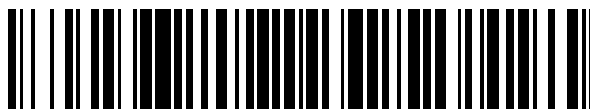


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 454**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 1/19 (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 14191880 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2862931**

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:

11.07.2017

73 Titular/es:

DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis, IN 46268-1054, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 454 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

La presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican ciertas enzimas delta-9 desaturasas, un polipéptido quimérico de delta-9-desaturasa, y métodos de expresar las mismas en una célula vegetal. Algunas realizaciones 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 realizaciones particulares.

Antecedentes de la invención

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.

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.

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).

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 erúico (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.

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.

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.

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 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 (Polashock *et al.* (1991) FASEB J. 5:A1157; Polashock *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 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.

Descripción de la invención

Se dan a conocer aquí ácidos nucleicos que codifican una nueva enzima delta-9 desaturasa fúngica; que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica dicha desaturasa y un elemento de regulación génica; y plantas o materiales vegetales (por ejemplo, semillas) que comprenden cualquiera de los anteriores. Aspectos de algunas realizaciones se ejemplifican por enzimas delta-9 desaturasas de hongos aisladas de *Magnaporthe grisea*, *Leptosphaeria nodorum* y *Helicoverpa zea*. Algunos ejemplos incluyen delta-9 desaturasas nativas y sintéticas que tienen una preferencia de sustrato por ácido palmítico o ácido esteárico.

Algunas realizaciones comprenden 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: 13 y además un elemento de regulación génica. En ejemplos particulares, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 45. Estas y otras realizaciones pueden incluir un polipéptido de delta-9 desaturasa aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de SEQ ID NO: 13, que comprende además un elemento de regulación génica. Una realización adicional de la invención es un polipéptido quimérico de delta-9 desaturasa que comprende SEQ ID NO: 72 y/o SEQ ID NO: 73, en el que el polipéptido comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

También se dan a conocer métodos de expresión de al menos uno de los ácidos nucleicos y/o polipéptidos mencionados anteriormente en una célula vegetal. Realizaciones particulares se aprovechan de la actividad de una enzima delta-9 desaturasa, de manera que la composición porcentual 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 realizaciones, 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.

Algunas realizaciones 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 vegetal 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 realizaciones 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 vegetal) 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 vegetal) para obtener una planta. En ejemplos particulares, una célula vegetal 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.

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

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.
- 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 este alineamiento.
- 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 realizaciones. 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 $\Delta\Delta C_t$ 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 realizaciones.
- 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).

5 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).

10 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.

15 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.

SEQ ID NOs:18-39 muestran la secuencia de cebadores y sondas que pueden ser útiles en algunas realizaciones.

20 SEQ ID NOs:40-43 muestra secuencias de Kozak alternativas a modo de ejemplo que pueden usarse para aumentar la expresión en algunas realizaciones.

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).

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).

25 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.

30 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).

SEQ ID NO:51 muestra la secuencia de aminoácidos de otra desaturasa AnD9DS a modo de ejemplo.

35 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 realizaciones.

SEQ ID NOs:67-71 incluyen varios elementos de control de regulación de ácidos nucleicos que pueden ser útiles en algunas realizaciones.

SEQ ID NO:72 muestra los 68 residuos N-terminales (1-68) de una desaturasa AnD9DS a modo de ejemplo.

40 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.

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.

- 5 Sólo las secuencias mencionadas en las reivindicaciones son un objeto de la presente invención.

Modo(s) de llevar a cabo la invención

I. Descripción general de varias realizaciones

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. 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 realizaciones de la presente invención, se dan a conocer polipéptidos de delta-9 desaturasa de hongos que tienen un rango de especificidades de sustrato. Realizaciones particulares incluyen una delta-9 desaturasa que prefiere el palmitato (es decir, una enzima fúngica nativa como se da a conocer 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 dan a conocer 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:10, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:45. De acuerdo con la invención, la molécula de ácido nucleico además comprende un elemento de regulación génica unido operativamente a la secuencia que codifica el polipéptido de delta-9 desaturasa. En realizaciones particulares, un elemento de regulación génica 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 mandioca, una región de unión a la matriz RB7 de *Nicotiana tabacum*, una secuencia de borde de hebra T, un promotor LfKCS3, y un promotor FAE 1.

También se da a conocer un polipéptido de delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia SEQ ID NO:13, así como moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos de delta-9 desaturasa. Un aspecto adicional de la invención es un polipéptido quimérico de delta-9 desaturasa que comprende SEQ ID NO: 72 y/o SEQ ID NO: 73, en el que el polipéptido comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En algunas realizaciones, 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. Realizaciones 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. Realizaciones 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 dados a conocer 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 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 dan a conocer plantas, materiales de plantas, células de plantas, y semillas obtenidas por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

II. Abreviaturas

x:yΔ ^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
55 CoA	coenzima A

	FA	ácidos grasos
	FAM	fluoresceína
	FAS	sintasa de ácidos grasos
	FAME	éster metílico de ácidos grasos
5	KASII	sintasa II de ACP β -cetoacilo
	MUFA	ácido graso monoinsaturado
	WT	tipo silvestre

III. Términos

10 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.

15 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.

20 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.

25 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 realizaciones son las acil-CoA delta-9 desaturasas.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 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, fosforamidados, 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.

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).

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.

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.

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

A. Visión general

Una realización de la invención presente incluye introducir delta-9 desaturasas 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

Los polipéptidos según algunas realizaciones de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que muestra identidades con porcentaje aumentado cuando se alinea con una secuencia de SEQ ID NO:13. Secuencias de aminoácidos específicos dentro de estas y otras realizaciones pueden comprender secuencias que tienen, por ejemplo, al menos 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 la secuencia antes mencionada. Una realización es un polipéptido quimérico de delta-9 desaturasa que comprende SEQ ID NO: 72 y/o SEQ ID NO: 73, donde el polipéptido comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En muchas realizaciones, 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

Algunas realizaciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido descrito anteriormente. Por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos en algunas realizaciones muestran el aumento de porcentaje de identidad cuando se alinean con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:45. Secuencias de ácido nucleico específicas dentro de esta y otras realizaciones 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:10, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:45. 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.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención comprenden un elemento de regulación génica (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 7Sα de β-conglicinina 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, estearoil-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 ARNm 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

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 codón 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 codón 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 realizaciones 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 realizaciones 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:10, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:45. 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 Nº 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 penicillinas, 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 fosfinotricina, bialafos, y mecanismos positivos de selección (Joersbro et al. (1998) Mol. Breed. 4:111-7), y son considerados dentro del alcance de las realizaciones 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 dados a conocer 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.

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.

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 inmunoabsorción 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.

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; McKently et al. (1995) Plant Cell Rep. 14:699-703); papaya; y guisante (Grant et al. (1995) Plant Cell Rep. 15:254-8).

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.

Cualquier planta puede escogerse para uso con los métodos dados a conocer 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.

E. Semillas transgénicas

- 5 De acuerdo con la invención, una semilla transgénica puede comprender un polipéptido de delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia SEQ ID NO:13. Una realización particular es un polipéptido quimérico de delta-9 desaturasa que comprende SEQ ID NO:72, y/o SEQ ID NO:73, en donde el polipéptido comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78. En estas y otras realizaciones, la semilla transgénica puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:45. En ciertas realizaciones, 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.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones específicas. Los ejemplos que se refieren a secuencias mencionadas en las reivindicaciones anejas indican realizaciones particulares de la presente invención.

20 Ejemplos

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

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 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 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 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 (Machery-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.

- 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 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 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*.

- 55 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 (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 reversionaron 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.

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.

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 supercódigo 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 supercódigo 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' *Bam*HI, y el cebador inverso contenía codones de parada en tres marcos de lectura y un lugar *Nco*I 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 *Bam*HI y *Nco*I. 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 reversionaron 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).

- 5 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).
- 10 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
- 15 + 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

- 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).
- 20 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
- 25 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*.

- Las especificidades de sustrato de las CoA desaturasas MgD9DS, LnD9DS-1 y LnD9DS-2 expresadas en las cepas complementadas OFY093 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.

- 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.

- 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			

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.

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 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.

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.

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)
HzD9DS	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)
<i>ole1</i>	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)

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 HzD9DS y *ole1*, mientras que AnD9DS y MgD9DS producen cantidades relativamente altas de C18:1.

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 HzD9DS, 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)
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 desaturasas 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 desaturasas 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

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

- 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.
- 30

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	LYS (K)	AAA	44,6	44,6
	CGC	8,9	DNU		AAG	55,4	55,4
	CGG	8,6	DNU	MET (M)	ATG	100,0	100,0
	CGT	18,6	25,7	PHE (F)	TTC	58,6	58,6
ASN (N)	AAC	62,6	62,6		TTT	41,4	41,4
	AAT	37,4	37,4	PRO (P)	CCA	29,6	29,6
ASP (D)	GAC	42,5	42,5		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	SER (S)	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							

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.

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 dobletes TA y CG, y aumentar la frecuencia de dobletes TG y CT. Además de estos dobletes, 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.

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

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
CYS (C)	TGC	1	100,0	0	0,0	49,2		CCT	8	50,0	6	37,5	37,3
	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) 16	GAA	7	63,6	5	45,5	43,6	THR (T)	ACA	3	16,7	5	27,8	26,3
	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

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
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
	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. 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
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
	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

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
CYS (C)	TGC	4	80,0	2	40,0	49,2		CCT	5	27,8	7	38,9	37,3
	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) 16	GAA	5	33,3	7	46,7	43,6	THR (T)	ACA	11	44,0	7	28,0	26,3
	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 I
	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

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
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
	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 desaturasas están conectados por secuencias cortas adicionales intervinientes. Las dos secuencias de PTU desaturasas 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 nervadura de mandioca (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 desaturasas 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 desaturasas están conectados por secuencias intervinientes cortas adicionales. Las dos secuencias de PTU desaturasas 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.

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 fosfinotricina 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.

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.

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 fosfinotricina 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.

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.

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 fosfinotricina 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.

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.

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 fosfinotricina 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.

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 $\mu\text{moles/m}^2$ 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) desaturasas 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 desnaturizado 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.

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 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 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.

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[™].

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.

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 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.

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 micrograms (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%.

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.

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).

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

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 desaturasa 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 desaturasa 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

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 desaturasa 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.

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. 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.

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	
AntiLnD9DS2F	SEQ ID NO:25	Propósito
	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	

- 5 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.
- 10
- 15 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.
- 20
- 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 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.
- 30

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.

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.

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 (CIP) 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.

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*

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).

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.

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

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.

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.

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.

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 CTACTGGTATTGTGCTCGACT	SEQ ID NO:38 CTCTCTCGGTGAGAATCTTCAT	SEQ ID NO:39 CACGCTATCCTCCGTCTCGATC

Diana	Etiqueta
AnD9Ds	FAM
HxD9Ds	FAM
LnD9Ds	FAM
Actina	Tx-Red

Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en un cicladore 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).

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.

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 desaturasas 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 desaturasas 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 recomendado de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomendado 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	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomendado de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomendado de planta
CYS (C)	TGC	1	100,0	1	100,0	100,0		CCT	8	50,0	0	0,0	0,0
	TGT	0	0,0	0	0,0	0,0	SER (S)	AGC	2	12,5	0	0,0	0,0
END	TAA	1	100,0	0	0,0	0,0		AGT	1	6,3	0	0,0	0,0
	TAG	0	0,0	0	0,0	0,0		TCA	1	6,3	1	6,3	0,0
	TGA	0	0,0	1	100,0	100,0		TCC	6	37,5	0	0,0	0,0
GLN (Q)	CAA	2	33,3	6	100,0	100,0		TCG	3	18,8	0	0,0	0,0
	CAG	4	66,7	0	0,0	0,0		TCT	3	18,8	15	93,8	100,0
GLU (E)	GAA	7	63,6	0	0,0	0,0	THR (T)	ACA	3	16,7	0	0,0	0,0
16	GAG	4	36,4	11	100,0	100,0		ACC	7	38,9	18	100,0	100,0
GLY (G)	GGA	8	40,0	20	100,0	100,0		ACG	4	22,2	0	0,0	0,0
	GGC	6	30,0	0	0,0	0,0		ACT	4	22,2	0	0,0	0,0
	GGG	2	10,0	0	0,0	0,0	ITRP (W)	TGG	14	100	14	100	0,0
	GGT	4	20,0	0	0,0	0,0	TYR (Y)	TAC	12	80,0	15	100,0	100,0
HIS (H)	CAC	11	73,3	15	100,0	100,0		TAT	3	20,0	0	0,0	0,0
	CAT	4	26,7	0	0,0	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	Opt recomendado de planta	Aminoácido	Codón	Número de gen nativo	% Gen nativo	Número de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt recomendado de planta
ILE (I)	ATA	3	15,0	1	5,0	0,0		GTC	5	26,3	0	0,0	0,0
	ATC	10	50,0	19	95,0	100,0		GTG	13	68,4	0	0,0	0,0
	ATT	7	35,0	0	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. de gen nativo	% Gen nativo	Núm. de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de planta recomendado	Amino ácido	Codón	Núm. gen nativo	% Gen nativo	Núm-de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de planta recomendado
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

Amino ácido	Codón	Núm. de gen nativo	% Gen nativo	Núm. de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de planta recomendado	Amino ácido	Codon	Núm. gen nativo	% Gen nativo	Núm-de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de planta recomendado
CYS (C)	TGC	4	80,0	5	100,0	100,0		CCT	5	27,8	0	0,0	0,0
	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

Amino ácido	Codón	Núm. de gen nativo	% Gen nativo	Núm. de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de planta recomendado	Amino ácido	Codon	Núm. gen nativo	% Gen nativo	Núm-de gen opt de planta	% Gen opt de planta	Opt de planta recomendado
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
	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.

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.

La adición ya sea de un Myc o de la etiqueta del epítipo 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 epítipos 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.

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.

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.

Los aspectos de la invención son:

1. 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 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.

2. La molécula de ácido nucleico del aspecto 1, 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: 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 y SEQ ID NO: 45.

3. La molécula de ácido nucleico del aspecto 1, que comprende además un elemento de regulación génica.

4. La molécula de ácido nucleico del aspecto 3, en la que el elemento de regulación génica se selecciona del grupo que consiste en el promotor de delta-9 desaturasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el 3'UTR/terminador 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 de unión a matriz de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, la región 3' no traducida de ORF23 de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor del virus del mosaico de nervadura de mandioca, la región 3' no traducida de ORF1 3' de *Agrobacterium tumefaciens*, la región de unión a la matriz de *Nicotiana tabacum* RB7, la secuencia Overdrive, las secuencias de borde de la cadena T, el promotor LfKCS3, el promotor FAE1, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43, una etiqueta Myc y una etiqueta de hemaglutinina.

5. Una enzima delta-9 desaturasa aislada que comprende una secuencia de aminoácidos 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.

6. Un polipéptido quimérico de delta-9 desaturasa que comprende SEQ ID NO: 72 y/o SEQ ID NO: 73, donde el

polipéptido comprende además una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78.

7. Un método para disminuir la cantidad de ácidos grasos saturados en una célula, comprendiendo el método:

5 transformar una célula con la molécula de ácido nucleico del aspecto 1, de manera que disminuye la cantidad de ácidos grasos saturados en la célula.

8. El método de acuerdo con el aspecto 7, en el que la célula es una célula de levadura.

9. El método de acuerdo con el aspecto 7, en el que la célula es una célula vegetal.

10. El método según el aspecto 9, que comprende transformar la célula vegetal con más de una molécula de ácido nucleico del aspecto 1.

10 11. El método según el aspecto 9, en el que la transformación de la célula vegetal introduce en la célula vegetal un medio para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula vegetal.

12. El método según el aspecto 11, en el que los medios para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula vegetal son una desaturasa extraplastidial.

15 13. El método del aspecto 12, en el que la desaturasa extraplastidial es una desaturasa seleccionada del grupo que consiste en LnD9DS desaturasa, AnD9DS desaturasa, HzD9DS desaturasa y MgD9DS desaturasa.

20 14. El método según el aspecto 9, en el que la célula vegetal se obtiene de una planta seleccionada de un género seleccionado del grupo que consiste en *Arabidopsis*, *Borago*, *Canola*, *Ricino*, *Theobroma*, *Zea*, *Gossypium*, *Crambe*, *Cuphea*, *Linum*, *Lesquerella*, *Limnathes*, *Linola*, *Tropaeolum*, *Oenothera*, *Olea*, *Elaeis*, *Arachis*, *colza*, *Carthamus*, *Glycine*, *Soja*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Vernonia*, *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Sorghum*, *Secale* y los demás miembros de las *Gramineae*.

15. Una planta de semilla oleaginosa que comprende la secuencia de ácido nucleico del aspecto 1.

16. Una semilla de una planta que expresa una desaturasa extraplastidial 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 y SEQ ID NO: 52.

25 17. Una semilla de una línea transgénica de *Brassica napus*, semilla que tiene unos niveles disminuidos de 16:0, con relación a una versión isogénica de la línea transgénica de *Brassica napus*.

18. Un método para crear una planta genéticamente modificada que comprende cantidades disminuidas de ácidos grasos saturados en la planta en comparación con la planta de tipo silvestre, comprendiendo el método:

transformar material vegetal con la molécula de ácido nucleico del aspecto 1; y

cultivar el material vegetal transformado para obtener una planta.

30 19. El método del aspecto 18, en el que la planta se selecciona de un género seleccionado del grupo que consiste en *Arabidopsis*, *Borago*, *Canola*, *Ricino*, *Theobroma*, *Zea*, *Gossypium*, *Crambe*, *Cuphea*, *Linum*, *Lesquerella*, *Limnathes*, *Linola*, *Tropaeolum*, *Oenothera*, *Olea*, *Elaeis*, *Arachis*, *colza*, *Carthamus*, *Glycine*, *Soja*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Vernonia*, *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Sorghum*, *Secale* y los otros miembros de las *Gramineae*.

20. Una planta obtenida por el método del aspecto 18.

35 21. Un material vegetal obtenido de la planta del aspecto 20.

