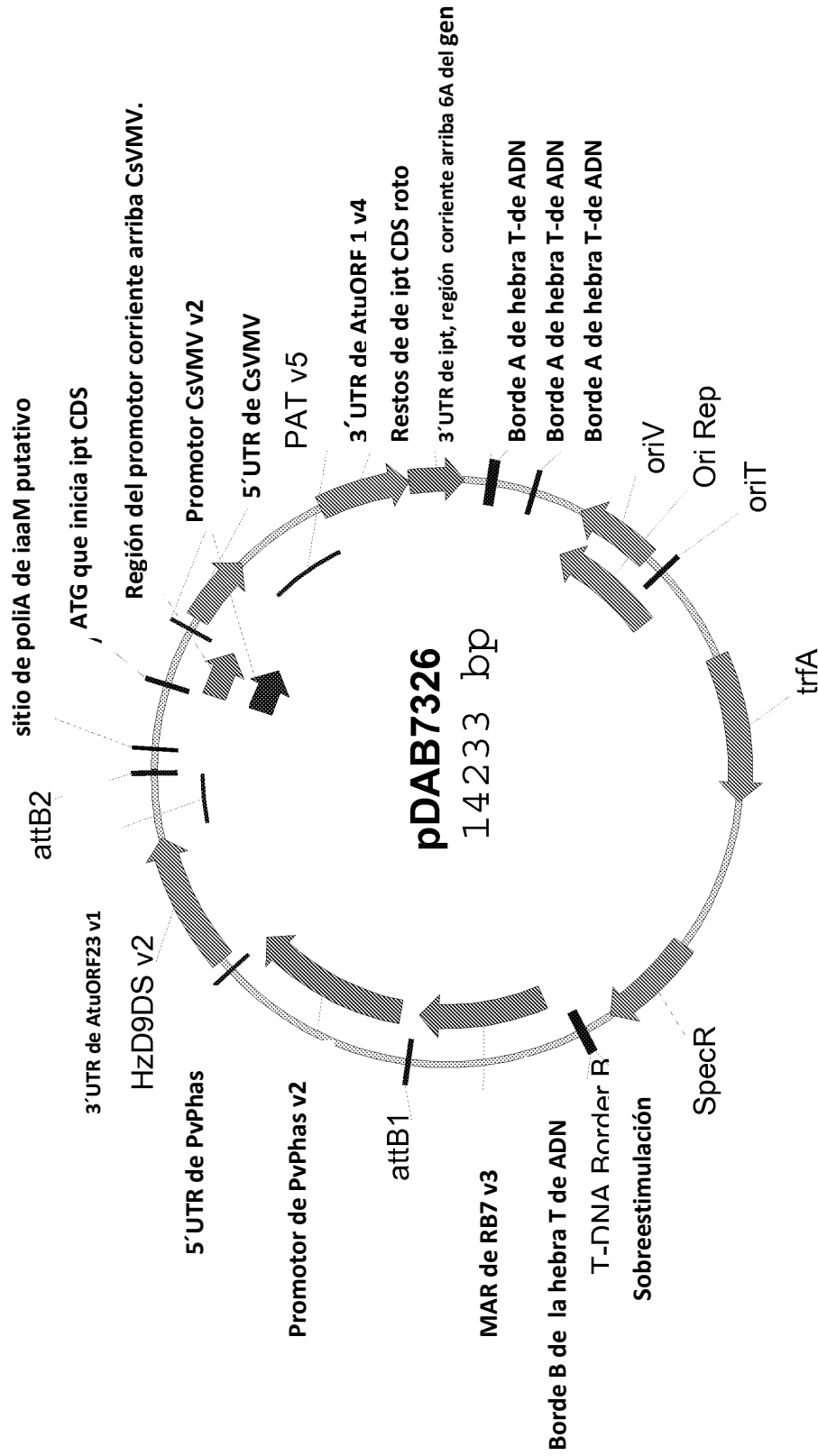


Fig. 13

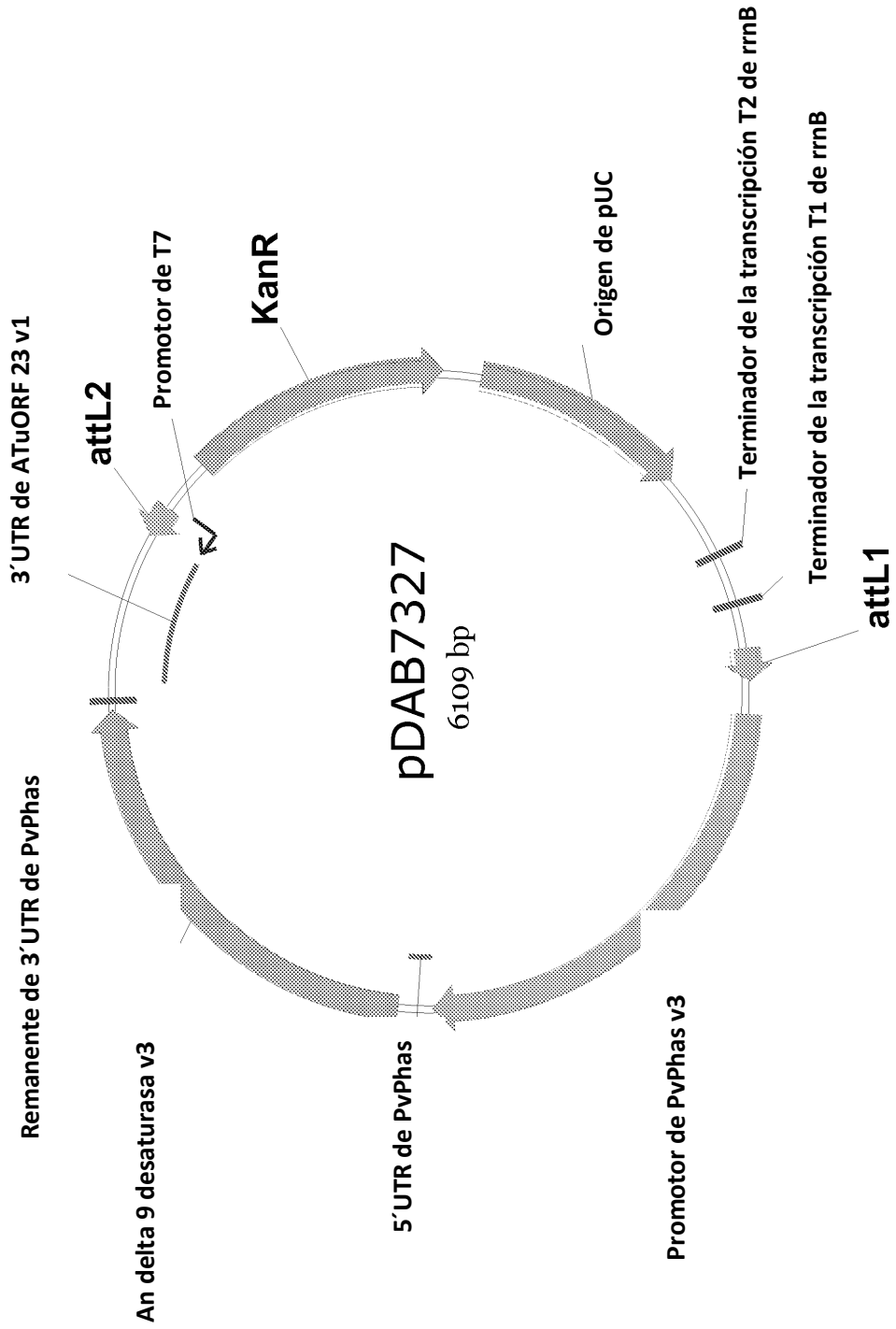


Fig. 14

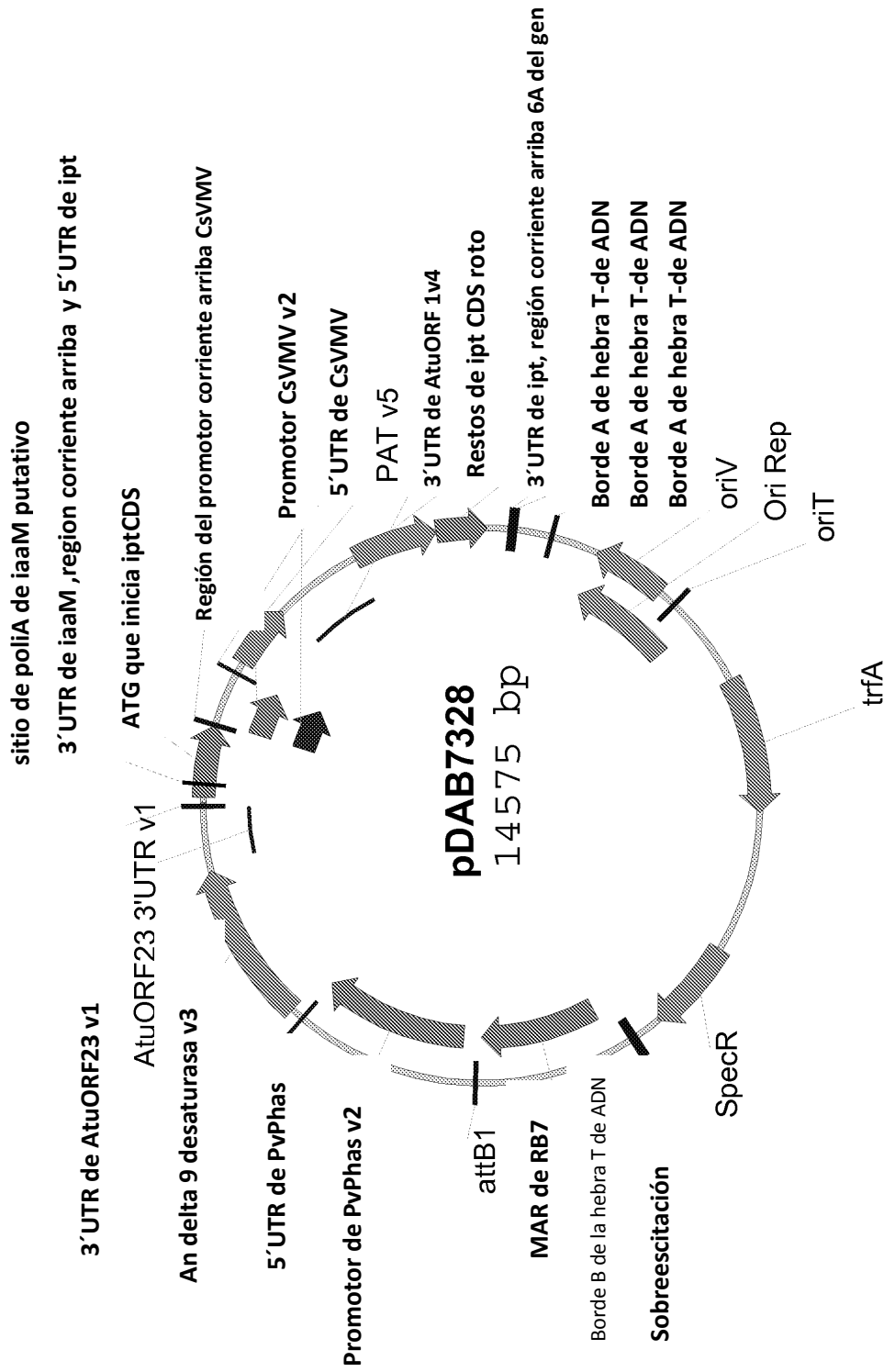