22. El material vegetal de aspecto 21, en el que el material vegetal es una semilla.

Listado de secuencias

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

<120> Reducción del 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 ggcttgagca cccggaacag g 41

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

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

<400> 3

gaattcatgg ctctgtcatc ttcttccgtg ccggagttgg ctgccgcctt ccctgatggc 60
 actaccgact tcaagcccat gaggaacacc aagggtacg acgtcagcaa gccgcacatt 120
 tccgagacac ctatgacact caagaactgg cataagcacg tcaactggct caacaccacc 180
 ttcatcttgt ttgtgcccct ggctgggtctc 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
 aggcctcgtt tccgctcaaa atctaccttg ccgccgttgg cgctgggtgcc gtcgagggct 480

ES 2 623 454 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 gcttgccac tggctcggtg 840
 accagccttt cgacgatcgc aactcgccgc gtgatcacgt catcacagcc ctggtcaccc 900
 ttggagaggg ataccacaac ttccaccacg agttcccttc ggactaccgc aacgctattg 960
 agtggtagca gtatgacccc accaagtggg caatctggat ctggaagcag cttggtcttg 1020
 cccacaacct gaagcagttc cgccaaaacg agattgagaa gggacgcgtc cagcagctgc 1080
 agaagaagct cgaccagaag cgcgccaagc ttgattgggg tattcccttg gagcagcttc 1140
 ccgttgtagt 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 cgcgcccagt ccgaaaacaa ggacgtctca accgtcgttg 1440
 attcttcggg taaccgcatc gtccgcgcgg gtgggcaagc gaccaaggctc gtccagcctg 1500
 ttccgggtgc tcaggccgcg tga 1523

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

<220>
 <223> Clon de MgD9Ds sin intrones

<400> 4

atggcttcgt catcttctc cgtgccggag ttggtgccg ccttccctga tggcactacc 60
 gacttcaagc ccatgaggaa caccaagggc tacgacgtca gcaagccgca catttccgag 120
 acacctatga cactcaagaa ctggcataag caggtcaact ggctcaacac caccttcac 180
 ttgtttgtgc ccttggctgg tctcatatcc acttactggg tccctctgca gtggaagacg 240
 gctgtatggg ctgtcgtcta ctacttcaac accggcctgg gaattactgc cggttaccac 300
 cgactttggg ctcacagctc gtacaaggcc tcgcttccgc tcaaatcta ccttgccgcc 360
 gttggcgctg gtgccgtcga gggctccatc agatggtggg ccaacggtca ccgcgcacac 420
 caccgataca ccgataccga gaaggacccc tactcagtc gcaagggtct cctgtactca 480
 cacatgggat ggatgcttct gaagcagaac cccaagaagc agggccgcac cgacatcacc 540
 gacctgaacg aggaccccggt tgtcgtttgg cagcaccgca acttccctcaa gtgtgttatc 600
 ttcatggccc tcgtcttccc cacacttggt gctggccttg gctggggtga ctactgggga 660

ES 2 623 454 T3

ggtttcatct acggaggtat tctgctgtc ttcttcgtcc agcaggccac cttctgcgtc 720
 aactcgcttg cccactggct cggtgaccag ctttcgacg atcgcaactc gccgcgtgat 780
 cacgtcatca cagccctggc cacccttggg gagggatacc acaacttcca ccacgagttc 840
 ctttcggact accgcaacgc tattgagtgg taccagtatg accccaccaa gtggtcaatc 900
 tggatctgga agcagcttgg tcttgccac aacctgaagc agttccgcca aaacgagatt 960
 gagaaggagc gcgtccagca gctgcagaag aagctcgacc agaagcgcgc caagcttgat 1020
 tgggggtattc ctttgagca gcttccggtt gttagctggg atgactttgt tgagcagtc 1080
 aagaacggaa aggccttggat tgcagttgcc ggtgtcatcc acgatgttgg tgacttcac 1140
 aaggaccacc ctgggtggcag agctctcatc aactcggcca ttggcaagga cgcaaccgca 1200
 atcttcaacg gcggtgttta caaccactcc aacgccgtc acaacctgct ctcgactatg 1260
 cgtgtgggtg ttttgctggc cggctgcgag gttgagatct ggaagcgcgc ccagtccgaa 1320
 aacaaggacg tctcaaccgt cgttgattct tcgggtaacc gcacgtccg cgcggtggg 1380
 caagcgacca aggtcgtcca gcctgttccg ggtgctcagg ccgcgtga 1428

<210> 5

<211> 1997

<212> ADN

<213> *Leptosphaeria nodorum*

<400> 5

cccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgcgcg 60
 caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct 120
 tccggtcgt atgttggtgt gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta 180
 tgaccatgat tacgccaagc tcgaaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggagct 240
 ccaccgcggt ggcggccgct ctagaactag tggatccccc gggctgcagg aattcggcac 300
 gagtatgcct tcccaccagg ctgttgctgg catgcaggcc atcgaccccg agtttgtaaa 360
 gcagccgtct cctatggcga gcacctcga gcccaaccgc aactccaagt acgatcctaa 420
 gaagccgcac attacagaca tgcccatcac gcggtcaaac tgggtaccagc atgtcaactg 480
 gctcaacgct atcttcatca tcggcgtgcc tctcgtggc tgcgtcgccg cttctggac 540
 ccctctgcag tggagaccg ctgcgtggc tgcatctac ttttctgga ctggcctcgg 600
 tatcaccgcc ggataccatc gtctctgggc acacaagtca tacaacgccg gtcttctct 660
 gaggatctgg ctgcgccgct tcggcgtgg tgctgttgag ggttccatcc gctggtggag 720
 ccgtgaccac cgcgccacc accgctacac cgacaccaac aaggaccct acagtgtccg 780
 caaggccctt ctctacagcc atctcggatg gatggctatg aagcagaacc ccaagcgtat 840
 cggccgcacc gacatcaccg acttgaacga ggacccggt gtcgtctggc agcacaagaa 900
 ctacatcaag gccgtcgtca ccatgggctt gatctttccc tctgccgtc cggtctcat 960
 gtggggcgat tggatgggtg gcttcatcta cgctggtatc ctccgtatct tcttcgtcca 1020
 gcaggccacc ttctgcgtca actcgttgc tcaactggctc ggtgaccagc ctttcgacga 1080

ES 2 623 454 T3

ccgcaactct cctcgtgacc acgtcattac cgctcttgte actctcggag agggctacca 1140
caacttccac cagcagttcc cctccgacta ccgcaacgcc atcgagtggc accagtacga 1200
ccctaccaag tgggtccatct ggctgtggag caagctcggc ctgcctcca acctcaagca 1260
gttccgctcc aacgaaatcg agaagggctg tgtccagcag ctccagaaga agattgacca 1320
gaagcgcgcc aagctcgact ggggtgtccc tctcgaccag ctgcctgtca tagaatggga 1380
cgactatgtc gagcaggcca agaacggccg tggctctatc gctgtcgtg gtgtcgttca 1440
tgacgttacc gacttcatca acgagcacc cgggtggcaag acgcttatca agagcggcgt 1500
tggcaaggat gccaccgcca tgttcaacgg cgggtgtctac ttccactcca acggagccca 1560
caacctcctt tctaccatga ggggttggtgt catccgcggg ggctgtgaag ttgagatctg 1620
gaagcgcgct cagcgtgaga acaaggatgt cggctctggc ctggacgacg caggcaaccc 1680
aatcatcagg gctggttaacc agattaccaa ggttgcgcaa cccattcaga gtgctagtgc 1740
agcatagatt ggatcttcat cttcacgagc gatgtatggc gtttggttgt ctctcttctt 1800
tggcggacag agtaatatc aatttcttag cgatcgtag aaagcatcat ggttacgatg 1860
ctcagtcagt ttagatggcg 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>
10 <223> Cebador directo Lnd9FAD2F

<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 aactggtata agaagataaa ttggctcaac 120

35

ES 2 623 454 T3

acgacgctgg tgggtgctcat acccgctctt ggactctacc taacacgcac cagccactt 180
acacgaccta cgctcatctg gtccgtcctg tactacttct gcacagcttt cggcatcaca 240
ggcggatata atcgactatg gagtcacgc agctactccg ctgctctacc gctacgctta 300
ttcctagcct tcacaggcgc cggagccatc caaggtagtg ctcgatggtg gagcgcaaat 360
caccgcgccc accaccgatg gaccgacaca atgaaggacc cctactccgt tatgcgcggc 420
ctattattct cgcacatcgg atggatggta ttgaacagcg accccaaagt caaaggccga 480
acagacgtca gtgatctcga cagcgacccc gtcgtagtct ggcagcaca gactacggc 540
aagtgcctgc tgttcgccgc gtggatattc cccatgatcg tagccggcct cggatgggga 600
gattgggtgg gaggccttgt ctacgccggc atcattcgag cgtgtttcgt ccagcaggcg 660
acattttgcg tgaactctct cgcgcattgg atcggcgagc agccgttcga cgacagacgc 720
acgcctcgag accacgtttt gacagcgttg gtaacgatgg gagaaggata tcataacttc 780
caccacgaat tcccaagcga ttatcgcaac gcgatcatct ggtaccaata cgaccctacc 840
aaatggctca ttacctctt ctccctcggc cccttcccc tcgcatactc gctcaaaacc 900
ttccggtcca atgagattga aaaaggggcg ttgcaacaac aacaaaaagc cctggacaag 960
aagcgctcag gacttgattg gggcctaccc 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 gagggtgagg gtgcttagag gtgggcagga ggtggagggtg 1260
tggaagaagc agagagtgga tgttttaggg aagagcgaca ttttgagaca ggttacgcgg 1320
gtggagaggt tggttgaggg ggctgtggct gcgtagctaa ctgaccatgg 1370

<210> 9

<211> 1428

<212> ADN

<213> Magnaporthe grisea

<400> 9

atggcttcgt catcttcctc cgtgccggag ttggctgccg ccttcctga 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 ctacagctc gtacaaggcc tcgcttcgc tcaaatcta ccttgccgcc 360
gttggcgctg gtgccgtcga gggctccatc agatgggtgg ccaacgggtca ccgcgcacac 420
caccgataca ccgataccga gaaggacccc tactcagtcc gcaagggtct cctgtactca 480
cacatgggat ggatgcttct gaagcagaac cccaagaagc agggccgcac cgacatcacc 540
gacctgaacg aggaccccg tgtcgtttgg cagcaccgca acttcctcaa gtgtgttatc 600

ES 2 623 454 T3

ttcatggccc tcgtcttccc cacacttggt gctggccttg gctgggggtga ctactgggga 660
 ggtttcatct acggaggtat tctgcgtgtc ttcttcgtcc agcaggccac cttctgcgtc 720
 aactcgcttg cccactggct cggtgaccag cctttcgacg atcgcaactc gccgcgtgat 780
 cacgtcatca cagccctggt cacccttgga gagggatacc acaacttcca ccacgagttc 840
 ccttcggact accgcaacgc tattgagtgg taccagtatg accccaccaa gtggtcaatc 900
 tggatctgga agcagcttgg tcttgccac aacctgaagc agttccgcca aaacgagatt 960
 gagaagggac gcgtccagca gctgcagaag aagctcgacc agaagcgcgc caagcttgat 1020
 tggggatttc ccttgagca gcttccggtt gttagctggg atgactttgt tgagcagttc 1080
 aagaacggaa aggcttggat tgcagttgcc ggtgtcatcc acgatgttgg tgacttcac 1140
 aaggaccacc ctggtggcag agctctcatc aactcgcca ttggcaagga cgcaaccgca 1200
 atcttcaacg gcggtgttta caaccactcc aacgccgtc acaacctgct ctcgactatg 1260
 cgtgtgggtg ttttgcgtgg cggctgcgag gttgagatct ggaagcgcgc ccagtccgaa 1320
 aacaaggacg tctcaaccgt cgttgattct tcgggtaacc gcatcgccg cgcggtggg 1380
 caagcgacca aggtcgcca gcctgttccg ggtgctcagg ccgcgtga 1428

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

<400> 10

atggctccaa atatatcgga ggatgtgaac ggggtgctct tcgagagtga tgcagcgacg 60
 ccggacctgg cgctgtccac gccgcctgtg cagaaggctg acaacaggcc caagcaactg 120
 gtgtggagga acatactact gttcgcgtat cttcacttag cggctcttta cggaggttat 180
 ctgttctctt tctcagctaa atggcagaca gacatatttg cctacatcct gtatgtgatc 240
 tccgggcttg gtatcacggc tggagcacat cgctgtggg ccacaagtc ctacaaagct 300
 aaatggcctc tccgagttat cctggtcatc tttaacacag tggcattcca ggatgccgtc 360
 atggactggg cgcgcgacca ccgcatgcat cacaagtact cggaaaccga tgctgatcct 420
 cataatgcga cccgaggatt cttcttctct cacattggct ggctgcttgt caggaaacat 480
 cccgacctta aggagaaggg caagggactc gacatgagcg acttacttgc tgacccatt 540
 ctcaggttcc agaaaaata ctacctgac ctgatgccct tggcttgctt cgtgatgcct 600
 accgtgattc ctgtgtactt ctggggtgaa acctggacca acgcattctt tgtggcggcc 660
 atgttccgct acgcgttcat cctaaatgtg acgtggctcg tcaactctgc cgctcacaag 720
 tggggagaca agccctacga caaaagcatt aagccttccg aaaacttgct ggtcgccatg 780
 ttcgctctcg gagaaggatt ccacaactac caccacatt tcccttgga ctacaaaact 840
 gctgagctgg gcaacaacaa actcaacttc actaccacct ttattaactt cttcgctaaa 900
 attggctggg cttacgacct gaagacagtg tctgatgata tcgtcaagaa cagggtgaag 960
 cgcactgggtg acggctccca ccacctgtgg ggctggggag acgaaaatca atccaaagaa 1020
 gaaattgatg ccgctatcag aatcaatcct aaggacgatt aa 1062

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

ES 2 623 454 T3

<400> 11

```

atggcggcct tggacagcat tccagaggat aaggctacct cgtcgaaatc gactcatatt    60
caatatcaag aagtaacttt tcggaactgg tataagaaga taaattggct caacacgacg    120
ctggtggtgc tcatacccg ctttggactc 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 cggttatgcy cggcctatta    420
ttctcgacac tcggatggat ggtattgaac agcgaccca aagtcaaagg ccgaacagac    480
gtcagtgatc tcgacagcga ccccgctcgt gtctggcagc acaagcacta cggcaagtgc    540
ctgctgttcg ccgctggtg attccccatg atcgtagccg gcctcggatg gggagattgg    600
tggggaggcc ttgtctacgc cggcatcatt cgagcgtggt tcgtccagca ggcgacattt    660
tgcgtgaact ctctcgcgca ttggatcggc gagcagccgt tcgacgacag acgcacgcct    720
cgagaccacg ttttgacagc gttggtaacg atgggagaag gatattcataa cttccaccac    780
gaattcccaa gcgattatcg caacgcgac atctggtacc aatacgaccc taccaaattg    840
ctcattttacc tcttctccct cggcccttc cccctcgcgt actcgtcaa aaccttcggg    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 caatgaggtt gggagtgcct agaggtgggc aggaggtgga ggtgtggaag   1260
aagcagagag tggatgtttt agggaaagagc 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 2 623 454 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 2 623 454 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
 305 310 315 320
 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

<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

ES 2 623 454 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

ES 2 623 454 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 2 623 454 T3

195 200 205

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

Leu Ala His Trp Ile Gly Glu Gln Pro Phe Asp Asp Arg Arg Thr Pro
225 230 235 240

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

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

Tyr Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Trp Leu Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Gly
275 280 285

Pro Phe Pro Leu Ala Tyr Ser Leu Lys Thr Phe Arg Ser Asn Glu Ile
290 295 300

Glu Lys Gly Arg Leu Gln Gln Gln Lys Ala Leu Asp Lys Lys Arg
305 310 315 320

Ser Gly Leu Asp Trp Gly Leu Pro Leu Phe Gln Leu Pro Val Ile Ser
325 330 335

Trp Asp Asp Phe Gln Ala Arg Cys Lys Glu Ser Gly Glu Met Leu Val
340 345 350

Ala Val Ala Gly Val Ile His Asp Val Ser Gln Phe Ile Glu Asp His
355 360 365

Pro Gly Gly Arg Ser Leu Ile Arg Ser Ala Val Gly Lys Asp Gly Thr
370 375 380

Gly Met Phe Asn Gly Gly Val Tyr Glu His Ser Asn Ala Ala His Asn
385 390 395 400

Leu Leu Ser Thr Met Arg Val Gly Val Leu Arg Gly Gly Gln Glu Val
405 410 415

Glu Val Trp Lys Lys Gln Arg Val Asp Val Leu Gly Lys Ser Asp Ile
420 425 430

Leu Arg Gln Val Thr Arg Val Glu Arg Leu Val Glu Gly Ala Val Ala
435 440 445

Ala

<210> 15

<211> 1428

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de la desaturasa optimizada para colza

<400> 15

ES 2 623 454 T3

atggccagca gttcttcaag tgtgccagaa cttgccgcag 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 tggctaccat 300
agattgtggg cacattcctc ttacaaggcc agcttgccctc tcaaaatcta ccttgccgca 360
gttggtgctg gagccgttga aggttccata agatggtgga gcaacggaca cagagcacat 420
cacagataca cagacacaga gaaagatcct tactcagtga ggaagggatt gctctacagc 480
cacatggggtt ggatgctctt gaagcagaat ccaaagaagc aagggaggac ggacattact 540
gatctgaatg aggaccaggt tgtggtctgg caacatagga actttctcaa gtgtgtgatc 600
ttcatggctt tggcttttcc cacccttggt gctggcctgg gatggggaga ctactgggga 660
ggtttcatct atggagggat cttgagagtg ttctttgttc agcaagccac cttctgtgtc 720
aactcacttg cacattggct tgggtgatcaa ccgtttgatg acagaaactc tccacgtgac 780
catgtcataa ctgctcttgt cacgctgggt gaaggtatc acaactttca ccatgagttt 840
ccgtcagact atagaaatgc gattgagtgg tatcagtatg accccacgaa gtggagcatt 900
tggatttggga agcaacttgg acttgctcac aatctcaagc agttcagaca gaatgagata 960
gagaagggaa gggttcaaca gttgcagaag aaactggatc agaagagagc gaaacttgat 1020
tggggaatac cgttgaaca actccctggt gtgtcttggg atgactttgt tgaacagtca 1080
aagaatggca aggcattgat tgctgttgct ggtgtcattc acgatgttgg tgacttcatc 1140
aaggatcatc ctgggtggacg tgctctcatc aactctgcga ttggcaaaga tgccacagcg 1200
atcttcaatg gaggtgtcta caatcattca aatgccgcac acaaccttct ctccaccatg 1260
agggttgggtg tcctccgtgg aggggtgcgaa gtggagatat ggaaacgtgc tcaaagtgag 1320
aacaagatg tctctactgt ggttgatagt tctggcaacc gtattgtgag agctgggtgga 1380
caagctacca aagtgggttca 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 2 623 454 T3

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

<210> 17
<211> 1350
5 <212> ADN
<213> Artificial

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

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

ES 2 623 454 T3

```

agggatcatg ttctgactgc gttggtcaca atgggagaag gataccacaa cttccaccat 780
gagtttccga gtgactacag aaatgccatc atttggatc agtatgaccc tacaaagtgg 840
ctcatctatc tcttcagctt gggtccttc ccattggcct actctctcaa gaccttcgt 900
tccaatgaga ttgagaaagg aaggcttcag caacagcaaa aggcctctga caagaaaaga 960
agtggctctg attggggact tcctctcttc cagcttcag tgatctcatg ggatgacttt 1020
caagctcgtt gcaaagaaag tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt gatccatgat 1080
gtctcccagt tcattgaaga tcatctggg gggaggagcc tcattagaag tgctgttggg 1140
aaagatggga ctggcatggt caatggtgga gtgtatgaac attcaaacgc cgcacacaac 1200
ttgctgagca caatgagagt tggagtcttg agaggtggac aagaagtgga ggtttggaag 1260
aaacagaggg tggatgttct tgggaagtca gacattcttc gtcaagtgac aagggtggag 1320
cgtctggtgg aaggagctgt tgcagcgtga 1350

```

<210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador MAS414

<400> 18

tgaagcattc cataagccgt cacg 24

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador MAS415

<400> 19

gaaattatca cgcttccgca cacg 24

<210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador MAS413

<400> 20

tgggctgaat tgaagacatg ctcc 24

<210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CEbador arw008

<400> 21

acacctctca 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
 55
 <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 acgatcgcaa ctcgccgct gatcac 36
 <210> 28
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador AntiMgD9DSRh
 15 <400> 28
 ggatccgagg 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
 <210> 31
 45 <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 ttgggttct 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
 45 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Secuencia de Kozak

 <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

	<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 taacaccacc	120
	cttggtgttc ttatcccagc tcttggaactt taccttacca ggaccacccc acttaccagg	180
	ccaaccctta tctggtctgt tctttactac ttctgcaccg ctttcggaat aaccggagga	240
	taccacaggc tttggtctca caggctcttac tctgctaggc ttccacttag gcttttcctt	300
	gctttcaccg gagctggagc tatccaagga tctgctagat ggtgggtctgc taaccacagg	360
	gctcaccaca ggtggaccga taccatgaag gaccataact ctggtatgag gggacttctt	420
	ttctctcaca tcggatggat gggtcttaac tctgatccaa aggttaaggg aaggaccgat	480
	gtttctgata ttgattctga tccagtgtgt gtttggcaac acaagcacta cggaaagtgc	540
	cttcttttcg ctgcttggat cttcccaatg atcggttgctg gacttggatg gggagattgg	600
	tggggaggac ttgtttacgc tggaaatcatc agggcttgct tcggtcaaca agctaccttc	660
	tgcgttaact ctcttgctca ctggatcggg gagcaaccat tcgacgatag gaggacccca	720
	agggatcacg ttcttaccgc tcttgttacc atgggagagg gataccacaa cttccaccac	780
	gagttcccat ctgattacag gaacgctatc atctggtacc aatacgatcc aaccaagtgg	840
	cttatctacc ttttctctct tggaccattc ccacttgctt actctcttaa gaccttcagg	900
	tctaacgaga tcgagaaggg aaggcttcaa caacaacaaa aggtctctga taagaagagg	960
	tctggacttg attggggact tccacttttc caacttccag ttatctcttg ggatgatttc	1020
	caagctaggt gcaaggagtc tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt tatccacgat	1080
	gtttctcaat tcatacgagga tcaccagga ggaaggtctc ttatcaggtc tgctgttgga	1140
	aaggatggaa ccggaatgtt caacggagga gtttacgagc actctaacgc tgctcacaac	1200
	cttcttttcta ccatgagggt tggagtctct aggggaggac aagaggttga ggtttggaag	1260
	aagcaaaggg ttgatgttct tggaaagtca gatatcctta ggcaagttac cagggttgag	1320
	aggcttggtg agggagctgt tgctgcttga	1350
15	<210> 45	
	<211> 1062	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Desaturasa optimizada para colza	
	<400> 45	
	atggctccaa acatctctga ggatgttaac ggagttcttt tcgagtctga tgctgctacc	60
	ccagatcttg ctctttctac cccaccagtt caaaaggctg ataacaggcc aaagcaactt	120
	gtttggagga acatccttct tttcgcttac cttcaccttg ctgctcttta cggaggatac	180
	cttttccttt tctctgctaa gtggcaaacc gatatcttcg cttacatcct ttacgttatc	240

ES 2 623 454 T3

	tctggacttg gaataaccgc tggagcacac aggcctttggg ctcaacaagtc ttacaaggct	300
	aagtggccac ttaggggttat ccttggttatc ttcaacaccg ttgctttcca agacgctgct	360
	atggattggg ctagggatca caggatgcac cacaagtact ctgagaccga cgctgatcca	420
	cacaacgcta ccaggggatt cttcttctct caccatcgat ggcttcttgt taggaagcac	480
	ccagatctta aggagaaggg aaagggactt gatatgtctg atcttcttgc tgatccaatc	540
	cttaggttcc aaaagaagta ctaccttatc cttatgccac ttgcttgctt cgttatgcca	600
	accgttatcc cagtttactt ctggggagag acctggacca acgctttctt cgttgctgct	660
	atgttcaggc acgctttcat ccttaacggt acctggcttg ttaactctgc tgctcacaag	720
	tggggagata agccatacga taagtctatc aagccatctg agaacctttc tgttgctatg	780
	ttcgctcttg gagagggatt ccacaactac caccacacct tcccatggga ttacaagacc	840
	gctgagcttg gaaacaacaa gcttaacttc accaccacct tcatcaactt cttcgctaag	900
	atcgatggg cttacgatct taagaccgtt tctgatgata tcgttaagaa cagggttaag	960
	aggaccggag atggatcaca ccaccttggt ggatggggag atgagaacca atctaaggag	1020
	gagatcgatg ctgctatcag gatcaacca aaggatgatt ga	1062
5	<210> 46 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
10	<220> <223> etiqueta Myc	
	<400> 46	
15	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu 1 5 10	
	<210> 47 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial	
20	<220> <223> Etiqueta hemaglutinina	
	<400> 47	
25	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala 1 5	
30	<210> 48 <211> 1368 <212> ADN <213> Aspergillus nidulans	
	<400> 48	
35	atgtctgctc caaccgctga catcagggtc agggctccag aggcctaagaa gggtcacatc	60
	gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc	120
	ctcatcatcg gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc	180

ES 2 623 454 T3

aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaat caccgctgga 240
taccacaggc tttgggctca ctgctcttac tctgctactc ttccacttag gatctggctt 300
gctgctgttg gaggaggagc tgttgaggga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 360
gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccataact ctgttaggaa gggacttctc 420
tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac 480
atctctgata tcaacgagga cccagtgtgt gtttggaac acaggaacta cctcaagggt 540
gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttgatg gggagattgg 600
cttgaggat tcgtgtacgc tggaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctaccttc 660
tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttgga gatcaacat tcgatgatag gaactctcct 720
agggatcacg tgatcaccgc tcttggtacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 780
gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg 840
tctatctggg cttggaagca acttggttg gcttacgatc tcaagaagt cagggctaac 900
gagatcgaga aggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggtact 960
cttgattggg gaacccact tgatcaactt ccagtgatg aatgggatga ctacgttgag 1020
caagctaaga acggaagggt acttggtgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac 1080
ttcatcaagg atcaccagg aggaagggt atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct 1140
accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacg cagctcaca cttcttagc 1200
accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggtg agatctggaa gagggtcag 1260
aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag 1320
caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttga 1368

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

<220>
<223> Mutante silencioso de AnD9DS v3

<400> 49

atgtctgctc caaccgctga catcagggtc agggctccag aggctaagaa ggttcacatc 60
gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc 120
ctcatcatcg gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc 180
aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaat caccgctgga 240
taccacaggc tttgggctca ctgctcatac tctgctactc ttccacttag gatctggctt 300
gctgctgttg gaggaggagc tgttgaggga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 360
gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccataact ctgttaggaa gggacttctc 420
tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac 480
atctctgata tcaacgagga cccagtgtgt gtttggaac acaggaacta cctcaagggt 540

ES 2 623 454 T3