Fig. 15

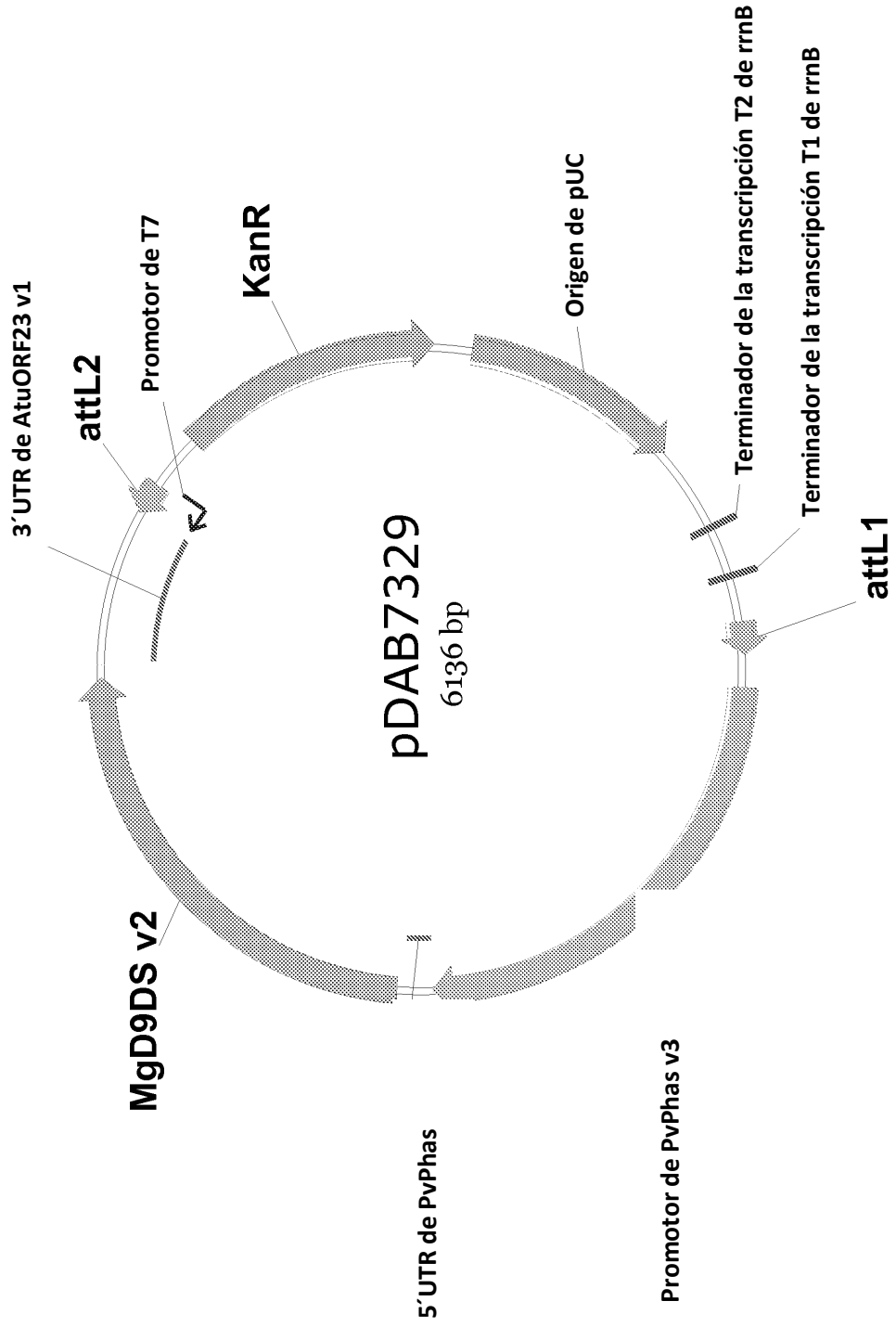


Fig. 16

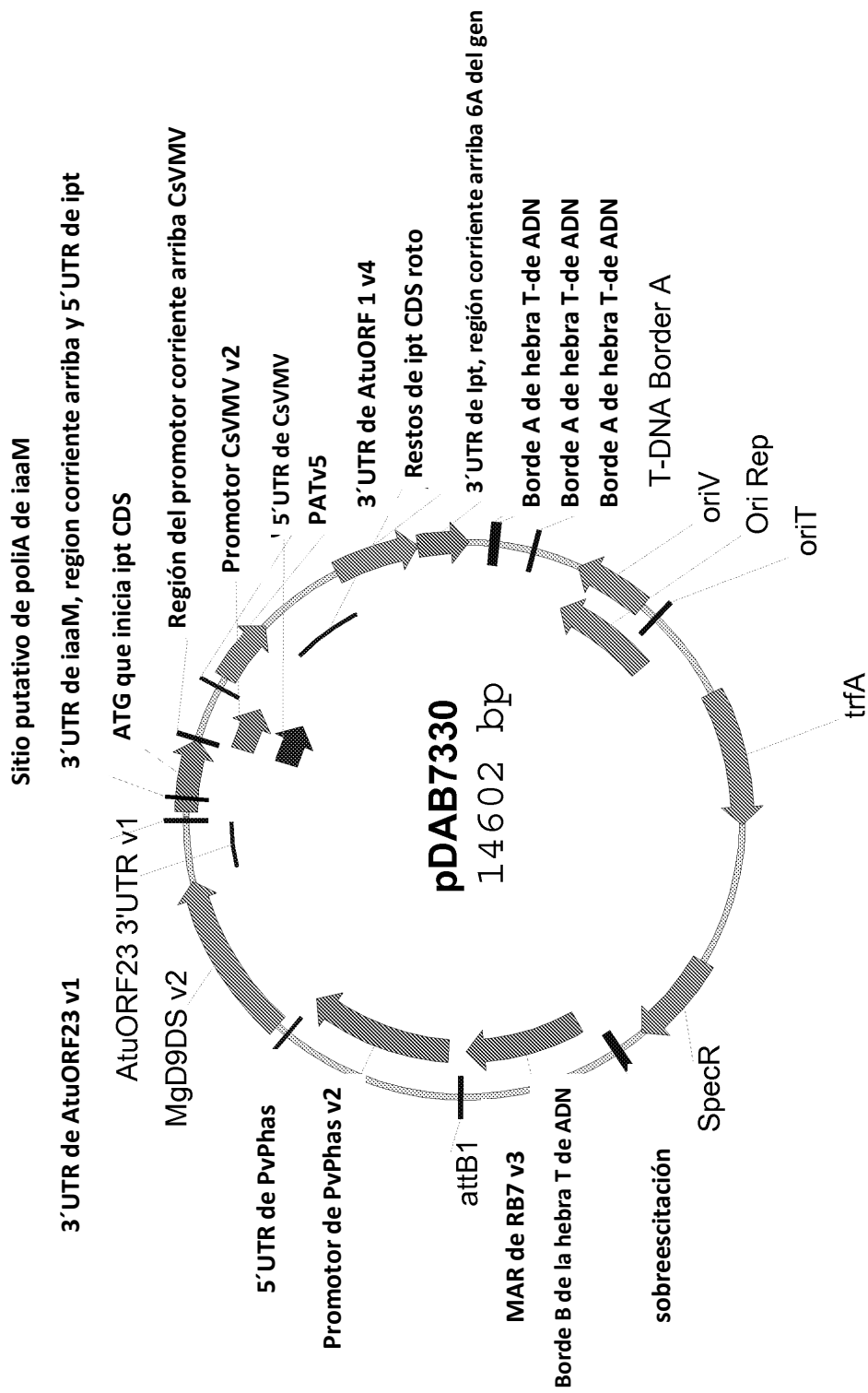


Fig. 17