```

gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttgatg gggagattgg 600
cttggaggat tcgtgtacgc tggaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctaccttc 660
tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttga gatcaaccat tcgatgatag gaactctcct 720
agggatcacg tgatcacgc tcttggtacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 780
gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gattggcacc agtacgatcc taccaagtgg 840
tctatctggg cttggaagca acttgattg gcttacgatc tcaagaagtt cagggctaac 900
gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact 960
cttgattggg gaacccctt tgatcaactt ccagtgatg aatgggatga ctacgttgag 1020
caagctaaga acggaagggg acttggtgct atcgctggg ttgttcacga tgttaccgac 1080
ttcatcaagg atcacccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct 1140
accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacg cagctcaca cttcttagc 1200
accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggtt 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

<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

ES 2 623 454 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 2 623 454 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 2 623 454 T3

Tyr Leu Lys Val₁₈₀ Val Phe Thr Met Gly₁₈₅ Leu Ala Val Pro Met₁₉₀ Leu Val
 Ala Gly Leu₁₉₅ Gly Trp Gly Asp Trp₂₀₀ Leu Gly Gly Phe Val₂₀₅ Tyr Ala Gly
 Ile Leu₂₁₀ Arg Ile Phe Phe Val₂₁₅ Gln Gln Ala Thr Phe₂₂₀ Cys Val Asn Ser
 Leu₂₂₅ Ala Leu Trp Leu Gly₂₃₀ Asp Gln Pro Phe Asp₂₃₅ Asp Arg Asn Ser Pro₂₄₀
 Arg Asp His Val₂₄₅ Ile Thr Ala Leu Val Thr₂₅₀ Leu Gly Glu Gly Tyr₂₅₅ His
 Asn Phe His₂₆₀ Glu Phe Pro Ser Asp₂₆₅ Tyr Arg Asn Ala Ile₂₇₀ Glu Trp
 His Gln Tyr₂₇₅ Asp Pro Thr Lys Trp₂₈₀ Ser Ile Trp Ala Trp₂₈₅ Lys Gln Leu
 Gly Leu₂₉₀ Ala Tyr Asp Leu Lys₂₉₅ Lys Phe Arg Ala Asn₃₀₀ Glu Ile Glu Lys
 Gly₃₀₅ Arg Val Gln Gln Leu₃₁₀ Gln Lys Lys Leu Asp₃₁₅ Arg Lys Arg Ala Thr₃₂₀
 Leu Asp Trp Gly Thr₃₂₅ Pro Leu Asp Gln Leu₃₃₀ Pro Val Met Glu Trp₃₃₅ Asp
 Asp Tyr Val Glu₃₄₀ Gln Ala Lys Asn Gly₃₄₅ Arg Gly Leu Val Ala₃₅₀ Ile Ala
 Gly Val Val₃₅₅ His Asp Val Thr Asp₃₆₀ Phe Ile Lys Asp His₃₆₅ Pro Gly Gly
 Lys Ala₃₇₀ Met Ile Ser Ser Gly₃₇₅ Ile Gly Lys Asp Ala₃₈₀ Thr Ala Met Phe
 Asn Gly Gly Val Tyr Tyr₃₉₀ His Ser Asn Ala Ala₃₉₅ His Asn Leu Leu Ser₄₀₀
 Thr Met Arg Val Gly₄₀₅ Val Ile Arg Gly Gly₄₁₀ Cys Glu Val Glu Ile Trp₄₁₅
 Lys Arg Ala Gln₄₂₀ Lys Glu Asn Val Glu Tyr Val Arg Asp Gly₄₃₀ Ser Gly
 Gln Arg Val₄₃₅ Ile Arg Ala Gly Glu₄₄₀ Gln Pro Thr Lys Ile₄₄₅ Pro Glu Pro
 Ile Pro Thr Ala Asp Ala Ala₄₅₅

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

10 <400> 52

ES 2 623 454 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 2 623 454 T3

225 230 235 240
 Thr Asp Met Thr Asp₂₄₅ Asp Trp Thr Ile Arg₂₅₀ Phe Gln His Arg His Tyr
 Ile Leu Leu Met₂₆₀ Leu Leu Thr Ala Phe₂₆₅ Val Ile Pro Thr Leu₂₇₀ Ile Cys
 Gly Tyr Phe₂₇₅ Phe Asn Asp Tyr Met₂₈₀ Gly Gly Leu Ile Tyr₂₈₅ Ala Gly Phe
 Ile Arg Val₂₉₀ Phe Val Ile Gln₂₉₅ Gln Ala Thr Phe Cys₃₀₀ Ile Asn Ser Met
 Ala His Tyr Ile Gly Thr₃₁₀ Gln Pro Phe Asp Asp₃₁₅ Arg Arg Thr Pro Arg₃₂₀
 Asp Asn Trp Ile Thr₃₂₅ Ala Ile Val Thr Phe₃₃₀ Gly Glu Gly Tyr His₃₃₅ Asn
 Phe His His Glu₃₄₀ Phe Pro Thr Asp Tyr₃₄₅ Arg Asn Ala Ile Lys₃₅₀ Trp Tyr
 Gln Tyr Asp₃₅₅ Pro Thr Lys Val Ile₃₆₀ Ile Tyr Leu Thr Ser₃₆₅ Leu Val Gly
 Leu Ala Tyr Asp Leu Lys Lys₃₇₅ Phe Ser Gln Asn Ala₃₈₀ Ile Glu Glu Ala
 Leu Ile Gln Gln Glu Gln₃₉₀ Lys Lys Ile Asn Lys₃₉₅ Lys Lys Ala Lys Ile₄₀₀
 Asn Trp Gly Pro Val₄₀₅ Leu Thr Asp Leu Pro₄₁₀ Met Trp Asp Lys Gln Thr₄₁₅
 Phe Leu Ala Lys₄₂₀ Ser Lys Glu Asn Lys₄₂₅ Gly Leu Val Ile Ile₄₃₀ Ser Gly
 Ile Val His₄₃₅ Asp Val Ser Gly Tyr₄₄₀ Ile Ser Glu His Pro₄₄₅ Gly Gly Glu
 Thr Leu Ile Lys Thr Ala Leu₄₅₅ Gly Lys Asp Ala Thr₄₆₀ Lys Ala Phe Ser
 Gly Gly Val Tyr Arg His₄₇₀ Ser Asn Ala Ala Gln₄₇₅ Asn Val Leu Ala Asp₄₈₀
 Met Arg Val Ala Val₄₈₅ Ile Lys Glu Ser Lys₄₉₀ Asn Ser Ala Ile Arg₄₉₅ Met
 Ala Ser Lys Arg Gly Glu Ile Tyr Glu Thr Gly Lys Phe Phe

500 505 510

<210> 53

5 <211> 13227

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Plásmido pDAB7309

<400> 53

ES 2 623 454 T3

ggactagtcc agaaggtaat tatccaagat gtagcatcaa gaatccaatg tttagcggaa	60
aaactatgga agtattatgt aagctcagca agaagcagat caatatgcgg cacatatgca	120
acctatgttc aaaaatgaag aatgtacaga tacaagatcc tatactgccga gaatacgaag	180
aagaatacgt agaaattgaa aaagaagaac caggcgaaga aaagaatctt gaagacgtaa	240
gcactgacga caacaatgaa aagaagaaga taaggctcggg gattgtgaaa gagacataga	300
ggacacatgt aagggtgaaa atgtaagggc ggaaagtaac cttatcacia aggaatctta	360
tccccacta cttatccttt tatatttttc cgtgtcattt ttgcccttga gttttcctat	420
ataaggaacc aagttcggca ttgtgaaaa caagaaaaaa ttgggtgtaa gctattttct	480
ttgaagtact gaggatacaa cttcagagaa atttgtaagt ttgtaggtac cagatctgga	540
tcccaaacca tgtctccgga gaggagacca gttgagatta ggccagctac agcagctgat	600
atggccgcgg ttgtgatata cgtaaccat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg	660
acagagccac aaacaccaca agagtggatt gatgatctag agagggtgca agatagatac	720
ccttggttgg ttgctgaggt tgagggtgtt gtggctggta ttgcttacgc tgggccctgg	780
aaggctagga acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttagctgtc acataggcat	840
caaagggttg gcctaggatc tacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcgcaa	900
ggttttaagt ctgtggttgc tgttataggc cttccaaacg atccatctgt taggttgc	960
gaggctttgg gatacacagc ccgggggtaca ttgcgcgcag ctggatacaa gcatgggtga	1020
tgcatgatg ttggtttttg gcaaagggat ttgagttgc 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 agtgatttcc aatatgtact acgatttcca atgtctttat tgcgcgcgta	1440
tgtaatcggc gtcacaaaat aatccccggg gactttcttt taatccagga tgaaataata	1500
tgttattata atttttgcga ttgtgtccgt tataggaatt gaagtgtgct tgaggctcgg	1560
cgccaccact cccatttcat aattttacat gtatttgaaa aataaaaatt tatggtattc	1620
aatttaaaca cgtatacttg taaagaatga tatcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt	1680

ES 2 623 454 T3

attgataaaa taacaagtca ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca	1740
agtttaaatt cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg	1800
aaagactgag tgcgatatta tgggtgaata cataggaatt cgtttaaacg atctgctct	1860
aattttcggc 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 tgctcaagt	2160
catggcgcaa agcagttatt ggagtgcgga ttttcgttgg catattattc gccacgagtt	2220
agcagacgaa gagaccttca tgaacgtggc caaggccaga gttaagcaga tggtacgcc	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 gatgttagca attgttttta gctttgtctt	2640
gttgtggcag ggcggcaagt gcttcagaca tcattctgtt ttcaaatttt atgctggaga	2700
acagcttctt aattccttgg gaaataatag actgctctt aaaattcaga tgtctggata	2760
tagatatgat tgtaaaataa cctatttaag tgtcatttag aacataagtt ttatgaatgt	2820
tcttccattt tcgtcatcga acgaataaga gtaaatacac cttttttaac attacaaata	2880
agttcttata cgttgtttat acaccgggaa tcatttccat tattttcgcg caaaagtcac	2940
ggatattcgt gaaagcgaca taaactgcga aatttgcggg gagtgtcttg agtttgctc	3000
gaggctagcg catgcacata gacacacaca tcattctcatt gatgcttggg aataattgtc	3060
attagattgt ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa	3120
cggatgtgac ttcagtacat taaaaacgac cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc	3180
aatttgattt acaattgaat atatcctgcc ccagccagcc aacagctcga tttacaattg	3240
aatatatcct gccggccggc ccacgcgtgt cgaggaattc tgatctggcc cccatttgga	3300
cgtgaatgta gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt	3360
cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata	3420
ataacgtgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaa ttggttaatta ctctttcttt	3480
ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccg acatgaagcc	3540
atttacaatt gaatatatcc tgccgccgct gccgcttgc acccggtgga gcttgcatgt	3600
tggtttctac gcagaactga gccggttagg cagataattt ccattgagaa ctgagccatg	3660
tgcaccttcc cccaacacg gtgagcgacg gggcaacgga gtgatccaca tgggactttt	3720

ES 2 623 454 T3

aaacatcatc	cgtcggatgg	cgttgcgaga	gaagcagtcg	atccgtgaga	tcagccgacg	3780
caccgggcag	gcgcgcaaca	cgatcgcaaa	gtatttgaac	gcaggtacaa	tcgagccgac	3840
gttcacgcgg	aacgaccaag	caagcttggc	tgccattttt	ggggtgaggc	cgttcgcggc	3900
cgagggggcg	agccccctgg	gggatgggag	gcccgcgtta	gcgggcccgg	agggttcgag	3960
aagggggggc	accccccttc	ggcgtgcgcg	gtcacgcgca	cagggcgag	ccctggttaa	4020
aaacaagggt	tataaatatt	ggtttaaaag	caggttaaaa	gacaggttag	cggtggccga	4080
aaaacggggc	gaaacccttg	caaatgctgg	attttctgcc	tgtggacagc	ccctcaaattg	4140
tcaatagggt	gcgccctcat	ctgtcagcac	tctgcccctc	aagtgtcaag	gatcgcgccc	4200
ctcatctgtc	agtagtcgcg	cccctcaagt	gtcaataaccg	cagggcactt	atccccaggc	4260
ttgtccacat	catctgtggg	aaactcgcgt	aaaatcaggc	gttttcgccc	atttgcgagg	4320
ctggccagct	ccacgtcgcc	ggccgaaatc	gagcctgccc	ctcatctgtc	aacgccgcgc	4380
cgggtgagtc	ggccccctcaa	gtgtcaacgt	ccgccccctca	tctgtcagtg	agggccaaagt	4440
tttccgcgag	gtatccacaa	cgccggcggc	cgcggtgtct	cgcacacggc	ttcgacggcg	4500
tttctggcgc	gtttgcaggg	ccatagacgg	ccgccagccc	agcggcgagg	gcaaccagcc	4560
cggtgagcgt	cggaagggt	cgacggatct	tttccgctgc	ataaccctgc	ttcgggggtca	4620
ttatagcgat	tttttcggta	tatccatcct	ttttcgcacg	atatacagga	ttttgccaaa	4680
gggttcgtgt	agactttcct	tggtgtatcc	aacggcgcta	gccgggcagg	atagggtgaag	4740
tagggcccacc	cgcgagcggg	tggttccttct	tactgtccc	ttattcgcac	ctggcgggtgc	4800
tcaacgggaa	tcctgtctctg	cgaggctggc	cggctaccgc	cggcgtaaca	gatgagggca	4860
agcggatggc	tgatgaaacc	aagccaacca	ggaagggcag	cccacctatc	aaggtgtact	4920
gccttccaga	cgaacgaaga	gcgattgagg	aaaaggcggc	ggcggccggc	atgagcctgt	4980
cggcctacct	gctggccgtc	ggccagggtc	acaaaatcac	gggcgtcgtg	gactatgagc	5040
acgtccgcga	gctggccgcg	atcaatggcg	acctgggccg	cctgggcggc	ctgctgaaac	5100
tctggctcac	cgacgaccgg	cgacggcgcg	ggttcgggtga	tgccacgata	ctcgccctgc	5160
tggcgaagat	cgaagagaag	caggacgagc	ttggcaagg	catgatgggc	gtggtccgcc	5220
cgagggcaga	gccatgactt	ttttagccgc	taaaacggcc	ggggggtgcg	cgtgattgcc	5280
aagcacgtcc	ccatgcgctc	catcaagaag	agcgacttcg	cggagctggt	attcgtgcag	5340
ggcaagattc	ggaataccaa	gtacgagaag	gacggccaga	cggctctacg	gaccgacttc	5400
attgccgata	aggtggatta	tctggacacc	aaggcaccag	gcgggtcaaa	tcaggaataa	5460
gggcacattg	ccccggcgtg	agtcggggca	atcccgcaag	gaggggtgaat	gaatcggacg	5520
tttgaccgga	aggcatacag	gcaagaactg	atcgacgcgg	ggttttccgc	cgaggatgcc	5580
gaaaccatcg	caagccgcac	cgatcatgct	gcgccccgcg	aaaccttcca	gtccgtcggc	5640
tcgatggtcc	agcaagctac	ggccaagatc	gagcgcgaca	gcgtgcaact	ggctccccct	5700
gccctgcccc	cgccatcggc	cgccgtggag	cgttcgcgtc	gtctcgaaca	ggaggcggca	5760

ES 2 623 454 T3

ggtttggcga agtcgatgac catcgacacg cgaggaacta tgacgaccaa gaagcgaaaa 5820
 accgccggcg aggacctggc aaaacagggtc agcgaggcca agcaggccgc gttgctgaaa 5880
 cacacgaagc agcagatcaa ggaaatgcag ctttccttgt tcgatattgc gccgtggccg 5940
 gacacgatgc gagcgatgcc aaacgacacg gcccgcctcg cctgtttcac cacgcgcaac 6000
 aagaaaatcc cgcgcgaggc gctgcaaac aagggtcattt tccacgtcaa caaggacgtg 6060
 aagatcacct acaccggcgt cgagctgcgg gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag 6120
 gtgttggagt acgcaagcg caccctatc ggcgagccga tcaccttcac gttctacgag 6180
 ctttgccagg acctgggctg gtcgatcaat ggccggtatt acacgaaggc cgaggaatgc 6240
 ctgtcgcgcc tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg accgcgttgg gcacctggaa 6300
 tcggtgtcgc tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg gcaagaaaac gtcccgttgc 6360
 caggctctga tcgacgagga aatcgctcgt 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 tgcattgcaa acgctagggc 6660
 cttgtggggg cagttccggc tgggggttca gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa 6720
 caagcgggca ctgctcgacg cacttgcttc gctcagtatc gctcgggacg cacggcgcgc 6780
 tctacgaact gccgataaac agaggattaa aattgacaat tgtgattaag gctcagattc 6840
 gacggcttgg agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga 6900
 aagctccaga gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt 6960
 tcgctgaacg gttgcgagat gccgtggcat tcggcgccca catcgacggc gagatcattg 7020
 ggctgtcggg cttcaaacag gaggacggcc ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg 7080
 gcgttttctg ggagcccga cagcgaggcc gaggggtcgc cggtatgctg ctgcgggcgt 7140
 tgccggcggg tttattgctc gtgatgatcg tccgacagat tccaacggga atctggtgga 7200
 tgcgcatctt catctcggc gacttaata tttcgctatt ctggagcttg ttgtttattt 7260
 cggctctacc cctgccgggc ggggtcgcgg cgacggtagg cgctgtgcag ccgctgatgg 7320
 tcgtgttcat ctctgccgct ctgctaggta gcccgatacg attgatggcg gtcctggggg 7380
 ctatttgcgg aactgcgggc gtggcgctgt tgggtgttgac accaaacgca gcgctagatc 7440
 ctgtcggcgt cgcagcgggc ctggcggggg cggtttccat ggcgttcgga accgtgctga 7500
 cccgcaagtg gcaacctccc gtgcctctgc tcacctttac cgcttgga ctggcggccg 7560
 gaggacttct gctcgttcca gtagctttag tgtttgatcc gccaatcccg atgcctacag 7620
 gaaccaatgt tctcggcctg gcgtggctcg gcctgatcgg agcgggttta acctacttcc 7680
 tttggttccg ggggatctcg cgactcgaac ctacagttgt ttccttactg ggctttctca 7740
 gccccgagc gcttagtggg aatttgtacc cttatcgaa ccgggagcac aggatgacgc 7800