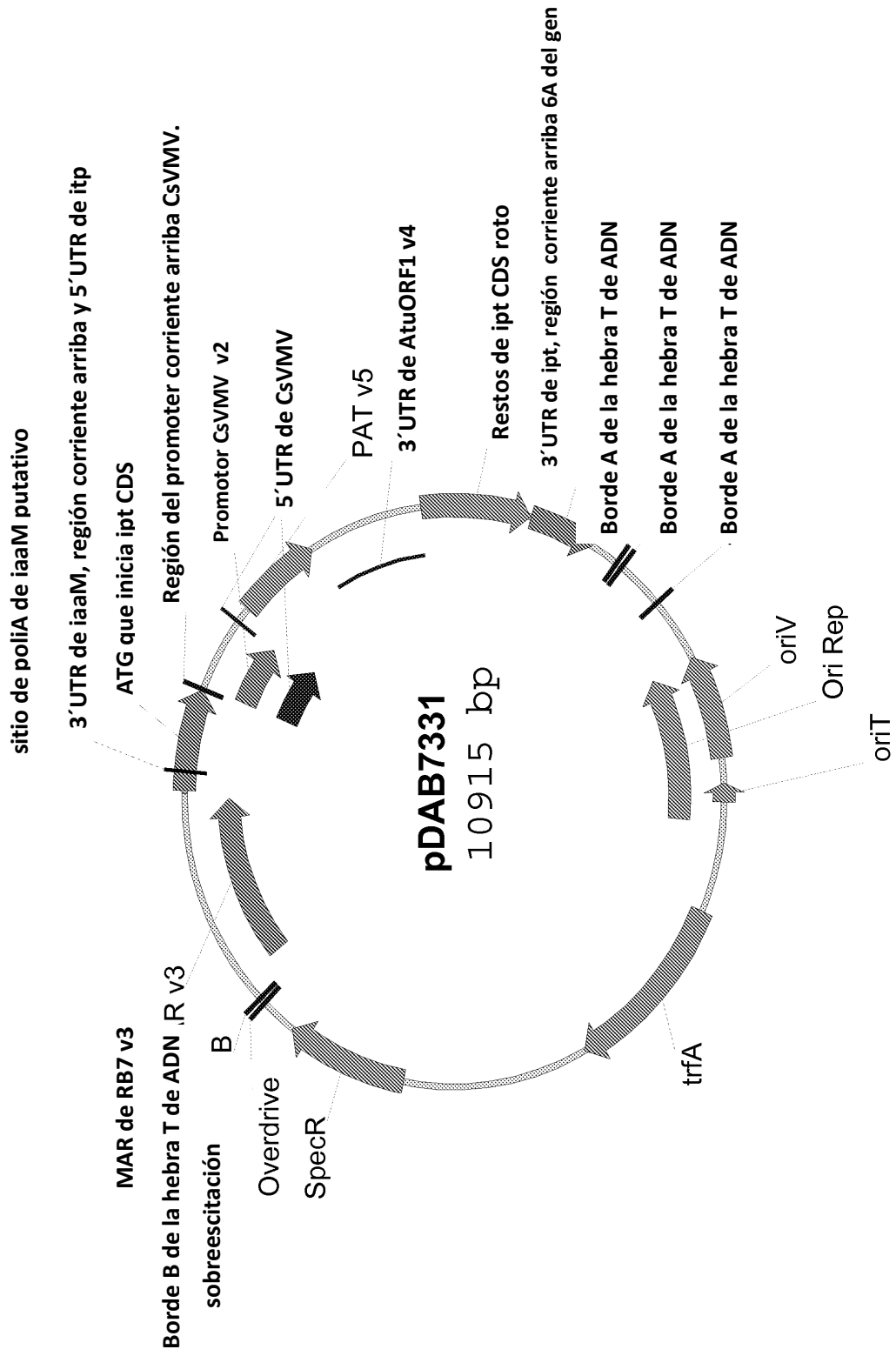


Fig. 18