ES 2 623 454 T3

ctaacaattc attcaagccg acaccgcttc gcggcgccgc ttaattcagg agttaaacat	7860
catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgatcat	7920
cgagcgccat ctccaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg cagtggatgg	7980
cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga	8040
aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc ctggagagag	8100
cgagattctc cgcgctgtag aagtcaccat tgttgtgcac gacgacatca ttccgtggcg	8160
ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttgg agaattggcag cgcaatgaca ttcttgagg	8220
tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa aagcaagaga	8280
acatagcggt gccttggtag gtccagcggc ggaggaaactc tttgatccgg ttcctgaaca	8340
ggatctatctt gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgccgc ccgactgggc	8400
tggcgatgag cgaaatgtag tgcttacggt gtcccgctt tggtacagcg cagtaaccgg	8460
caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgccgc cgcccagta	8520
tcagccgctc atacttgaag ctaggcaggc ttatcttggg caagaagatc gcttgccctc	8580
gcgcgcagat cagttggaag aatttgttca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt	8640
cggcaataa tgtctaaca ttcgttcaag ccgacgcgcg ttcgcccgcg ggcttaactc	8700
aagcgttaga gagctgggga agactatgcg cgatctgttg aagggtggtt taagcctcgt	8760
cttgcgatgg catttcgatc cattccatt ccgcgctcaa gatggcttcc cctcggcagt	8820
tcacagggc taaatcaatc tagccgactt gtccggtgaa atgggctgca ctccaacaga	8880
aacaatcaaa caaacatata cagcgactta ttcacacgag ctcaaattac aacggtatat	8940
atcctgccag tcagcatcat cacacaaaaa gttaggcccg aatagtttga aattagaaag	9000
ctcgcaattg aggtctacag gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctcaccgat	9060
cctaaccggt gtgatcatgg gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttgg tctaatttag	9120
tttggatatt agtaaaacaa attcgaacca aacaaaaata taaatatata gtttttatat	9180
atatgccttt aagacttttt atagaatttt ctttaaaaaa tatctagaaa tatttgcgac	9240
tcttctggca tgtaatatct cgttaaatat gaagtgtccc atttttatta actttaaata	9300
attggttgta cgatcacttt cttatcaagt gttactaaaa tgcgtcaatc tctttgttct	9360
tccatattca tatgtcaaaa cctatcaaaa ttcttatata tctttttcga atttgaagtg	9420
aaatttcgat aattttaaata taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt	9480
tatacttaat tactaaattt ggtaactttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa	9540
acgactaaaa taaataaata tcatgtgtta ttaagaaaat tctctataa gaatatatta	9600
atagatcata tgtttgtaaa aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa	9660
aatttgacaa agtaagatta aaataatatt catctaaca aaaaaaac agaaaatgct	9720
gaaaaccggg caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt tggtttggtt tgattttgat	9780
ataaaccgaa ccaactcggg ccatttgcac ccctaatacat aatagcttta atatttcaag	9840

ES 2 623 454 T3

atattattaa gttaacgttg tcaatatcct ggaaattttg caaaatgaat caagcctata 9900
 tggctgtaat atgaatttaa aagcagctcg atgtggtggt aatatgtaat ttacttgatt 9960
 ctaaaaaaat atcccaagta ttaataatct ctgctaggaa gaagggttagc tacgatttac 10020
 agcaaagcca gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca 10080
 aatattttta aaaaaatcag caatgacttg gaacaaaaga aagtgatata ttttttgttc 10140
 ttaacaagc atccccctcta aagaatggca gttttccttt gcatgtaact attatgctcc 10200
 cttcgttaca aaaattttg actactattg ggaacttctt ctgaaaatag tggccaccgc 10260
 ttaattaagg cgcgccatgc ccgggcaagc ggccgcacaa gtttgtaaa aaaagctgaa 10320
 cgagaaacgt aaaatgatat aaatatcaat atattaaatt agattttgca taaaaaacag 10380
 actacataat actgtaaaac acaacatatc cagtcactat gaatcaacta cttagatggt 10440
 attagtgacc tgtagtcgac cgacagcctt ccaaagtgtt ttcgggtgat gctgccaact 10500
 tagtcgaccg acagccttcc aaatgttctt ctcaaacgga atcgtcgtat ccagcctact 10560
 cgctattgtc ctcaatgccg tattaaatca taaaaagaaa taagaaaaag aggtgcgagc 10620
 ctcttttttg tgtgacaaaa taaaaacatc tacctattca tatacgttag tgtcatagtc 10680
 ctgaaaatca tctgcatcaa gaacaatttc acaactctta tacttttctc ttacaagtgc 10740
 ttcggcttca tctggatttt cagcctctat acttactaaa cgtgataaag tttctgtaat 10800
 ttctactgta tcgacctgca gactggctgt gtataaggga gcctgacatt tatattcccc 10860
 agaacatcag gttaatggcg tttttgatgt ctttttcgcg gtggctgaga tcagccactt 10920
 cttccccgat aacggagacc ggacacactg ccataatcgtt ggtcatcatg cgccagcttt 10980
 catccccgat atgcaccacc gggtaaagtt cacgggagac tttatctgac agcagacgtg 11040
 cactggccag ggggatcacc atccgtcgcc cgggcggtgc aataatatca ctctgtacat 11100
 ccacaacag acgataacgg ctctctcttt tatagggtgta aaccttaaac tgcatttcac 11160
 cagccccgtg tctcgtcagc aaaagagccg ttcatttcaa taaaccgggc gacctcagcc 11220
 atcccttctt gattttccgc tttccagcgt tcggcacgca gacgacgggc ttcattctgc 11280
 atggttggtc ttaccagacc ggagatattg acatcatata tgccttgagc aactgatagc 11340
 tgtcgtgtc aactgtcact gtaatacgtt gcttcatagc atacctcttt ttgacatact 11400
 tcgggtatata atatcagtat atattcttat accgcaaaaa tcagcgcgca aatacgcata 11460
 ctgttatctg gcttttagta agccggatcc acgcggtggt tacgcccccc ctgccactca 11520
 tcgcagtact gttgtaattc attaagcatt ctgccgacat ggaagccatc acaaacggca 11580
 tgatgaacct gaatcgccag cggcatcagc accttgctgc cttgcgtata atatttgccc 11640
 atggtgaaaa cgggggagaa gaagttgtcc atattggcca cgtttaaatc aaaactggtg 11700
 aaactcacc agggattggc tgagacgaaa aacatattct caataaaccc tttagggaaa 11760
 taggccaggt tttcaccgta acacgccaca tcttgcaaat atatgtgtag aaactgccgg 11820
 aaatcgtcgt ggtattcact ccagagcgat gaaaacgttt cagtttgctc atggaaaacg 11880

ES 2 623 454 T3

```

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

```

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7318

<400> 54

```

cgcgccgacc cagctttctt gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt 60
tgttgcaacg aacagggtcac 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 2 623 454 T3

gataatgtcg	ggcaatcagg	tgcgacaatc	tatcgcttgt	atgggaagcc	cgatgcgcca	420
gagttgtttc	tgaacatgg	caaaggtagc	gttgccaatg	atgttacaga	tgagatggtc	480
agactaaact	ggctgacgga	atztatgcct	cttccgacca	tcaagcattt	tatccgtact	540
cctgatgatg	catggttact	caccactgcg	atccccggaa	aaacagcatt	ccaggtatta	600
gaagaatatc	ctgattcagg	tgaaaatatt	gttgatgcgc	tggcagtgtt	cctgcgccgg	660
ttgcattcga	ttcctgtttg	taattgtcct	tttaacagcg	atcgcgattt	tcgtctcgct	720
caggcgcaat	cacgaatgaa	taacggtttg	gttgatgcga	gtgattttga	tgacgagcgt	780
aatggctggc	ctgttgaaaca	agtctggaaa	gaaatgcata	aacttttgcc	attctcaccg	840
gattcagtcg	tcactcatgg	tgattttctca	cttgataacc	ttatttttga	cgaggggaaa	900
ttaatagggt	gtattgatgt	tggacgagtc	ggaatcgag	accgatacca	ggatcttgcc	960
atcctatgga	actgcctcgg	tgagttttct	ccttcattac	agaaacggct	ttttcaaaaa	1020
tatggtattg	ataatcctga	tatgaataaa	ttgcagtttc	atttgatgct	cgatgagttt	1080
ttctaatacg	aattgggttaa	ttggttgtaa	cactggcaga	gcattacgct	gacttgacgg	1140
gacggcgcaa	gctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	acgcgtcggt	ccactgagcg	1200
tcagaccccc	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaatc	1260
tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcggtgg	tttgtttgcc	ggatcaagag	1320
ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	1380
cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	gcctacatac	1440
ctcgctctgc	taatcctgtt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	1500
gggttgact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgagc	ggcgggctg	aacggggggt	1560
tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	1620
gagcattgag	aaagcgccac	gcttcccga	gggagaaaag	cggacaggta	tccggtaagc	1680
ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	ctgggtatctt	1740
tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	atgctcgtea	1800
ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacgggt	cctggccttt	1860
tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	ggataaccgt	1920
attaccgcct	ttgagtgagc	tgataaccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgcagcgag	1980
tcagtgagcg	aggaagcgga	agagcgccca	atacgcaaac	cgctctctcc	cgcgcgttgg	2040
ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	tttcccga	ggaaagcggg	cagtgagcgc	2100
aacgcaatta	atacgctgac	cgctagccag	gaagagtttg	tagaaacgca	aaaaggccat	2160
ccgtcaggat	ggccttctgc	ttagtttgat	gcctggcagt	ttatggcggg	cgctctgccc	2220
gccaccctcc	gggccgttgc	ttcacaacgt	tcaaaccgc	tcccggcgga	tttgtcctac	2280
tcaggagagc	gttcaccgac	aaacaacaga	taaaacgaaa	ggcccagctt	tccgactgag	2340
cctttcgttt	tatttgatgc	ctggcagttc	cctactctcg	cgtaaacgct	agcatggatg	2400

ES 2 623 454 T3

ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtctta	agctcggggcc	ccaaataatg	2460
attttatatt	gactgatagt	gacctgttcg	ttgcaacaaa	ttgatgagca	atgctttttt	2520
ataatgccaa	ctttgtacaa	aaaagcaggc	tccgcggccg	cactagggtt	aaactctaga	2580
agctaggaat	tcaaacaaag	aagcgatcgc	gcggccgcca	ttgtactccc	agtatcatta	2640
tagtgaaagt	tttggctctc	tcgccggttg	ttttttacct	ctatttaaag	gggttttcca	2700
cctaaaaatt	ctggtatcat	tctcacttta	cttgttactt	taattttctc	taatctttgg	2760
ttgaaattat	cacgcttcg	cacacgatat	ccctacaaat	ttattatttg	ttaaacattt	2820
tcaaaccgca	taaaatttta	tgaagtcccg	tctatcttta	atgtagtcta	acattttcat	2880
attgaaatat	ataatttact	taatttttagc	gttggtagaa	agcataatga	tttattctta	2940
ttcttcttca	tataaatgtt	taatatacaa	tataaacaaa	ttctttacct	taagaaggat	3000
ttcccatatt	atattttaaa	aatatatatta	tcaaataatt	ttcaaccacg	taaatctcat	3060
aataataagt	tgtttcaaaa	gtaataaaat	ttaactccat	aattttttta	ttcgactgat	3120
cttaaagcaa	cacccagtga	cacaactagc	catttttttc	tttgaataaa	aaaatccaat	3180
tatcattgta	ttttttttat	acaatgaaaa	tttcacaaaa	caatgatttg	tggtatttct	3240
gaagcaagtc	atgttatgca	aaattctata	attcccattt	gacactacgg	aagtaactga	3300
agatctgctt	ttacatgcga	gacacatctt	ctaaagtaat	tttaataata	gttactatat	3360
tcaagatttc	atatatcaaa	tactcaatat	tacttctaaa	aaattaatta	gatataatta	3420
aaatattact	tttttaattt	taagtttaat	tgttgaattt	gtgactattg	atttattatt	3480
ctactatggt	taaattgttt	tatagatagt	ttaaagtaaa	tataagtaat	gtagtagagt	3540
gtagtagtgt	taccctaaac	cataaactat	aagatttatg	gtggactaat	tttcatatat	3600
ttcttattgc	ttttaccttt	tcttggtagt	taagtccgta	actggaatta	ctgtgggttg	3660
ccatgacact	ctgtggtctt	ttggttcatt	catggatgct	tgcgcaagaa	aaagacaaag	3720
aacaaagaaa	aaagacaaaa	cagagagaca	aaacgcaatc	acacaaccaa	ctcaaattag	3780
tcactggctg	atcaagatcg	ccgcgtccat	gtatgtctaa	atgccatgca	aagcaacacg	3840
tgcttaacat	gcactttaaa	tggtcacccc	atctcaaccc	acacacaaac	acattgcctt	3900
tttcttcatc	atcaccacaa	ccacctgtat	atattcattc	tcttccgcca	cctcaatttc	3960
ttcacttcaa	cacacgtcaa	cctgcatatg	cgtgtcatcc	catgccc aaa	tctccatgca	4020
tgttccaacc	accttctctc	ttatataata	cctataaata	cctctaatat	cactcacttc	4080
tttcatcatc	catccatcca	gagtactact	actctactac	tataataccc	caacccaact	4140
catattcaat	actactctag	gatccaacaa	tgtctgtccc	aaccgctgac	atcagggcta	4200
gggctccaga	ggctaagaag	gttcacatcg	ctgataccgc	tatcaacagg	cacaattggg	4260
acaagcacgt	gaactggctc	aacgtcttcc	tcatcatcgg	aatcccatc	tacggatgca	4320
tccaagcttt	ctgggttcca	cttcaactca	agaccgctat	ctgggctgtg	atctactact	4380
tcttcaccgg	acttggaaatc	accgctggat	accacaggct	ttgggctcac	tgctcatact	4440

ES 2 623 454 T3

ctgctactct tccacttagg atctggcttg ctgctgttgg aggaggagct gttgagggat 4500
 ctatcagatg gtgggctagg gatcacaggg ctcatcatag gtacaccgat accgacaagg 4560
 acccatactc tgttaggaag ggacttctct actctcacct tggatggatg gtgatgaagc 4620
 agaacccaaa gaggatcggg aggaccgaca tctctgatct caacgaggac ccagttgttg 4680
 tttggcaaca caggaactac ctcaagggtg tgttcaccat gggacttgct gttccaatgc 4740
 ttgttgctgg acttggatgg ggagattggc ttggaggatt cgtgtacgct ggaatcctta 4800
 ggatcttctt cggtcaacaa gctaccttct gcgtgaactc tcttgctcac tggcttgagg 4860
 atcaaccatt cgatgatagg aactctccta gggatcacgt gatcacgct cttgttacct 4920
 ttggagaggg ataccacaac ttccaccacg agttcccatc tgactacagg aacgctatcg 4980
 agtggcacca gtacgatcct accaagtggg ctatctgggc ttggaagcaa cttggattgg 5040
 cttacgatct caagaagttc agggctaacg agatcgagaa ggaagggtt caacaacttc 5100
 agaagaagct tgataggaag agggctactc ttgattgggg aacccactt gatcaacttc 5160
 cagtgatgga atgggatgac tacgttgagc aagctaagaa cggaagggga cttgttgcta 5220
 tcgctggagt tgttcacgat gttaccgact tcatcaagga tcaccagga ggaaaggcta 5280
 tgatctcttc tggaaatcggg aaggatgcta ccgctatgtt caacggagga gtgtactacc 5340
 actctaacgc agctcacaac cttcttagca ccatgagggg gggagtgatc aggggaggat 5400
 gcgaggttga gatctggaag agggctcaga aggagaacgt tgagtacgtt agggatggat 5460
 ctggacaaag ggtgatcagg gctggagagc aaccaaccaa gatccagag ccaatcccaa 5520
 ccgctgatgc tgcttgagta gttagcttaa tcacctaggt caccagtatg aactaaaatg 5580
 catgtagggtg taagagctca tggagagcat ggaatattgt atccgaccat gtaacagtat 5640
 aataactgag ctccatctca cttcttctat gaataaaca aggatgttat 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 tatataattat atattacca cttatgtatt 5940
 atattaggat gttaaggaga cataacaatt ataaagagag aagtttgtat ccatttatat 6000
 attatatact acccatattat atattatact tatccactta tttaatgtct ttataagggt 6060
 tgatccatga tatttctaata attttagttg atatgtatat gaaaaggtag tatttgaact 6120
 ctcttactct gtataaagggt tggatcatcc ttaaagtggg tctatttaat tttattgctt 6180
 cttacagata aaaaaaaaaat tatgagttgg ttgtataaaa 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 2 623 454 T3

caatggtgtc	ccaatcctta	tacaaccaac	ttccacaaga	aagtcaagtc	agagacaaca	6540
aaaaaacaag	caaaggaaat	ttttaatttt	gagttgtcct	gtttgctgca	taatttatgc	6600
agtaaaacac	tacacataac	ccttttagca	gtagagcaat	ggttgaccgt	gtgcttagct	6660
tcttttattt	tattttttta	tcagcaaaga	ataaataaaa	taaaatgaga	cacttcaggg	6720
atgtttcaac	ccttatacaa	aaccccaaaa	acaagtttcc	tagcacccta	ccaacgaatt	6780
cgcggccgct	ttcctgcatg	acatcgctct	gcagagccaa	gcgcatgctt	aattaaacta	6840
gtctcccagt	atcattatag	tgaaagtttt	ggctctctcg	cgggtggttt	tttacctcta	6900
tttaaagggg	ttttccacct	aaaaattctg	gtatcattct	cactttactt	gttactttaa	6960
tttctcataa	tctttggttg	aaattatcac	gcttccgcac	acgatatccc	tacaaattta	7020
ttatttggtt	aacattttca	aaccgcataa	aattttatga	agtcccgtct	atctttaatg	7080
tagtctaaca	ttttcatatt	gaaatatata	atttacttaa	ttttagcggt	ggtagaaagc	7140
ataatgattt	attcttattc	ttcttcatat	aaatgtttta	tatacaatat	aaacaaattc	7200
tttaccttaa	gaaggatttc	ccattttata	ttttaaaaaat	atattttatca	aatatttttc	7260
aaccacgtaa	atctcataat	aataagttgt	ttcaaaaagta	ataaaaattta	actccataat	7320
ttttttattc	gactgatctt	aaagcaacac	ccagtgacac	aactagccat	ttttttcttt	7380
gaataaaaaa	atccaattat	cattgtattt	tttttataca	atgaaaattt	caccaaacaa	7440
tgatttggtg	tatttctgaa	gcaagtcatg	ttatgcaaaa	ttctataatt	cccatttgac	7500
actacggaag	taactgaaga	tctgctttta	catgcgagac	acatcttcta	aagtaatttt	7560
aataatagtt	actatattca	agatttcata	tatcaaatac	tcaatattac	ttctaaaaaa	7620
ttaattagat	ataattaa	tattactttt	ttaattttta	gtttaattgt	tgaatttggtg	7680
actattgatt	tattattcta	ctatgtttta	attgttttat	agatagttta	aagtaaatat	7740
aagtaatgta	gtagagtgtt	agagtgttac	cctaaaccat	aaactataag	atttatgggtg	7800
gactaatttt	catatatctt	ttattgcttt	taccttttct	tggtatgtaa	gtccgtaact	7860
ggaattactg	tgggttgcca	tgacactctg	tggctctttg	gttcatgcat	ggatcttgcg	7920
caagaaaaag	acaaagaaca	aagaaaaaag	acaaaacaga	gagacaaaac	gcaatcacac	7980
aaccaactca	aattagtcac	tggtgatca	agatcgccgc	gtccatgtat	gtctaaatgc	8040
catgcaaagc	aacacgtgct	taacatgcac	tttaaattggc	tcacccatct	caaccacac	8100
acaaacacat	tgcttttttc	ttcatcatca	ccacaaccac	ctgtatatat	tcattctctt	8160
ccgccacctc	aatttcttca	cttcaacaca	cgtcaacctg	catatgctgt	tcaccccatg	8220
cccaaattct	catgcatggt	ccaaccacct	tctctcttat	ataataccta	taaataacctc	8280
taatatcact	cacttctttc	atcatccatc	catccagagt	actactactc	tactactata	8340
atacccaac	ccaactcata	ttcaatacta	ctctaggtac	cctgcaggga	tccaacaatg	8400
gctgcacttg	atagcatccc	tgaggacaaa	gcaactagct	ccaagtcaac	ccacatacag	8460
taccaagagg	tcacgttttag	gaactggtac	aagaaaaatca	actgggtcaa	cacgaccctt	8520

ES 2 623 454 T3

gttgtcctca ttcctgctct tgggttgtag ttgacgagaa ccacacctct caccagacct 8580
 accctcattt ggtctgttct ctactatttc tgtacagcgt ttggcatcac tgggtggctac 8640
 cacagacttt ggtcccatag gtcttacagt gcgagggttg cattgagact cttcctggct 8700
 ttcactggag ctggtgcat ccaagggtct gcaagatggt ggtcagccaa tcatagggca 8760
 catcaccgtt ggacggacac catgaaggac cctactctg tgatgagagg actgtgttc 8820
 tcccacatag gttggatggt tctcaactct gatccaaagg tcaaaggcag aacagatggt 8880
 tctgatcttg actctgatcc cgtcgttggt tggcaacaca aacactatgg caagtgttg 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 tctcttcag cttccagtga tctcatggga tgactttcaa 9420
 gctcgttgca aagaaagtgg agagatgctt gttgctgttg ctggagtgat ccatgatgtc 9480
 tcccagttca ttgaagatca tcttgggtgg aggagcctca ttagaagtgc tgttgggaaa 9540
 gatgggactg gcatgttcaa tgggtggagt tatgaacatt caaacgccgc acacaacttg 9600
 ctgagcacia tgagagtttg agtcttgaga ggtggacaag aagtggaggt ttggaagaaa 9660
 cagaggggtg atgttcttgg gaagtcagac attcttcgtc aagtgacaag ggtggagcgt 9720
 ctggtggaag gagctgttgc agcgtgatga gtagttagct taatcaccta gagctcggtc 9780
 acctcgagta tcaaaatcta tttagaata cacaatattt tgttgaggc ttgctggaga 9840
 atcgatctgc tatcataaaa attacaaaa aattttattt gcctcaatta ttttaggatt 9900
 ggtattaagg acgcttaaat tatttgtcgg gtcactacgc atcattgtga ttgagaagat 9960
 cagcgatacg 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 tttggttgcc tttgccaaca tgggagtgca aggttggt 10247

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7320
 <400> 55

ES 2 623 454 T3

aattcgcggc cgcttttcctg catgacatcg tcctgcagag ccaagcgcgcat gcttaattaa	60
actagtctcc cagtatcatt atagtgaag ttttggctct ctcgccggtg gttttttacc	120
tctattttaa ggggttttcc acctaaaaat tctgggtatca ttctcacttt acttggtact	180
ttaatttctc ataatctttg gttgaaatta tcacgcttcc gcacacgata tccctacaaa	240
tttatttttt gttaaacatt ttcaaaccgc ataaaatttt atgaagtccc gtctatcttt	300
aatgtagtct aacattttca tattgaaata tataatttac ttaatttttag cgttggtaga	360
aagcataatg atttattctt attcttcttc atataaatgt ttaatatata atataaaca	420
attctttacc ttaagaagga tttcccatTT tatattttta aaatatattt atcaaata	480
tttcaaccac gtaaatctca taataataag ttgtttcaaa agtaataaaa tttaactcca	540
taattttttt attcgactga tcttaaagca acaccagtg acacaactag ccattttttt	600
ctttgaataa aaaaatccaa ttatcattgt atttttttta tacaatgaaa atttcaccaa	660
acaatgattt gtggtatttc tgaagcaagt catgttatgc aaaattctat aattccatt	720
tgacactacg gaagtaactg aagatctgct ttacatgcg agacacatct tctaaagtaa	780
ttttaataat agttactata ttcaagattt catatatcaa atactcaata ttacttctaa	840
aaaattaatt agatataatt aaaaatttac ttttttaatt ttaagtttaa ttgttgaatt	900
tgtgactatt gatttattat tctactatgt ttaaattggt ttatagatag tttaaagtaa	960
atataagtaa tgtagtagag tgtagagtg ttaccctaaa ccataaacta taagatttat	1020
ggtggactaa ttttcatata tttcttattg cttttacctt ttcttggtat gtaagtccgt	1080
aactggaatt actgtgggtt gccatgacac tctgtggtct tttggttcat gcatggatct	1140
tgcgcaagaa aaagacaaag aacaaagaaa aaagacaaaa cagagagaca aaacgcaatc	1200
acacaaccaa ctcaaattag tcaactggctg atcaagatcg ccgcgtccat gtatgtctaa	1260
atgccatgca aagcaacacg tgcttaacat gcactttaaa tggctcacc atctcaacc	1320
acacacaaac acattgcctt tttcttcac atcaccacaa ccacctgtat atattcatc	1380
tcttccgcca cctcaatttc ttcaactcaa cacacgtcaa cctgcatatg cgtgtcatcc	1440
catgcccata tctccatgca tgttccaacc accttctctc ttatataata cctataaata	1500
cctctaatat cactcacttc tttcatcatc catccatcca gactactact actctactac	1560
tataataccc caaccact catattcaat actactctag gtaccctgca gggatccaac	1620
aatggctgca cttgatagca tcctgagga caaagcaact agctccaagt caaccacat	1680
acagtaccaa gaggtcacgt ttaggaactg gtacaagaaa atcaactggc tcaacacgac	1740
ccttgttgtc ctcatctctg ctcttgggtt gtacttgacg agaaccacac ctctcaccag	1800
acctaccctc atttggctctg ttctctacta tttctgtaca gcgtttggca tcactgggtg	1860
ctaccacaga ctttgggtccc ataggtctta cagtgcgagg ttgccattga gactcttcct	1920
ggctttcact ggagctgggt cgatccaagg ttctgcaaga tgggtggtcag ccaatcatag	1980
ggcacatcac cgttggacgg acaccatgaa ggacccctac tctgtgatga gaggactgct	2040

ES 2 623 454 T3

gttctccac ataggttga tggttctcaa ctctgatcca aaggtcaaag gcagaacaga 2100
 tgtttctgat cttgactctg atcccgtcgt tgtgtggcaa cacaacact atggcaagtg 2160
 tttgctcttt gccgcttga tctttccgat gatagtggct gggctgggtt ggggagattg 2220
 gtggggtga cttgtctatg ctggcatcat acgtgcctgc tttgttcagc aagccacttt 2280
 ctgtgtcaac tcattggcac attggatagg tgaacaaccg tttgatgaca gacgtactcc 2340
 aagggatcat gttctgactg cgttggtcac aatgggagaa ggataccaca acttccacca 2400
 tgagtttccg agtgactaca gaaatgccat catttgggtat cagtatgacc ctacaaagtg 2460
 gctcatctat ctcttcagct tgggtccctt cccattggcc tactctctca agaccttccg 2520
 ttccaatgag attgagaaag gaaggcttca gcaacagcaa aaggctcttg acaagaaaag 2580
 aagtggctctt gattggggac ttcctctctt ccagcttcca gtgatctcat gggatgactt 2640
 tcaagctcgt tgcaaagaaa gtggagagat gcttgttgct gttgctggag tgatccatga 2700
 tgtctccag ttcattgaag atcatcctgg tgggaggagc ctcattagaa gtgctgttgg 2760
 gaaagatggg actggcatgt tcaatggtgg agtgatgaa cattcaaacg ccgcacacaa 2820
 cttgctgagc acaatgagag ttggagtctt gagagggtga caagaagtgg aggtttggaa 2880
 gaaacagagg gtggatgttc ttgggaagtc agacattctt cgtcaagtga caagggtgga 2940
 gcgtctggtg gaaggagctg ttgcagcgtg atgagtagtt agcttaatca cctagagctc 3000
 ggtcacctcg agtatcaaaa tctatttaga aatacacaat attttgttgc aggccttgctg 3060
 gagaatcgat ctgctatcat aaaaattaca aaaaaatttt atttgctca attatttttag 3120
 gattgggtatt aaggacgctt aaattatttg tcgggtcact acgcatcatt gtgattgaga 3180
 agatcagcga tacgaaatat tcgtagtact atcgataatt tatttgaaaa ttcataagaa 3240
 aagcaaacgt tacatgaatt gatgaaacaa tacaaagaca gataaagcca cgcacattta 3300
 ggatattggc cgagattact gaatattgag taagatcacg gaatttctga caggagcatg 3360
 tcttcaattc agcccaaatg gcagttgaaa tactcaaacc gcccataatg 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 cgataatgtc 3840
 gggcaatcag gtgcgacaat ctatcgcttg tatgggaagc ccgatgcgcc agagttgttt 3900
 ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt cagactaaac 3960
 tggctgacgg aatttatgcc tcttccgacc atcaagcatt ttatccgtac tcctgatgat 4020
 gcatgggttac tcaccactgc gatccccgga aaaacagcat tccaggtatt agaagaatat 4080

ES 2 623 454 T3

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

<210> 56
<211> 9956
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Plásmido pDAB7323

<400> 56

ES 2 623 454 T3

ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccggtgg ttttttacct	60
ctattttaag gggttttcca cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt	120
taattttctca 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 aatatattta tcaaatattt	420
ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat	480
aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgta cacaactagc catttttttc	540
tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaa tttcaccaaa	600
caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt	660
gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgca gacacatctt ctaaagtaat	720
tttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaa tactcaatat tacttctaaa	780
aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt	840
gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattgttt tatagatagt ttaaagtaaa	900
tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg	960
gtggactaat tttcatatat ttctttattgc ttttaccttt tcttggtatg taagtccgta	1020
actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtctt ttggttcatg catggatctt	1080
gcgcaagaaa aagacaaaga acaaagaaa 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
atgccc aaat ctccatgcat gttccaacca cttctctct tatataatac ctataaatac	1440
ctctaataac actcacttct ttcacatccc 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 2 623 454 T3

tctggactgg	ggataactgc	tggggcacat	agactctggg	ctcacaagtc	atacaaagcc	1860
aagtggccac	tcagagttat	actgggtcatc	ttcaacacgg	ttgcctttca	agacgctgct	1920
atggattggg	ctcgtgacca	tagaatgcat	cacaagtaca	gcgagaccga	cgcggaacca	1980
cacaatgcaa	cgagaggttt	cttcttctct	cacattggct	ggcttcttgt	taggaaacat	2040
cctgatctga	aagaaaaagg	gaagggactc	gacatgagtg	atctccttgc	tgatccaata	2100
ctccgttttc	agaagaagta	ctatctgata	ctcatgcctc	tggcctgttt	tgtgatgcca	2160
accgttatcc	cggtttactt	ttggggagaa	acttggacaa	atgctttctt	cgtaggcagcc	2220
atgttccgtt	atgctttcat	cctgaatgtt	acctgggttg	tgaactctgc	cgcacacaag	2280
tggggagaca	aacctatga	caagtcctc	aagccttccg	aaaacctttc	agttgcgatg	2340
tttgctttgg	gagaaggatt	tcacaattac	catcacactt	ttccgtggga	ctacaagaca	2400
gcagagcttg	gaaacaacaa	gttgaacttc	acaacaacgt	tcatcaattt	ctttgcgaaa	2460
atcggttggg	cctatgattt	gaagactgtg	agtgatgaca	ttgtcaagaa	caggggtcaag	2520
agaactggcg	atggaagcca	tcctctctgg	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
tatttttagga	ttggtattaa	ggacgcttaa	attatttgtc	gggtcactac	gcatcattgt	2820
gattgagaag	atcagcgata	cgaaatattc	gtagtactat	cgataattta	tttgaaaatt	2880
cataagaaaa	gcaaacgtta	catgaattga	tgaaacaata	caaagacaga	taaagccacg	2940
cacatttagg	atattggccg	agattactga	atattgagta	agatcacgga	atttctgaca	3000
ggagcatgtc	ttcaattcag	cccaaattgg	agttgaaata	ctcaaaccgc	cccatatgca	3060
ggagcggatc	attcattgtt	tgtttggttg	cctttgcca	catgggagtc	caaggttggc	3120
gcgccgacct	agctttcttg	tacaaagtgg	gcattataag	aaagcattgc	ttatcaattt	3180
gttgcaacga	acaggtcact	atcagtcaaa	ataaaatcat	tatttgccat	ccagctgata	3240
tccctatag	tgagtcgtat	tacatgggtc	tagctgtttc	ctggcagctc	tggcccgtgt	3300
ctcaaaatct	ctgatgttac	attgcacaag	ataaaaatat	atcatcatga	acaataaaac	3360
tgtctgctta	cataaacagt	aatacaaggg	gtgttatgag	ccatattcaa	cgggaaacgt	3420
cgaggccgcg	attaaattcc	aacatggatg	ctgatttata	tgggtataaa	tgggctcgcg	3480
ataatgtcgg	gcaatcaggt	gcgacaatct	atcgcttgta	tgggaagccc	gatgcgccag	3540
agttgtttct	gaaacatggc	aaaggtagcg	ttgccaatga	tgttacagat	gagatgggtca	3600
gactaaactg	gctgacggaa	tttatgcctc	ttccgacctc	caagcatttt	atccgtactc	3660
ctgatgatgc	atggttactc	accactgcga	tccccggaaa	aacagcattc	caggtatttag	3720
aagaatatcc	tgattcaggt	gaaaatattg	ttgatgcgct	ggcagtggtc	ctgcgccggt	3780
tgcattcgat	tcctgtttgt	aattgtcctt	ttaacagcga	tcgcgtattt	cgtctcgctc	3840

ES 2 623 454 T3

aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgagag tgattttgat gacgagcgta 3900
 atggctggcc tgttgaacaa gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca ttctcaccgg 3960
 attcagtcgt cactcatggt gattttctac ttgataacct tatttttgac gaggggaaat 4020
 taataggttg tattgatgtt ggacgagtcg gaatcgaga ccgataccag gatcttgcca 4080
 tcctatggaa ctgcctcggg gagttttctc cttcattaca gaaacggctt 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 aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 4380
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc 4440
 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 4500
 ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 4560
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 4620
 ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 4680
 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 4740
 agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 4800
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 4860
 atagtctgtg cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 4920
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 4980
 gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 5040
 ttaccgcctt tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt 5100
 cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 5160
 cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt tttccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 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 ccagtcctta gctcgggccc caaataatga 5580
 ttttattttg actgatatgt acctgttcgt tgcaacaaat tgatgagcaa tgctttttta 5640
 taatgccaac tttgtacaaa aaagcaggct ccgcgcccg actaggttta aactctagaa 5700
 gctaggaatt caaacaaga agcagtcgag cggccgcat tgtactccca gtatcattat 5760
 agtgaaagtt ttggctctct cgccggtggg tttttacctc tatttaaagg gggtttccac 5820
 ctaaaaattc tggatcatt ctcactttac ttgttacttt aatttctcat aatctttggg 5880

ES 2 623 454 T3

tgaaattatc	acgcttccgc	acacgatatc	cctacaaatt	tattatttgt	taaacatttt	5940
caaaccgcat	aaaattttat	gaagtcccgt	ctatctttta	tgtagtctaa	cattttcata	6000
ttgaaatata	taattttactt	aatttttagcg	ttggtagaaa	gcataatgat	ttattcttat	6060
tcttcttcat	ataaatgttt	aatatacaat	ataaacaat	tctttacctt	aagaaggatt	6120
tcccatttta	tatttttaaaa	atatatttat	caaatatfff	tcaaccacgt	aaatctcata	6180
ataataagtt	gtttcaaaag	taataaaatt	taactccata	atftttttat	tcgactgatc	6240
ttaaagcaac	accagtgac	acaactagcc	atftttttct	ttgaataaaa	aaatccaatt	6300
atcattgtat	tttttttata	caatgaaaat	ttcaccaaac	aatgatttgt	ggtattttctg	6360
aagcaagtca	tgttatgcaa	aattctataa	ttcccatttg	acactacgga	agtaactgaa	6420
gatctgcttt	tacatgcgag	acacatcttc	taaagtaatt	ttaataatag	ttactatatt	6480
caagatttca	tatatcaaat	actcaatatt	acttctaaaa	aattaattag	atataattaa	6540
aatattactt	ttttaatttt	aagttaatt	gttgaatttg	tgactattga	tttattattc	6600
tactatgttt	aaattgtttt	atagatagtt	taaagtaaat	ataagtaatg	tagtagagtg	6660
ttagagtgtt	accctaacc	ataaactata	agatttatgg	tggaactaatt	ttcatatatt	6720
tcttattgct	tttacctttt	cttggatgt	aagtcgtaa	ctggaattac	tgtgggttgc	6780
catgacactc	tgtggtcttt	tggttcatgc	atggatgctt	gcgcaagaaa	aagacaaaga	6840
acaagaaaa	aagacaaaac	agagagacaa	aacgcaatca	cacaaccaac	tcaaattagt	6900
cactggctga	tcaagatcgc	cgctccatg	tatgtctaaa	tgccatgcaa	agcaacacgt	6960
gcttaacatg	cactttaaat	ggctcaccca	tctcaaccca	cacacaaaca	cattgccttt	7020
ttcttcatca	tcaccacaac	cacctgtata	tattcattct	cttccgccac	ctcaatttct	7080
tcacttcaac	acacgtcaac	ctgcatatgc	gtgtcatccc	atgcccacaa	ctccatgcat	7140
gttccaacca	ccttctctct	tatataatac	ctataaatac	ctctaataatc	actcacttct	7200
ttcatcatcc	atccatccag	agtactacta	ctctactact	ataatacccc	aacccaactc	7260
atattcaata	ctactctagg	atccaacaat	gtctgtctca	accgctgaca	tcagggttag	7320
ggctccagag	gctaagaagg	ttcacatcgc	tgataccgct	atcaacaggc	acaattggta	7380
caagcacgtg	aactggctca	acgtcttcct	catcatcgga	atcccactct	acggatgcat	7440
ccaagctttc	tgggttccac	ttcaactcaa	gaccgctatc	tgggctgtga	tctactactt	7500
cttcaccgga	cttggaaatca	ccgctggata	ccacaggctt	tgggctcact	gctcactactc	7560
tgctactctt	ccacttagga	tctggcttgc	tgctgttggg	ggaggagctg	ttgagggatc	7620
tatcagatgg	tgggctaggg	atcacagggc	tcatcatagg	tacaccgata	ccgacaagga	7680
cccatactct	gttaggaagg	gacttctcta	ctctcacctt	ggatggatgg	tgatgaagca	7740
gaacccaaag	aggatcgga	ggaccgacat	ctctgatctc	aacgaggacc	cagttgttgt	7800
ttggcaacac	aggaactacc	tcaagggtgt	gttcaccatg	ggacttgctg	ttccaatgct	7860
tgttgctgga	cttggatggg	gagattggct	tggaggattc	gtgtacgctg	gaatccttag	7920

ES 2 623 454 T3

gatcttcttc gttcaacaag ctaccttctg cgtgaactct cttgctcact ggcttgagaga 7980
tcaaccattc gatgatagga actctcctag ggatcacgtg atcacccgtc ttgttaccct 8040
tggagagggg taccacaact tccaccacga gttcccatct gactacagga acgctatcga 8100
gtggcaccag tacgatccta ccaagtgggc tatctgggct tggaagcaac ttggattggc 8160
ttacgatctc aagaagttca gggctaacga gatcgagaag ggaaggggtc aacaacttca 8220
gaagaagctt gataggaaga gggctactct tgattgggga accccacttg atcaacttcc 8280
agtgatggaa tgggatgact acgttgagca agctaagaac ggaaggggac ttgttgctat 8340
cgctggagtt gttcacgatg ttaccgactt catcaaggat caccagaggag gaaaggctat 8400
gatctcttct ggaatcggaa aggatgctac cgctatgttc aacggaggag tgtactacca 8460
ctctaacgca gctcacaacc ttcttagcac catgaggggtg ggagtgatca ggggaggatg 8520
cgaggttgag atctggaaga gggctcagaa ggagaacgtt gagtacgtta gggatggatc 8580
tggacaaagg gtgatcaggg ctggagagca accaaccaag atcccagagc caatcccaac 8640
cgctgatgct gcttgagtag ttagcttaat cacctagggtc accagtatga actaaaatgc 8700
atgtagggtg aagagctcat ggagagcatg gaatattgta tccgaccatg taacagtata 8760
ataactgagc tccatctcac ttcttctatg aataaacaac ggatgttatg atatattaac 8820
actctatcta tgcaccttat tgttctatga taaatttcct cttattatta taaatcatct 8880
gaatcgtgac ggcttatgga atgcttcaaa tagtacaaaa acaaatgtgt actataagac 8940
tttctaaca attctaactt tagcattgtg aacgagacat aagtgttaag aagacataac 9000
aattataatg gaagaagttt gtctccattt atatattata tattaccac ttatgtatta 9060
tattaggatg ttaaggagac ataacaatta taaagagaga agtttgtatc catttatata 9120
ttatatacta cccatttata tattataact atccacttat ttaatgtctt tataagggtt 9180
gatccatgat atttctaata ttttagttga tatgtatatg aaaagggtact atttgaactc 9240
tcttactctg tataaagggtt ggatcatcct taaagtgggt ctatttaatt ttattgcttc 9300
ttacagataa aaaaaaatt atgagttgggt ttgataaaat attgaaggat ttaaaataat 9360
aataaataat aaataacata taatatatgt atataaattt attataatat aacatttatc 9420
tataaaaaag taaatattgt cataaatcta tacaatcgtt tagccttgct ggaacgaatc 9480
tcaattatct aaacgagagt aaacatatct gacttttttg ttatttaaca aattattatt 9540
taacactata tgaaattttt tttttttatc agcaaagaat aaaattaaat taagaaggac 9600
aatggtgtcc caatccttat acaaccaact tccacaagaa agtcaagtca gagacaacaa 9660
aaaaacaagc aaaggaaatt ttttaatttg agttgtcttg tttgctgcat aattttatgca 9720
gtaaaacact acacataacc cttttagcag tagagcaatg gttgaccgtg tgcttagctt 9780
cttttatttt atttttttat cagcaaagaa taaataaaat aaaatgagac acttcaggga 9840
tgtttcaacc cttatacaaa accccaaaaa caagtttcct agcaccctac caacgaattc 9900
gcggccgctt tcctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcattgctta attaaa 9956

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

<220>
10 <223> Plásmido pDAB7325

<400> 57

ES 2 623 454 T3

aattcgcggc	cgctttcctg	catgacatcg	tcctgcagag	ccaagcgcat	gcttaattaa	60
actagtctcc	cagtatcatt	atagtgaag	ttttggctct	ctcgccggtg	gttttttacc	120
tctattttaa	ggggttttcc	acctaaaaat	tctgggtatca	ttctcacttt	acttggtact	180
ttaattttct	ataatctttg	gttgaaatta	tcacgcttcc	gcacacgata	tcctacaaa	240
tttattattt	gttaaacatt	ttcaaaccgc	ataaaatttt	atgaagtccc	gtctatcttt	300
aatgtagtct	aacattttca	tattgaaata	tataatttac	ttaattttag	cgttggtaga	360
aagcataatg	attttattct	attcttcttc	atataaatgt	ttaatatata	atataaaca	420
attctttacc	ttaagaagga	tttcccattt	tatatattta	aaatatattt	atcaaataat	480
tttcaaccac	gtaaattctc	taataataag	ttgtttcaaa	agtaataaaa	tttaactcca	540
taattttttt	attcgactga	tcttaaagca	acaccagtg	acacaactag	ccattttttt	600
ctttgaataa	aaaaatccaa	ttatcattgt	atttttttta	tacaatgaaa	atttcaccaa	660
acaatgattt	gtggattttc	tgaagcaagt	catgttatgc	aaaattctat	aattcccatt	720
tgacactacg	gaagtaactg	aagatctgct	tttcatgctg	agacacatct	tctaaagtaa	780
ttttaataat	agttactata	ttcaagattt	catatatcaa	atactcaata	ttacttctaa	840
aaaattaatt	agatataatt	aaaatattac	ttttttaatt	ttaagtttaa	ttgttgaatt	900
tgtgactatt	gatttattat	tctactatgt	ttaaattggt	ttatagatag	tttaaagtaa	960
atataagtaa	tgtagtagag	tgtagagtgt	ttaccctaaa	ccataaacta	taagatttat	1020
gggtggactaa	ttttcatata	tttcttattg	cttttacctt	ttcttggtat	gtaagtccgt	1080
aactggaatt	actgtgggtt	gccatgacac	tctgtggtct	tttggttcat	gcatggatct	1140
tgcgcaagaa	aaagacaaag	aacaaagaaa	aaagacaaaa	cagagagaca	aaacgcaatc	1200
acacaaccaa	ctcaaattag	tcactggctg	atcaagatcg	ccgcgtccat	gtatgtctaa	1260
atgccatgca	aagcaacacg	tgcttaacat	gcactttaaa	tggtcaccac	atctcaaccc	1320
acacacaaac	acattgcctt	tttcttcata	atcaccacaa	ccacctgtat	atattcattc	1380
tcttccgcca	cctcaatttc	ttcacttcaa	cacacgtcaa	cctgcatatg	cggtgcatcc	1440
catgcccata	tctccatgca	tggtccaacc	accttctctc	ttatataata	cctataaata	1500
cctctaataat	cactcacttc	tttcatcctc	catccatcca	gagtactact	actctactac	1560
tataataccc	caacccaact	catattcaat	actactctag	gtaccctgca	gggatccaac	1620
aatggctccc	aacatttctg	aggatgtcaa	tggtgttctt	tttgagttag	atgcggcaac	1680
ccctgatttg	gctctttcca	caccacctgt	gcaaaaagct	gacaacagac	ccaagcaact	1740

ES 2 623 454 T3

tgtgtggagg	aacattttgc	ttttcgctta	cttgcacctc	gcagctctct	acggaggcta	1800
tttgtttctc	ttcagtgcaa	aatggcagac	cgacattttc	gcttacattc	tttatgtcat	1860
ctctggactg	gggataactg	ctggggcaca	tagactctgg	gctcacaagt	catacaaagc	1920
caagtggcca	ctcagagtta	tactggtcat	cttcaacacg	gttgcccttc	aagacgctgc	1980
tatggattgg	gctcgtgacc	atagaatgca	tcacaagtac	agcgagaccg	acgcggaccc	2040
acacaatgca	acgagagggt	tcttcttctc	tcacattggc	tggcttcttg	ttaggaaaca	2100
tcctgatctg	aaagaaaaag	ggaagggact	cgacatgagt	gatctccttg	ctgatccaat	2160
actccgtttt	cagaagaagt	actatctgat	cctcatgcct	ctggcctgtt	ttgtgatgcc	2220
aaccgttatc	ccggtttact	tttggggaga	aacttggaca	aatgctttct	tcgtggcagc	2280
catgttcctg	tatgctttca	tcctgaatgt	tacctggttg	gtgaactctg	ccgcacacaa	2340
gtggggagac	aaaccctatg	acaagtccat	caagccttcc	gaaaaccttt	cagttgcat	2400
gtttgctttg	ggagaaggat	ttcacaatta	ccatcacact	tttccgtggg	actacaagac	2460
agcagagctt	ggaaacaaca	agttgaactt	cacaacaacg	ttcatcaatt	tctttgcgaa	2520
aatcggttgg	gcctatgatt	tgaagactgt	gagtgatgac	attgtcaaga	acagggtcaa	2580
gagaactggc	gatggaagcc	atcatctctg	gggctggggg	gatgagaatc	agagcaaaga	2640
agagatagat	gcagccatta	ggatcaaccc	taaagacgat	tgagtagtta	gcttaatcac	2700
ctagagctcg	gtcacctcga	gtatcaaaat	ctatttagaa	atacacaata	ttttgttgca	2760
ggcttgctgg	agaatcgatc	tgctatcata	aaaattacaa	aaaaatttta	tttgccctcaa	2820
ttatttttagg	attggtatta	aggacgctta	aattatttgt	cgggtcacta	cgcatcattg	2880
tgattgagaa	gatcagcgat	acgaaatatt	cgtagtacta	tcgataatth	atttgaaaat	2940
tcataagaaa	agcaaacggt	acatgaattg	atgaaacaat	acaaagacag	ataaagccac	3000
gcacatttag	gatattggcc	gagattactg	aatattgagt	aagatcacgg	aatttctgac	3060
aggagcatgt	cttcaattca	gccc aaatgg	cagttgaaat	actcaaaccg	ccccatattg	3120
aggagcggat	cattcattgt	ttgtttgggt	gcctttgcca	acatgggagt	ccaagggttg	3180
cgcgccgacc	cagctttctt	gtacaaagtt	ggcattataa	gaaagcattg	cttatcaatt	3240
tgttgcaacg	aacaggtcac	tatcagtcaa	aataaaatca	ttatttgcca	tccagctgat	3300
atcccctata	gtgagtcgta	ttacatggtc	atagctgttt	cctggcagct	ctggcccgtg	3360
tctcaaaatc	tctgatgtta	cattgcacaa	gataaaaata	tatcatcatg	aacaataaaa	3420
ctgtctgctt	acataaacag	taatacaagg	ggtgttatga	gccatattca	acgggaaacg	3480
tcgaggccgc	gattaaattc	caacatggat	gctgatttat	atgggtataa	atgggctcgc	3540
gataatgtcg	ggcaatcagg	tgcgacaatc	tatcgcttgt	atgggaagcc	cgatgcgcca	3600
gagttgtttc	tgaaacatgg	caaaggtagc	gttgccaatg	atgttacaga	tgagatggtc	3660
agactaaact	ggctgacgga	atttatgcct	cttccgacca	tcaagcattt	tatccgtact	3720
cctgatgatg	catggttact	caccactgcg	atccccggaa	aaacagcatt	ccaggtatta	3780

ES 2 623 454 T3