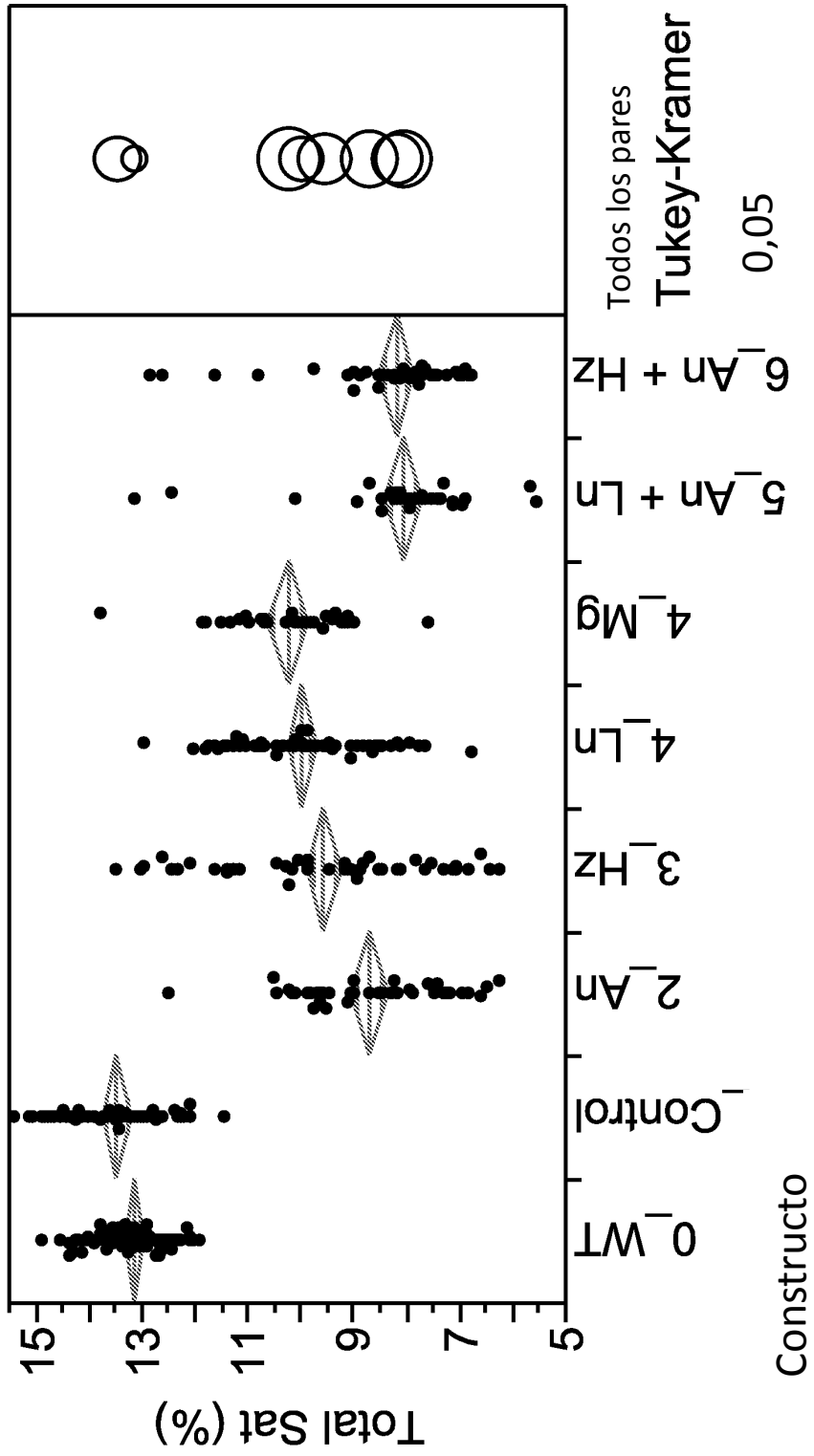


Fig. 19

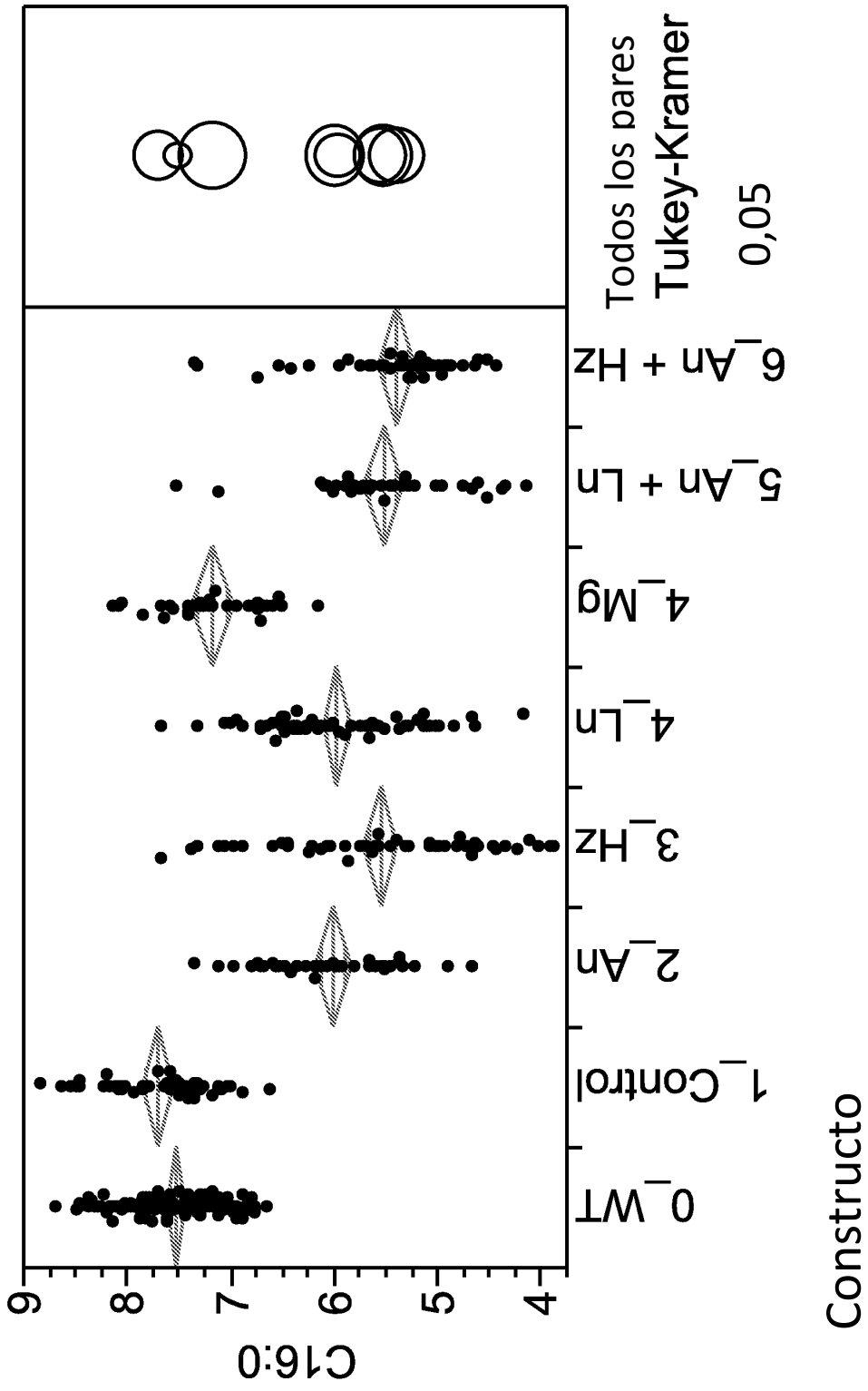


Fig- 20

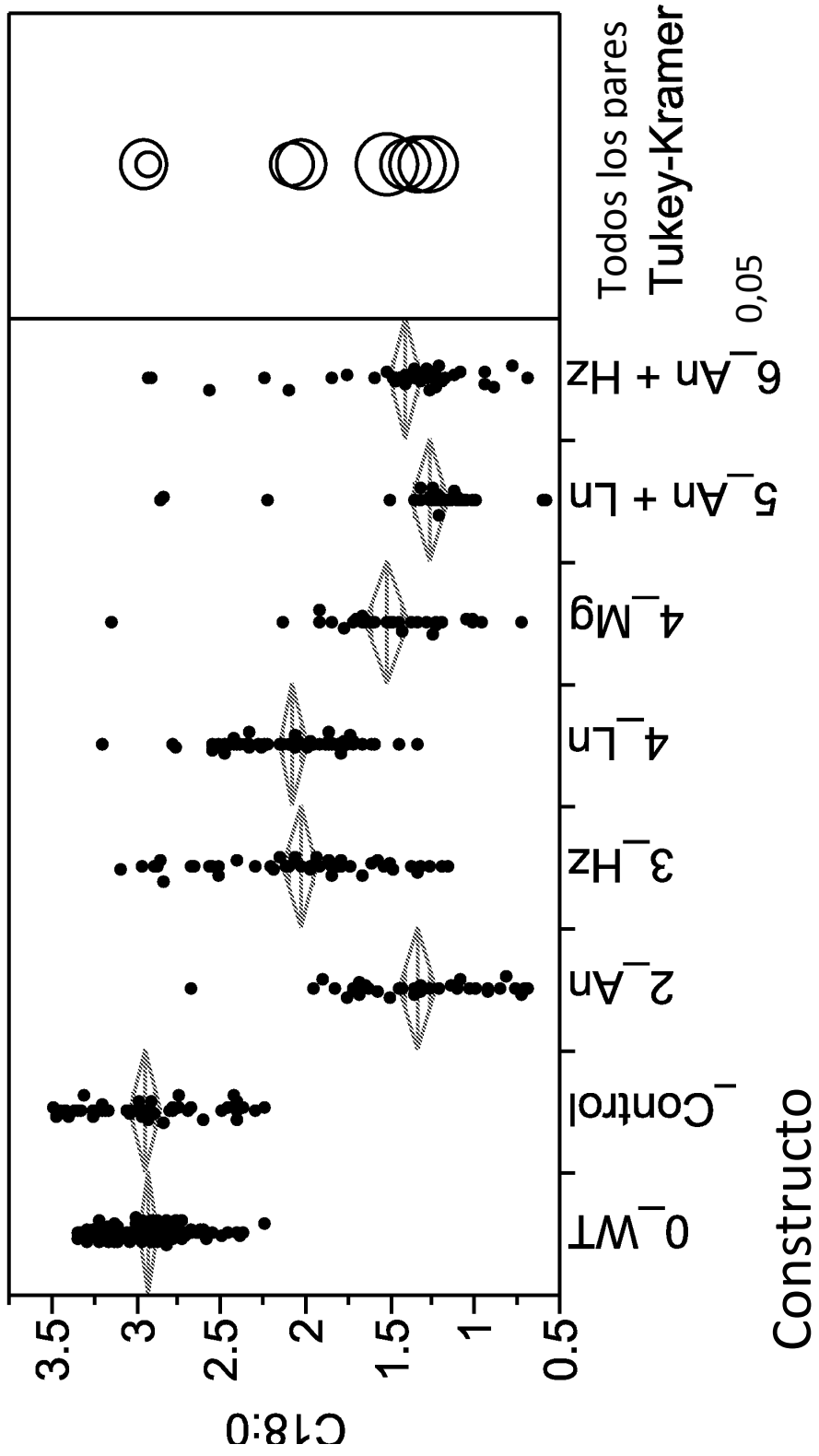