```

gaagaatatc ctgattcagg tgaatatatt gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg 3840
ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct 3900
caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt 3960
aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata aacttttgcc attctcaccg 4020
gattcagtcg tcaactcatg tgattttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa 4080
ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca ggatcttgcc 4140
atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ctttcattac agaaacggct ttttcaaaaa 4200
tatggtattg ataactctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt 4260
ttctaatacag aattgggttaa ttggttgtaa cactggcaga gcattacgct gacttgacgg 4320
gacggcgcaa gctcatgacc aaaaaccctt aacgtgagtt acgcgtcggt ccactgagcg 4380
tcagaccccc 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
ctcgtcttgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 4680
gggttgact caagacgata gttaccgat aaggcgagc ggtcgggctg aacggggggt 4740
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 4800
gagcattgag aaagcgccac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaacg 4860
ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 4920
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca 4980
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt 5040
tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 5100
attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag 5160
tcagtgagcg aggaagcgga agagcgcca atacgcaaac cgctctctcc cgcgcggttg 5220
ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaagcggg cagtgagcgc 5280
aacgcaatta atacgcgtac cgtagccag gaagagtgtg tagaaacgca aaaaggccat 5340
ccgtcaggat ggccttctgc ttagtttgat gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc 5400
gccaccctcc gggccgttgc ttcacaacgt tcaaaccgc tcccggcgga tttgtcctac 5460
tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga taaaacgaaa ggcccagctt tccgactgag 5520
cctttcggtt tatttgatgc ctggcagttc cttactctcg cgtaacgct agcatggatg 5580
ttttcccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtctta agctcgggcc ccaaataatg 5640
attttatttt gactgatagt gacctgttcg ttgcaacaaa ttgatgagca atgctttttt 5700
ataatgcaa ctttgtacaa aaaagcaggc tccgcggccg cactaggttt aaactctaga 5760
agctagg 5767

```

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7327

<400> 58

ES 2 623 454 T3

cgggtcacctc	gagtatcaaa	atctattttag	aaatacacaa	tattttgttg	caggcttgct	60
ggagaatcga	tctgctatca	taaaaattac	aaaaaaattt	tatttgcctc	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	cagcccaa	ggcagttgaa	atactcaa	acgccccat	gcaggagcgg	420
atcattcatt	gtttgtttgg	ttgcctttgc	caacatggga	gtccaagggt	ggcgcgccga	480
cccagctttc	ttgtacaaag	ttggcattat	aagaaagcat	tgcttatcaa	tttgttgcaa	540
cgaacaggtc	actatcagtc	aaaataaaat	cattattttgc	catccagctg	atatccccta	600
tagtgagtcg	tattacatgg	tcataagctgt	ttcctggcag	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	gcgttgccaa	tgatgttaca	gatgagatgg	tcagactaaa	960
ctggctgacg	gaatttatgc	ctcttccgac	catcaagcat	tttatccgta	ctcctgatga	1020
tgcatggtta	ctcaccactg	cgatccccgg	aaaaacagca	ttccagggtat	tagaagaata	1080
tcctgattca	ggtgaaaata	ttgttgatgc	gctggcagtg	ttcctgcgcc	ggttgcatte	1140
gattcctggt	tgtaattgtc	cttttaacag	cgatcgcgta	tttcgtctcg	ctcaggcgca	1200
atcacgaatg	aataacgggt	tggttgatgc	gagtgatattt	gatgacgagc	gtaatggctg	1260
gcctgttgaa	caagtctgga	aagaaatgca	taaacttttg	ccattctcac	cggattcagt	1320
cgtcactcat	ggtgatattt	cacttgataa	ccttattttt	gacgagggga	aattaatagg	1380
ttgtattgat	gttgagcag	tcggaatcgc	agaccgatac	caggatcttg	ccatcctatg	1440
gaactgcctc	ggtgagtttt	ctccttcatt	acagaaacgg	ctttttcaaa	aatatgggtat	1500
tgataatcct	gatatgaata	aattgcagtt	tcatttgatg	ctcgatgagt	ttttctaata	1560
agaattggtt	aattggttgt	aacactggca	gagcattacg	ctgacttgac	gggacggcgc	1620
aagctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttacgcgtcg	ttccactgag	cgtcagaccc	1680
cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	1740

ES 2 623 454 T3

gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac	1800
tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt	1860
gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct	1920
gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga	1980
ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac	2040
acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg	2100
agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa ggcgacaggg tatccggtaa gcggcagggg	2160
cggaaacagga gagcgacga gggagcttcc aggggggaaac gcctgggtatc tttatagtcc	2220
tgctgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggcg	2280
gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc	2340
ttttgctcac atgttctttc ctgctttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc	2400
ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gagcgagcg agtcagtga	2460
cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt 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 gatttgctct actcaggaga	2760
gcgttcaccg acaacaaca gataaaacga aaggcccagt cttccgactg agcctttcgt	2820
tttatttgat gcctggcagt tccctactct cgcgtaaacg ctagcatgga tgttttccca	2880
gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtct taagctcggg ccccaaataa tgattttatt	2940
ttgactgata gtgacctggt cgttgcaaca aattgatgag caatgctttt ttataatgcc	3000
aactttgtac aaaaaagcag gctccgcggc cgcactaggt ttaaaactcta gaagctagga	3060
attcgcggcc gctttcctgc atgacatcgt cctgcagagc caagcgcagt cttaattaaa	3120
ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccggtgg ttttttacct	3180
ctatttaaag gggttttcca cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt	3240
taattttctc taatcttttg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat	3300
ttattatttg ttaaaccattt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta	3360
atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taatttttagc gttggtagaa	3420
agcataatga tttattctta ttcttcttca tataaatgtt taatatacaa tataaacaaa	3480
ttctttacct taagaaggat ttcccathtt atattttaaa aatataattta tcaaataattt	3540
ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat	3600
aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgga cacaactagc catttttttc	3660
tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa	3720
caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccat	3780

ES 2 623 454 T3

gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcga gacacatctt ctaaagtaat 3840
tttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tactttctaaa 3900
aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagttaaattt tggtaattt 3960
gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattgttt tatagatagt ttaaagtaaa 4020
tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg 4080
gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttaccttt tcttggtatg taagtccgta 4140
actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtcct ttggttcatt catggatcct 4200
gcgcaagaaa aagacaaaga acaagaaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca 4260
cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgctccatg tatgtctaaa 4320
tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca 4380
cacacaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct 4440
cttccgccac ctcaatttct tcaattcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc 4500
atgccccaat ctccatgcat gttccaacca ccttctctct tatataatac ctataaatac 4560
ctctaataac actcacttct ttcattcatc atccatccag agtactacta ctctactact 4620
ataatacccc aacccaactc atattcaata ctactctagg taccctgcag ggatccaaca 4680
atgtctgctc caaccgctga catcagggtt agggctccag aggctaagaa ggttcacatc 4740
gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc 4800
ctcatcatgc gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc 4860
aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaat caccgctgga 4920
taccacaggc tttgggctca ctgctcatal tctgtactc ttccacttag gatctggctt 4980
gctgctgttg gaggaggagc tgttgaggga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 5040
gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctgttaggaa gggacttctc 5100
tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac 5160
atctctgac tcaacgagga ccagttgtt gtttggaac acaggaacta cctcaagggt 5220
gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttggaat gggagattgg 5280
cttgaggat tctgttacgc tggaaatcctt aggatcttct tcttcaaca agctaccttc 5340
tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttgga gatcaaccat tcgatgatag gaactctcct 5400
agggatcacg tgatcacgc tctgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 5460
gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg 5520
tctatctggg cttggaagca acttggaattg gcttacgac tcaagaagtt cagggttaac 5580
gagatcgaga aggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact 5640
cttgattggg gaaccccact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag 5700
caagctaaga acggaagggt acttggtgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac 5760
ttcatcaagg atcaccagg aggaagggt atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct 5820
accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacy cagctcaca ccttcttagc 5880
accatgaggg tgggagtgt caggggagga tgcgaggtt agatctggaa gagggctcag 5940
aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag 6000
caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttgagt agttagctta 6060
atcacctagg tcaccagtat gaactaaaat gcatgtaggt gtaagagct 6109

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

5 <220>
<223> Plásmido pDAB7329

<400> 59