Fig. 21

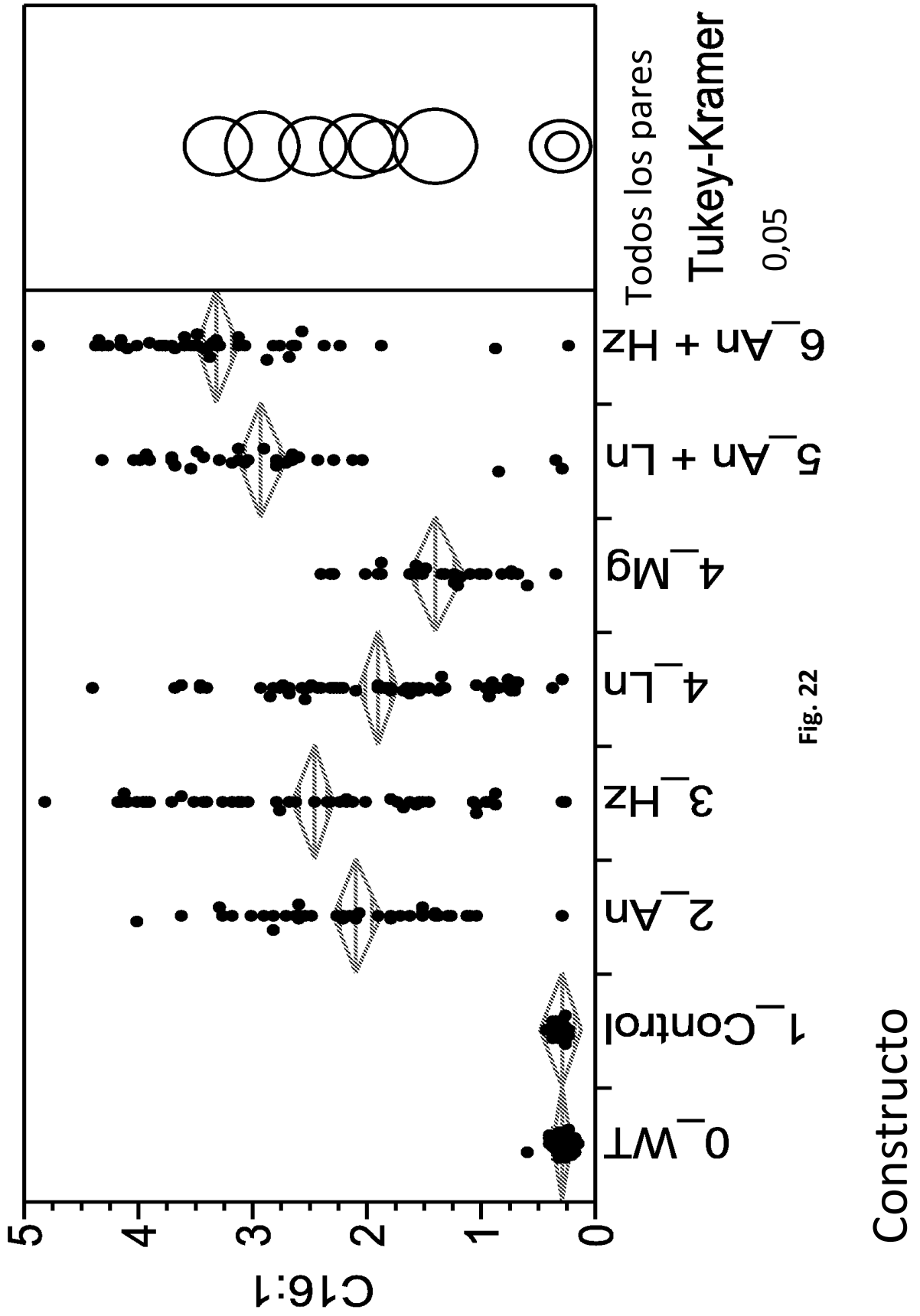


Fig. 22