```

cggtcacctc gagtatcaaa atctatttag aaatacacia tattttgttg caggcttgct      60
ggagaatcga tctgctatca taaaaattac aaaaaaattt tatttgcctc aattatttta    120
ggattggtat taaggacgct taaattattt gtcgggtcac tacgcatcat tgtgattgag      180
aagatcagcg atacgaaata ttcgtagtac 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 gtccaagggtt ggcgcgccga    480
cccagctttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat tgcttatcaa tttgttgcaa     540
cgaacagggtc 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 gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa     960
ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga    1020
tgcatgggta ctccactg cgatccccgg aaaaacagca ttccagggtat tagaagaata    1080
tcctgattca ggtgaaaata ttgttgatgc gctggcagtg ttctgcgcc ggttgcatte    1140
gattcctgtt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctcaggcgca    1200
atcacgaatg aataacggtt tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg    1260
gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt    1320
cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa ccttattttt gacgagggga aattaatagg    1380
10 ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccatcctatg    1440

```

ES 2 623 454 T3

gaactgcctc ggtgagtttt ctccttcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatatggtat	1500
tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaate	1560
agaattgggtt aattgggttg aacactggca gagcattacg ctgacttgac gggacggcgc	1620
aagctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttacgcgtcg ttccactgag cgtcagaccc	1680
cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt	1740
gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac	1800
tccttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt	1860
gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 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 aaggggagaaa ggccggacagg tatccggtaa gcggcagggg	2160
cggaaacagga gagcgacga gggagcttcc aggggggaaac gcctggtatc tttatagtcc	2220
tgctgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggcg	2280
gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc	2340
ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc	2400
ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gagcgagcg agtcagttag	2460
cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca	2520
ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagttagc gcaacgcaat	2580
taatacgcgt accgctagcc aggaagagtt tgtagaaacg caaaaaggcc atccgtcagg	2640
atggccttct gcttagtttg atgcctggca gtttatggcg ggcgtcctgc ccgccaccct	2700
ccgggcccgtt gttcacaac gttcaaatcc gctcccggcg gatttgcctt actcaggaga	2760
gcgttcaccg acaaaacaac gataaaacga aaggcccagt cttccgactg agcctttcgt	2820
tttatttgat gcctggcagt tccctactct cgcgtaaacg ctagcatgga tgttttccca	2880
gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtct taagctcggg ccccaaataa tgattttatt	2940
ttgactgata gtgacctgtt cgttgcaaca aattgatgag caatgctttt ttataatgcc	3000
aactttgtac aaaaaagcag gctccgcggc cgcactaggt ttaaactcta gaagctagga	3060
attcgcggcc gctttcctgc atgacatcgt cctgcagagc caagcgcagc cttaattaaa	3120
ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccggtgg ttttttacct	3180
ctatttaaag gggttttcca cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt	3240
taattttcta taatcttttg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat	3300
ttattatttg ttaaactttt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta	3360
atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taatttttagc gttggtagaa	3420
agcataatga tttattctta ttcttcttca tataaatgtt taatatacaa tataaacaaa	3480

ES 2 623 454 T3

ttctttacct taagaaggat ttcccatTTT atatttttaa aatatattta tcaaataTTT	3540
ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat	3600
aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgga cacaactagc catttttttc	3660
tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaa	3720
caatgatttg tgggtatttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt	3780
gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcga gacacatctt ctaaagtaat	3840
tttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa	3900
aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtTTaat tgttgaattt	3960
gtgactattg atttattatt ctactatgtt taaattgttt tatagatagt ttaaagtaaa	4020
tataagtaat gtagtagagt gtagagtggt taccctaaac cataaactat aagatttatg	4080
gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttaccttt tcttggtatg taagtccgta	4140
actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtctt ttggttcatg catggatctt	4200
gcgcaagaaa aagacaaaga acaagaaaaa 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 tcaattcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc	4500
atgcccaaat ctccatgcat gttccaacca ccttctctct tatataatac ctataaatac	4560
ctctaataac actcacttct ttcatcatcc atccatccag agtactacta ctctactact	4620
ataatacccc aacccaactc atattcaata ctactctagg taccctgcag ggatccaaca	4680
atggccagca gttcttcaag tgtgccagaa cttgccgcag ctttccctga tgggacaacg	4740
gacttcaaac ccatgaggaa caccaaaggc tatgatgtct ccaaacctca catctctgaa	4800
acaccgatga ctttgaagaa ctggcacaaa catgtgaact ggctcaacac cacattcatt	4860
ctctttgttc cactggcttg gttgatctca acctattggg ttctcttca atggaaaact	4920
gcagtgtggg cagttgtgta ctacttcaac actggacttg ggatcactgc tggctaccat	4980
agattgtggg cacattcctc ttacaaggcc agcttgctc tcaaaatcta ccttgccgca	5040
gttggtgctg gagccgttga aggttccata agatggtgga gcaacggaca cagagcacat	5100
cacagataca cagacacaga gaaagatcct tactcagtga ggaagggatt gctctacagc	5160
cacatgggtt ggatgctctt gaagcagaat ccaaagaagc aagggaggac ggacattact	5220
gatctgaatg aggaccagt tgtggtcttg caacatagga actttctcaa gtgtgtgatc	5280
ttcatggctt tggcttttcc cacccttggt gctggcctgg gatggggaga ctactgggga	5340
ggtttcatct atggagggat cttgagagtg ttctttgttc agcaagccac cttctgtgtc	5400
aactcacttg cacattggct tggatgatca ccgtttgatg acagaaactc tccacgtgac	5460
catgtcataa ctgctcttgt cacgctgggt gaaggctatc acaactttca ccatgagttt	5520

ES 2 623 454 T3

ccgtcagact atagaaatgc gattgagtgg tatcagtatg accccacgaa gtggagcatt 5580
 tggatttggg agcaacttgg acttgctcac aatctcaagc agttcagaca gaatgagata 5640
 gagaagggaa gggttcaaca gttgcagaag aaactggatc agaagagagc gaaacttgat 5700
 tggggaatac cgttgaaca actccctgtt gtgtcttggg atgactttgt tgaacagtca 5760
 aagaatggca aggcattgat tgctgttgct ggtgtcattc acgatgttgg tgacttcac 5820
 aaggatcatc ctggtggacg tgctctcatc aactctgcga ttggcaaaga tgccacagcg 5880
 atcttcaatg gaggtgtcta caatcattca aatgccgcac acaaccttct ctccaccatg 5940
 aggggttggg tctccgtgg aggggtgcgaa gtggagatat ggaaacgtgc tcaaagttag 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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7319

<400> 60

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

ES 2 623 454 T3

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	acttttaggac	agagccacaa	acaccacaag	agtggattga	tgatctagag	1380
aggttgcaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgaggttg	agggtgttgt	ggctggtatt	1440
gcttacgctg	ggccctggaa	ggctaggaac	gcttacgatt	ggacagttga	gagtactggt	1500
tacgtgtcac	ataggcatca	aaggttgggc	ctaggatcta	cattgtacac	acatttgctt	1560
aagtctatgg	aggcgcaagg	ttttaagtct	gtggttgctg	ttataggcct	tccaaacgat	1620
ccatctgtta	ggttgcatga	ggctttggga	tacacagccc	gggttacatt	gcgcgcagct	1680
ggatacaagc	atggtggatg	gcatgatgtt	ggtttttggc	aaagggtatt	tgagttgcca	1740
gctcctccaa	ggccagttag	gccagttacc	caaacttgag	tagttagctt	aatcacctag	1800
agctcgatcg	gcggcaatag	cttcttagcg	ccatcccggg	ttgatcctat	ctgtgttgaa	1860
atagttgcgg	tgggcaaggc	tctctttcag	aaagacaggc	ggccaaagga	acccaagggtg	1920
agggtgggcta	tggctctcag	ttccttggtg	aagcgcttgg	tctaagggtg	agaggtgtta	1980
gcgggatgaa	gcaaaagtgt	ccgattgtaa	caagatatgt	tgatcctacg	taaggatatt	2040
aaagtatgta	ttcatcacta	atataatcag	tgtattccaa	tatgtactac	gatttccaat	2100
gtctttattg	tcgccgtatg	taatcggcgt	cacaaaataa	tccccggtga	ctttctttta	2160
atccaggatg	aaataatatg	ttattataat	ttttgcgatt	tgggtccgtta	taggaattga	2220
agtgtgcttg	aggctcggtc	ccaccactcc	catttcataa	ttttacatgt	atttgaaaaa	2280
taaaaattta	tggtattcaa	tttaaacacg	tatacttgta	aagaatgata	tcttgaaaga	2340
aatatagttt	aaatatattt	tgataaaaata	acaagtcagg	tattatagtc	caagcaaaaa	2400
cataaattta	ttgatgcaag	tttaaattca	gaaatatttc	aataactgat	tatatcagct	2460
ggtacattgc	cgtagatgaa	agactgagtg	cgatattatg	gtgtaataca	taggaattcg	2520
tttaaacgat	ctgcgtctaa	tttcgggtcc	aacttgacac	ggaaagacgt	cgaccgcggt	2580
agctcttgcc	cagcagactg	ggcttccagt	cctttcgctc	gatcgggtcc	aatgttgctc	2640
tcagctgtga	accggaagcg	gacgaccaac	agtggaaagaa	ctgaaaggaa	cgagccgtct	2700
ataccttgat	gatcggcctc	tggtgaaggg	tatcatcgca	gccaagcaag	ctcatgaaag	2760
gctgatgggg	gaggtgtata	attatgaggc	ccacggcggg	cttattcttt	agggaggatc	2820
tatctcgttg	ctcaagtgca	tggcgcaaag	cagttattgg	agtgcggatt	ttcgttgcca	2880
tattattcgc	cacgagttag	cagacgaaga	gaccttcatg	aacgtggcca	aggccagagt	2940
taagcagatg	ttacgcccctg	ctgcaggcct	ttctattatc	caatagttgg	ttgatctttg	3000
gaaagagcct	cggctgaggc	ccatactgaa	agagatcgat	ggatatcgat	atgccatggt	3060
gtttgctagc	cagaaccaga	tcacatccga	tatgctattg	cagcttgacg	cagatatgga	3120

ES 2 623 454 T3

ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
 gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggctatc 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
 tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca 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 catttgagcg tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg 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 ttgcgagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtcg ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttgcgaggcg aggggcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttctcg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatatttg tttaaaagca ggtaaaaaga 4740
 caggtttagc gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca atgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccccaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat cccaggtt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgccgat ttgcgaggct ggccagctcc acgtcgcggg ccgaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccc cgggtgtctg 5160

ES 2 623 454 T3

cacacggcgtt cgacggcggtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgctg gaaagggctg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aacctgctt cggggtcatt atagcgattt ttccggtata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
 cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgctg aggctggccg gctaccgccg 5520
 gcgtaacaga tgaggggaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaccagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcat caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tggcgggcct gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cacggcgcg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca 5880
 tgatggcggt 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
 ggggtcaaactc aggaataaagg gcacattgcc ccggcggtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgctg gccccgcgaa 6300
 accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
 ctcgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggctcag cgaggccaag 6540
 caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttgctt 6600
 gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
 ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg cgagccgac 6840
 accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgac gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgcgcggac ggcccgcg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtacccgc tcaagctgga aaccttccgc 7200

ES 2 623 454 T3

ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc	7260
tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggggtcaatga tgacctggtg	7320
cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgct	7380
ttactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc	7440
tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg	7500
tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc	7560
gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag cacgaggaga	7620
aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggc tgcgagatgc cgtggcattc ggcgcctaca	7680
tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc	7740
acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcgcg	7800
gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc	7860
caacgggaat ctggtgagtg cgcatttca tcctcggcgc acttaatat tcgctattct	7920
ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg acggtaggcg	7980
ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtagc ccgatacgat	8040
tgatggcggc cctgggggct atttgcgga ctgcggcggt ggcgctgttg gtgttgacac	8100
caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg gtttccatgg	8160
cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc acctttaccg	8220
cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt tttgatccgc	8280
caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag	8340
cgggtttaac ctacttctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt	8400
ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc	8460
gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggctt	8520
aattcaggag ttaaacatca tgagggaagc ggtgatcgc gaagtatcga ctcaactatc	8580
agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt	8700
gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	8760
ggcttccctt ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg	8880
caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgac gacattgatc tggctatctt	8940
gctgacaaaa gcaagagaac atagcggttc cttggtaggc ccagcggcgg aggaactctt	9000
tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
ctcgcgcccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
gcgcctgcg gccagtatc agcccgcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca	9240

ES 2 623 454 T3

agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttcact acgtgaaagg 9300
 cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
 cgcggcgcgg cttaaactca gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggatatatat 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
 ttttcgaat 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
 atatatattac 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 aaattttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca atgacttgga acaaaagaaa 10800
 gtgatataatt ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagc tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttta actctagaag ctaggaattc 11040
 aaacaaagaa gcgatcgcgc ggccgccatt gtactcccag tatcattata gtgaaagttt 11100
 tggctctctc gccggtggtt ttttacctct atttaaaggg gttttccacc taaaaattct 11160
 ggtatcattc tcactttact tgttacttta atttctcata atctttggtt gaaattatca 11220
 cgcttccgca cacgatatcc ctacaaattt attatttggt aaacattttc aaaccgcata 11280

aaattttatg aagtcctcgc 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 atgatttgtg gtatttctga agcaagtcac 11700
 gttatgcaaa attctataat tcccatttga cactacggaa gtaactgaag atctgctttt 11760
 acatgcgaga cacatcttct aaagtaattt taataatagt tactatatct aagatttcac 11820
 atatcaaata ctcaatatta cttctaaaaa attaattaga tataattaaa atattacttt 11880
 ttttaatttta agtttaattg ttgaatttgt gactattgat ttattattct actatgttta 11940
 aattgtttta tagatagttt aaagtaaata taagtaatgt agtagagtgt tagagtgtta 12000
 ccctaaacca taaactataa gatttatggg ggactaattt tcatatattt cttattgctt 12060
 ttaccttttc ttggtatgta agtccgtaac tggaattact gtgggttgcc atgacactct 12120
 gtggtctttt ggttcacgca tggatgcttg cgcaagaaaa agacaaagaa caaagaaaaa 12180
 agacaaaaca gagagacaaa acgcaatcac acaaccaact caaattagtc actggctgat 12240
 caagatcgcc gcgtccatgt atgtctaaat gccatgcaaa gcaacacgtg cttaacatgc 12300
 actttaaatg gctcaccat ctcaaccac acacaaacac attgcctttt tcttcacat 12360
 caccacaacc acctgtatat attcattctc ttccgccacc tcaatttctt cacttcaaca 12420
 cagtcacac tgcatacgct tgcacacca tgcacaaatc tccatgcacg ttccaaccac 12480
 cttctctctt atataatacc tataaatacc tctaataatca ctacttctt 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 tccactcta cggatgcac caagctttct 12780
 gggttccact tcaactcaag accgctatct gggctgtgat ctactactt ttcaccggac 12840
 ttggaatcac cgctggatac cacaggcttt gggctcactg ctactactct gctactcttc 12900
 cacttaggat ctggcttgct gctgttgag gaggagctgt tgagggatct atcagatggg 12960
 gggctagggg tcacagggct catcataggt acaccgatac cgacaaggac ccatactctg 13020
 ttaggaaggg acttctctac tctcaccttg gatggatggg gatgaagcag aacccaaaga 13080
 ggatcggaag gaccgacatc tctgatctca acgaggaccc agttgttggt tggcaacaca 13140
 ggaactacct caagggttggt ttaccatgg gacttgctgt tccaatgctt gttgctggac 13200
 ttggatgggg agattggctt ggaggattcg tgtacgctgg aatccttagg atcttcttcg 13260
 ttcaacaagc taccttctgc gtgaactctc ttgctcactg gcttgagat caaccattcg 13320

ES 2 623 454 T3

atgataggaa ctctcctagg gatcacgtga tcaccgctct tgttaccctt ggagagggat 13380
 accacaactt ccaccacgag ttcccatctg actacaggaa cgctatcgag tggcaccagt 13440
 acgatcctac caagtgggtct atctgggctt ggaagcaact tggattggct tacgatctca 13500
 agaagttcag ggctaacgag atcgagaagg gaaggggtca acaacttcag aagaagcttg 13560
 ataggaagag ggctactctt gattggggaa cccacttgga tcaacttcca gtgatggaat 13620
 gggatgacta cggtgagcaa gctaagaacg gaaggggact tgttgctatc gctggagtgt 13680
 ttcacgatgt taccgacttc atcaaggatc acccaggagg aaaggctatg atctcttctg 13740
 gaatcgaaaa 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 ccgaccatgt aacagtataa taactgagct 14100
 ccatctcact tcttctatga ataaacaaag gatgttatga tatattaaca ctctatctat 14160
 gcaccttatt gttctatgat aaatttcctc ttattattat aaatcatctg aatcgtgacg 14220
 gcttatggaa tgcttcaaat agtacaaaaa caaatgtgta ctataagact ttctaacaa 14280
 ttctaacttt agcattgtga acgagacata agtggttaaga agacataaca attataatgg 14340
 aagaagtttg 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 ctactctgt 14580
 ataaagggtg gatcatcctt aaagtgggtc tatttaattt tattgcttct tacagataaa 14640
 aaaaaatta tgagttgggt tgataaaata ttgaaggatt taaaataata ataaataata 14700
 aataacatat aatatatgta tataaattta ttataatata acatttatct ataaaaaagt 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
 ttttttatc agcaaagaat aaataaaata aaatgagaca cttcagggat gtttcaaccc 15180
 ttatacaaaa ccccaaaaac agtttccta gcaccctacc aacgaattcg cggccgcttt 15240
 cctgcatgac atcgtcctgc agagccaagc gcatgcttaa ttaaactagt ctcccagtat 15300
 cattatagtg aaagtttttg ctctctcgcc ggtggttttt tacctctatt taaaggggtt 15360

ES 2 623 454 T3

ttccacctaa aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt tctcataatc 15420
 tttggttgaa attatcacgc ttccgcacac gatatcccta caaatttatt atttgttaaa 15480
 ctttttcaaa ccgcataaaa ttttatgaag tcccgtctat ctttaatgta gtctaacatt 15540
 ttcataattga aatatataat ttacttaatt ttagcggttg tagaaagcat aatgatttat 15600
 tcttattctt cttcatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt taccttaaga 15660
 aggatttccc attttatatt ttaaaaatat atttatcaaa tttttttcaa ccacgtaaat 15720
 ctcataataa taagttgttt caaaagtaat aaaatttaac tccataatth ttttattcga 15780
 ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccatth ttttctttga ataaaaaat 15840
 ccaattatca ttgtattttt ttatataaat gaaaatttca ccaaacaatg atttgtggta 15900
 tttctgaagc aagtcattgt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta 15960
 actgaagatc tgctttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttta taatagttac 16020
 tatattcaag atttcatata tcaataactc aatattactt ctaaaaaat aattagatat 16080
 aattaaaata ttactttttt aattttaagt ttaattgttg aatttgtgac tattgattta 16140
 ttattctact atgttttaaa tgttttatag atagtthaaa gtaaatataa gtaatgtagt 16200
 agagtgttag agtggttacc taaaccataa actataagat ttatggtgga ctaattttca 16260
 tatatttctt attgctttta ctttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg 16320
 ggttgccatg acactctgtg gtcttttggt tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac 16380
 aaagaacaaa gaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaaa 16440
 ttagtcaactg gctgatcaag atcgccgct ccatgtatgt ctaaattgcca tgcaaagcaa 16500
 cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac aaacacattg 16560
 ctttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc gccacctcaa 16620
 tttcttcaact tcaacacacg tcaacctgca tatgctgtc atcccatgcc caaatctcca 16680
 tgcattgttc aaccacctt tctcttatat aataacctata aataacctta atactactca 16740
 cttctttcat catccatcca tccagagtac tactactcta ctactataat accccaaccc 16800
 aactcatatt caatactact ctaggtagcc tgcaggatc caacaatggc tgcattgat 16860
 agcatccctg aggacaaagc aactagctcc aagtcaaccc acatacagta ccaagaggtc 16920
 acgttttaga actggtacaa gaaaatcaac tggctcaaca cgacccttgt tgcctcatt 16980
 cctgctcttg ggttgactt gacgagaacc acacctctca ccagacctac cctcatttgg 17040
 tctgttctct actatttctg tacagcgtht ggcatcactg gtggctacca cagacttthg 17100
 tcccataggt cttacagtgc gaggttgcca ttgagactct tcttggctth cactggagct 17160
 ggtgcatcc aaggttctgc aagatggthg tcagccaatc atagggcaca tcaccgtthg 17220
 acggacacca tgaaggaccc ctactctgtg atgagaggac tgctgttctc ccacataggt 17280
 tggatggthc tcaactctga tccaaaggth aaaggcagaa cagatgtthc tgatcttgac 17340
 tctgatcccg tcgttgthg gcaacacaaa cactatggca agtgtthgct ctttgcgct 17400

ES 2 623 454 T3

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

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

<220>
<223> Plásmido pDAB7321

<400> 61

ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaaa atattaactg tcgcatttta 180
ttgaaatggc actgttattt caaccatatt tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
aagtaaataa tagacgccgt tgtaaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagaggga 300
tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatgggtg 360
taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccagat ggcatgatag 420

ES 2 623 454 T3

ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aaggggtgcc tcgttagtga	480
caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaacaa 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 ggcaagaaa	900
agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga	960
ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	1020
tatcacaaag gaatcttata cccactact tatcctttta ttttttccg tgatctttt	1080
gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gtctggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	1140
tggtgtaagc tttttcttt 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
agggtgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgtgt ggctggtatt	1440
gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactgtt	1500
tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt	1560
aagtcctatg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat	1620
ccatctgtta ggttgcata ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct	1680
ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca	1740
gctctccaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag	1800
agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggt ttgatcctat ctgtgttgaa	1860
atagttgcgg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg	1920
aggtgggcta tggctctcag ttccttggtg aagcgcttg tctaagggtg agaggtgtta	1980
gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
aaagtatgta ttcatacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100
gtctttattg tcgccgtatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga ctttctttta	2160
atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tggctccgta taggaattga	2220
agtgtgcttg aggtcggtcg ccaccactcc catttcataa tttacatgt atttgaaaa	2280
taaaaattta tgggtattcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga	2340
aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa	2400
cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct	2460

ES 2 623 454 T3

ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
 tttaaacgat ctgcgctctaa ttttcggtcc aacttgcaca ggaaagacgt cgaccgcggt 2580
 agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgctc gatcgggtcc aatgttggtcc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtgaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tggatgaagg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
 gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctcgttg ctcaagtgc tggcgcaaag cagttattgg agtgcggatt ttcgttgga 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 attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
 gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggtcatc cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat 3300
 tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggc 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
 tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta 3840
 ttaagttgtc taagcgtaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtcgc aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaac taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttggtt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccgga atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggg gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgcgagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500

ES 2 623 454 T3

aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtg ccatTTTTtg 4560
 ggtgaggccg ttgcgggccg aggggcgcag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggTTta taaatatTgG tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggTtagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgccctcaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat cccaggtt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttgccgat ttgcgaggct ggccagctcc acgtcgcgg ccgaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgcg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagttag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctcg 5160
 cacacggctt cgacggcggt tctggcgctg ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggc aaccagcccgt gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggTata 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 gccaaaccag aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcat caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tgggcggcct gctgaaatc tggctcaccg acgaccccg caggcgcggt ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggTca 5880
 tgatgggctg ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgcgcg tgattgccaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggTcaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagg 6180
 gggTgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcggg 6240
 tttccgcgg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc gcccgcgaa 6300
 acctccagt ccgtcggctc gatggTccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
 ctcgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggTcag cgaggccaag 6540

ES 2 623 454 T3

caggccgcgt	tgtgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aaatgcagct	ttccttgttc	6600
gatattgcgc	cgtggccgga	cacgatgcga	gcgatgccaa	acgacacggc	ccgctctgcc	6660
ctgttcacca	cgcgcaaca	gaaaatccc	cgcgaggcgc	tgcaaaaca	ggtcattttc	6720
cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgctc	agctgcgggc	cgacgatgac	6780
gaactggtgt	ggcagcaggt	gttgaggtac	gcgaagcgca	cccctatcgg	cgagccgatc	6840
accttcacgt	tctacgagct	ttgccaggac	ctgggctggt	cgatcaatgg	ccggtattac	6900
acgaaggccg	aggaatgcct	gtcgcgccta	caggcgacgg	cgatgggctt	cacgtccgac	6960
cgcgttgggc	acctggaatc	gggtgcgtg	ctgcaccgct	tccgcgtcct	ggaccgtggc	7020
aagaaaacgt	cccgttgcca	ggcctgatc	gacgaggaaa	tcgtcgtgct	gtttgctggc	7080
gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tgctgccgac	ggcccgcg	7140
atgttcgact	atttcagctc	gcaccgggag	ccgtaccgcg	tcaagctgga	aaccttccgc	7200
ctcatgtgcg	gatcggattc	caccgcgtg	aagaagtggc	gcgagcaggt	cggcgaagcc	7260
tgcgaagagt	tgcgaggcag	cgccctggtg	gaacacgcct	gggtcaatga	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	cggttggtg	cgcccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tgctcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
aaaagcccat	ggaggcgctc	gctgaacggc	tgcgagatgc	cgtggcattc	ggcgccctaca	7680
tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcggctc	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740
acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agcccgaaca	gcgaggccga	ggggtcgccg	7800
gtatgctgct	gcgggcgttg	ccggcggtt	tattgctcgt	gatgatcgct	cgacagattc	7860
caacgggaat	ctgggtggatg	cgcatcttca	tcctcggcgc	acttaatat	tcgctattct	7920
ggagcttggt	gtttatttcg	gtctaccgcc	tgccgggcgg	ggtcgggcg	acggtaggcg	7980
ctgtgcagcc	gctgatggtc	gtgttcattc	ctgccgctct	gctaggtagc	ccgatacgat	8040
tgatggcggc	cctgggggct	atttgcggaa	ctgcgggcgt	ggcgtgtgtg	gtgttgacac	8100
caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgctc	cagcgggcct	ggcgggggcg	gtttccatgg	8160
cgttcggaac	cgtgctgacc	cgcaagtggc	aacctcccgt	gcctctgctc	acctttaccg	8220
cctggcaact	ggcggccgga	ggacttctgc	tcgttccagt	agcttttagt	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	ttaaacatca	tgagggaagc	ggtgatcgcc	gaagtatcga	ctcaactatc	8580

ES 2 623 454 T3

agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt	8700
gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	8760
ggcttccctt ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
cgacatcatt ccgtggcggtt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg	8880
caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgacg gacattgacg tggctatctt	8940
gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt	9000
tgatccgggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
ctcgcgcgcc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
gcgcctgccg gcccgatc agcccgcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca	9240
agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg	9300
cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt	9360
cgcggcgcgg cttactcaa gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa	9420
ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttccattcc gcgctcaaga	9480
tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat	9540
gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct	9600
caaattacaa cggatatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga	9660
tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta	9720
caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt	9780
atatttggtc taatttagtt tggtagtgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaatata	9840
aatatatagt ttttatatat atgccttta 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 atcattattt	10140
aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat	10200
caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc	10260
tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac	10320
atatattttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataattttca tctaacaaaa	10380
aaaaaacccg aaaatgctga aaacccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg	10440
gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc atttgcaccc ctaatcataa	10500
tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttggtc aatctcctgg aaattttgca	10560
aatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa	10620

ES 2 623 454 T3

tatgtaattt	acttgattct	aaaaaatat	cccaagtatt	aataatttct	gctaggaaga	10680
aggtttagcta	cgatttacag	caaagccaga	atacaatgaa	ccataaagtg	attgaagctc	10740
gaaatatacg	aaggaacaaa	tattttttaa	aaaatacgca	atgacttgga	acaaaagaaa	10800
gtgatataatt	ttttgttctt	aaacaagcat	ccccctctaa	gaatggcagt	tttcctttgc	10860
atgtaactat	tatgctccct	tcgttacaaa	aattttggac	tactattggg	aacttcttct	10920
gaaaaatagtg	gccaccgctt	aattaaggcg	cgccatgccc	gggcaagcgg	ccgcacaagt	10980
ttgtacaaaa	aagcaggctc	cgcgcccgca	ctagggttaa	actctagaag	ctaggaattc	11040
gcgggccgctt	tcctgcatga	catcgtcctg	cagagccaag	cgcatgctta	attaaactag	11100
tctcccagta	tcattatagt	gaaagttttg	gctctctcgc	cggtgggttt	ttacctctat	11160
ttaaaggggt	tttccaccta	aaaattcttg	tatcattctc	actttacttg	ttactttaat	11220
ttctcataat	ctttggttga	aattatcacg	cttccgcaca	cgatatccct	acaaatttat	11280
tatttgtaa	acattttcaa	accgcataaa	attttatgaa	gtcccgtcta	tcittaatgt	11340
agtctaacat	tttcatattg	aaatatataa	tttacttaat	tttagcgttg	gtagaaagca	11400
taatgattta	ttcttattct	tcctcatata	aatgtttaat	atacaatata	aacaaattct	11460
ttaccttaag	aaggatttcc	cattttatat	tttaaaaata	tatttatcaa	atatttttca	11520
accacgtaaa	tctcataata	ataagttggt	tcaaaagtaa	taaaatttaa	ctccataatt	11580
tttttattcg	actgatctta	aagcaacacc	cagtgcacac	actagccatt	tttttctttg	11640
aataaaaaaa	tccaattatc	attgtatttt	ttttatacaa	tgaaaatttc	accaaacaat	11700
gatttggtgt	atttctgaag	caagtcatgt	tatgcaaaat	tctataattc	ccatttgaca	11760
ctacggaagt	aactgaagat	ctgcttttac	atgcgagaca	catcttctaa	agtaatttta	11820
ataatagtta	ctatatccaa	gatttcatat	atcaaatact	caatattact	tctaaaaaat	11880
taattagata	taattaaaaat	attacttttt	taattttaag	tttaattggt	gaatttggtga	11940
ctattgattt	attattctac	tatgttttaa	ttgttttata	gatagtttaa	agtaaataata	12000
agtaatgtag	tagagtgtta	gagtgttacc	ctaaaccata	aactataaga	tttatgggtg	12060
actaattttc	atatatttct	tattgctttt	accttttctt	ggtatgtaag	tccgtaactg	12120
gaattactgt	gggttgccat	gacactctgt	ggtcttttgg	ttcatgcatg	gatcttgctc	12180
aagaaaaaga	caaagaacaa	agaaaaaaga	caaaacagag	agacaaaacg	caatcacaca	12240
accaactcaa	attagtcact	ggctgatcaa	gatcgccgcg	tccatgtatg	tctaaatgcc	12300
atgcaaagca	acacgtgctt	aacatgcact	ttaaatggct	cacccatctc	aaccacacac	12360
caaacacatt	gcctttttct	tcacatcac	cacaaccacc	tgtatatatt	cattctcttc	12420
cgccacctca	atttcttcac	ttcaacacac	gtcaacctgc	atatgcgtgt	catcccatgc	12480
ccaaatctcc	atgcatgttc	caaccacctt	ctctcttata	taataacctat	aaataacctct	12540
aatatcactc	acttctttca	tcacccatcc	atccagagta	ctactactct	actactataa	12600
tacccaacc	caactcatat	tcaatactac	tctaggtacc	ctgcagggat	ccaacaatgg	12660

ES 2 623 454 T3

```

ctgcacttga tagcatccct gaggacaaag caactagctc caagtcaacc cacatacagt 12720
accaagaggt cacgtttagg aactggtaca agaaaatcaa ctggctcaac acgacccttg 12780
ttgtcctcat tcctgctctt gggttgtact tgacgagaac cacacctctc accagacctt 12840
ccctcatttg gtctgttctc tactatttct gtacagcggt tggcatcact ggtggctacc 12900
acagactttg gtcccatagg tcttacagtg cgaggttgcc attgagactc ttcctggctt 12960
tacttgagc tggcgatc caaggttctg caagatggtg gtcagccaat catagggcac 13020
atcaccgttg 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 gattgggtgg 13260
gtggacttgt ctatgctggc atcatacgtg cctgctttgt tcagcaagcc actttctgtg 13320
tcaactcatt ggcacattgg ataggtgaac aaccgtttga tgacagacgt actccaaggg 13380
atcatgttct gactgcgttg gtcacaatgg gagaaggata ccacaacttc caccatgagt 13440
ttccgagtga ctacagaaat gccatcattt ggatcagta tgaccctaca aagtggctca 13500
tctatctctt cagcttgggt ccttcccat tggcctactc tctcaagacc ttccgttcca 13560
atgagattga gaaaggaagg cttcagcaac agcaaaaggc tcttgacaag aaaagaagtg 13620
gtcttgattg gggacttctt ctcttccagc ttccagtgat ctcatgggat gactttcaag 13680
ctcgttgcaa agaaagtgga gagatgcttg ttgctgttgc tggagtgatc catgatgtct 13740
cccagttcat tgaagatcat cctggtggga ggagcctcat tagaagtgct gttgggaaag 13800
atgggactgg catgttcaat ggtggagtgt atgaacattc aaacgccgca cacaacttgc 13860
tgagcacaat gagagtggga gtcttgagag gtggacaaga agtgagggtt tggaagaaac 13920
agagggtgga tgttcttggg aagtcagaca ttcttcgtca agtgacaagg gtggagcgtc 13980
tgggtggaagg agctgttgca gcgtgatgag tagttagctt aatcacctag agctcgggtca 14040
cctcgagtat caaaatctat ttagaaatac acaatatttt gttgcaggct tgctggagaa 14100
tcgatctgct atcataaaaa ttacaaaaaa attttatttg cctcaattat tttaggattg 14160
gtattaagga cgcttaaaatt 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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7324
 <400> 62

ES 2 623 454 T3

ttgtacaaag	tggttgccgc	cgcttaatta	aatttaaatt	caattaatgc	aatcttgatt	60
ttcaacaacg	aaggtaatgg	cgtaaaagaa	aaaatgtatg	ttattgtatt	gatctttcat	120
gatgttgaag	cgtgccataa	tatgatgatg	tataattaaa	atattaactg	tcgcatttta	180
ttgaaatggc	actgttattt	caaccatata	tttgattctg	ttacatgaca	cgactgcaag	240
aagtaaataa	tagacgccgt	tgtaaagaa	ttgctatcat	atgtgcctaa	ctagaggga	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	tgaaaaacaa	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	ggcgaagaaa	900
agaatcttga	agacgtaagc	actgacgaca	acaatgaaaa	gaagaagata	aggtcggtga	960
ttgtgaaaga	gacatagagg	acacatgtaa	ggtggaaaaat	gtaagggcgg	aaagtaacct	1020
tatcacaag	gaatcttatc	ccccactact	tatcctttta	tatttttccg	tgtcattttt	1080
gcccttgagt	tttcttatat	aaggaaccaa	gttcggcatt	tgtgaaaaca	agaaaaaatt	1140
tggtgtaagc	tattttcttt	gaagtactga	ggatacaact	tcagagaaat	ttgtaagttt	1200
gtaggtacca	gatctggatc	caaaccatg	tctccggaga	ggagaccagt	tgagattagg	1260
ccagctacag	cagctgatat	ggccgcggtt	tgtgatatcg	ttaaccatta	cattgagacg	1320
tctacagtga	actttaggac	agagccacaa	acaccacaag	agtggattga	tgatctagag	1380
agggttgaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgaggttg	aggggtgttg	ggctggtatt	1440
gcttacgctg	ggccctggaa	ggctaggaac	gcttacgatt	ggacagttga	gagtactggt	1500
tacgtgtcac	ataggcatca	aaggttgggc	ctaggatcta	cattgtacac	acatttgctt	1560
aagtctatgg	aggcgcaagg	ttttaagtct	gtggttgctg	ttataggcct	tccaaacgat	1620
ccatctgtta	ggttgcatga	ggctttggga	tacacagccc	gggttacatt	gcgcgcagct	1680
ggatacaagc	atggtggatg	gcatgatggt	ggtttttggc	aaagggattt	tgagttgcca	1740
gctcctccaa	ggccagttag	gccagttacc	caaatctgag	tagttagctt	aatcacctag	1800
agctcgatcg	gcggcaatag	cttcttagcg	ccatccccgg	ttgatcctat	ctgtgttgaa	1860

ES 2 623 454 T3

atagttgagg	tgggcaaggc	tctctttcag	aaagacaggc	ggccaaagga	acccaagggtg	1920
aggtgggcta	tggctctcag	ttccttggtg	aagcgcttgg	tctaagggtgc	agaggtgtta	1980
gcgggatgaa	gcaaaagtgt	ccgattgtaa	caagatatgt	tgatcctacg	taaggatatt	2040
aaagtatgta	ttcatcacta	atataatcag	tgtattccaa	tatgtactac	gatttccaat	2100
gtctttattg	tcgccgtatg	taatcggcgt	cacaaaataa	tccccggtga	ctttctttta	2160
atccaggatg	aaataatatg	ttattataat	ttttgcgatt	tggtccgtta	taggaattga	2220
agtgtgcttg	aggtcggctg	ccaccactcc	catttcataa	ttttacatgt	atttgaaaaa	2280
taaaaattta	tggatttcaa	tttaaacacg	tatacttgta	aagaatgata	tcttgaaaga	2340
aatatagttt	aaatatattat	tgataaaata	acaagtcagg	tattatagtc	caagcaaaaa	2400
cataaattta	ttgatgcaag	tttaaattca	gaaatatattc	aataactgat	tatatcagct	2460
ggtacattgc	cgtagatgaa	agactgagtg	cgatattatg	gtgtaataca	taggaattcg	2520
tttaaacgat	ctgcgtctaa	ttttcggctc	aacttgcaca	ggaaagacgt	cgaccgcggt	2580
agctcttgcc	cagcagactg	ggcttccagt	cctttcgctc	gatcgggtcc	aatgttgtcc	2640
tcagctgtga	accggaagcg	gacgaccaac	agtggaagaa	ctgaaaggaa	cgagccgtct	2700
ataccttgat	gatcggcctc	tggtgaaggg	tatcatcgca	gccaaagcaag	ctcatgaaag	2760
gctgatgggg	gaggtgtata	attatgaggc	ccacggcggg	cttattcttt	agggaggatc	2820
tatctcgttg	ctcaagtgca	tggcgcaaag	cagttatttg	agtgcggatt	ttcgttgcca	2880
tattattcgc	cacgagttag	cagacgaaga	gaccttcattg	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	gaaggctatc	cattcgggaat	3240
gtattagttt	gcaccagctc	cgcgtcacac	ctgtcttcat	ttgaataaga	tgttagcaat	3300
tgtttttagc	tttgtcttgt	tgtggcaggg	cggcaagtgc	ttcagacatc	attctgtttt	3360
caaattttat	gctggagaac	agcttcttaa	ttcctttgga	aataatagac	tgcgctctaa	3420
aattcagatg	tctggatata	gatatgattg	taaaataacc	tatttaagtg	tcatttagaa	3480
cataagtttt	atgaatgttc	ttccattttc	gtcatcgaac	gaataagagt	aaatacacct	3540
tttttaacat	tacaaataag	ttcttatacg	ttgtttatac	accgggaatc	atttccatta	3600
ttttcgcgca	aaagtcacgg	atattcgtga	aagcgacata	aactgcgaaa	tttgcgggga	3660
gtgtcttgag	tttgccctga	ggctagcgca	tgcacataga	cacacacatc	atctcattga	3720
tgcttggtga	taattgtcat	tagattgttt	ttatgcatag	atgcactcga	aatcagccaa	3780
ttttagacaa	gtatcaaacg	gatgtgactt	cagtacatta	aaaacgtccg	caatgtgtta	3840
ttaagttgtc	taagcgtcaa	tttgattttac	aattgaatat	atcctgcccc	agccagccaa	3900

ES 2 623 454 T3

cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtgc aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgagc tgaatgtaga cagctcgaaa 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 cggtaggca gataatttcc 4320
 attgagaact gagccatgtg caccctcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtg ccatTTTTTg 4560
 ggtgaggcgg ttcggggcgg aggggcgcag cccctggggg gatgggaggc ccgcttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcgg cgtgcgcggt cagcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccccaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat cccagggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgccgat ttgagaggct ggccagctcc acgtcgcgg ccgaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgcgg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggcgg cgggtgtctc 5160
 cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggg aaccagcccgt 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 tgagggaag cggtggctg atgaaaccaa gccaaccagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcat caatggcgac ctgggccgcc 5760
 tgggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cagggcgcgg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggtca 5880
 tgatgggcgt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggccgg 5940

ES 2 623 454 T3

ggggtgcgcg tgattgccaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 ggggtcaaatc aggaataagg gcacattgcc cggcggtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 ggggtgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgct gccccgcgaa 6300
 accttcacgt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg tccccctgc cctgcccgcg ccacgcggcg ccgtggagcg ttcgctcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag 6540
 caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttgctc 6600
 gatattgcgc cgtggccgga cagatgcga gcgatgccaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
 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 ggcccagcgg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttcgc 7200
 ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggggtcaatga 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
 gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
 aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggcgcctaca 7680
 tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
 acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcgccg 7800
 gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
 caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatat tcgctattct 7920
 ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg acggtaggcg 7980

ES 2 623 454 T3

ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc ccgatacgat	8040
tgatggcggg cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg gtgttgacac	8100
caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc 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 ggcgcggcct	8520
aattcaggag ttaaacaatca tgagggaagc ggtgatcgcc gaagtatcga ctcaactatc	8580
agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggg	8700
gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	8760
ggcttcccc tggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg	8880
caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgacg gacattgatc tggctatctt	8940
gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggc ccagcggcgg aggaactctt	9000
tgatccgggt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
ctcgccgccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
gcgcctgccc gccagtatc agcccgcat acttgaagct aggcaggcct atcttgga	9240
agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg	9300
cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt	9360
cgcggcgagg cttaaactca gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa	9420
ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca ttctgatcca ttccattcc 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 taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt	9780
atatttggtc taatttagtt tggatttgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata	9840
aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata	9900
tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat	9960
ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtg tactaaaatg	10020

cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattatctt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaatctt ttactaacac 10320
 atatattttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataattttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccgggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggtcc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaatacgca atgacttgga acaaaaagaa 10800
 gtgatataat ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgtctcct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 aaacaagaa gcgatcgcgc ggccgccatt gtactcccag tatcattata gtgaaagttt 11100
 tggctctctc gccggtggtt ttttacctct atttaaagg gttttccacc taaaaattct 11160
 ggtatcattc tcactttact tgttacttta atttctcata atctttggtt gaaattatca 11220
 cgcttccgca cagcatatcc ctacaaattt attatttgtt aaacattttc aaaccgcata 11280
 aaattttatg aagtcccgtc tatctttaat gtagtctaac attttcatat tgaaatatat 11340
 aattttacta 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
 cccagtgaac caactagcca tttttttctt tgaataaaaa aatccaatta tcattgtatt 11640
 ttttttatac aatgaaaatt tcaccaaaca atgatttgtg gtattttctga agcaagtcac 11700
 gttatgcaaa attctataat tcccatttga cactacggaa gtaactgaag atctgctttt 11760
 acatgcgaga cacatcttct aaagtaattt taataatagt tactatatctc aagatttcac 11820
 atatcaata ctcaatatta cttctaaaaa attaattaga tataattaaa atattacttt 11880
 ttttaattta agtttaattg ttgaatttgt gactattgat ttattattct actatgttta 11940
 aattgtttta tagatagttt aaagtaaata taagtaatgt agtagagtgt tagagtgtta 12000
 ccctaaacca taaactataa gatttatggt ggactaattt tcatatatctt cttattgctt 12060

ES 2 623 454 T3

ttaccttttc	ttggtatgta	agtccgtaac	tggaattact	gtgggttgcc	atgacactct	12120
gtggtctttt	ggttcatgca	tggtatgctt	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	tgtcatccca	tgcccaaata	tccatgcatg	ttccaaccac	12480
cttctctctt	atataatacc	tataataacc	tctaataatc	ctcacttctt	tcatcatcca	12540
tccatccaga	gtactactac	tctactacta	taatacccca	acccaactca	tattcaatac	12600
tactctagga	tccaacaatg	tctgctccaa	ccgctgacat	cagggctagg	gctccagagg	12660
ctaagaaggt	tcacatcgct	gataccgcta	tcaacaggca	caattggtac	aagcacgtga	12720
actggctcaa	cgtcttcttc	atcatcgga	tcccactcta	cggatgcata	caagctttct	12780
gggttccact	tcaactcaag	accgctatct	gggctgtgat	ctactacttc	ttcaccggac	12840
ttggaatcac	cgctggatac	cacaggcttt	gggctcactg	ctcatactct	gctactcttc	12900
cacttaggat	ctggcttgct	gctgttgagg	gaggagctgt	tgagggatct	atcagatggt	12960
gggctaggg	tcacagggct	catcataggt	acaccgatac	cgacaaggac	ccatactctg	13020
ttaggaaggg	acttctctac	tctcaccttg	gatggatggt	gatgaagcag	aacccaaga	13080
ggatcggaag	gaccgacatc	tctgatctca	acgaggaccc	agttgttgtt	tggcaacaca	13140
ggaactacct	caaggttgtg	ttcaccatgg	gacttgctgt	tccaatgctt	gttgctggac	13200
ttggatgggg	agattggctt	ggaggattcg	tgtacgctgg	aatccttagg	atcttcttcg	13260
ttcaacaagc	taccttctgc	gtgaactctc	ttgctcactg	gcttgagat	caaccattcg	13320
atgataggaa	ctctcctagg	gatcacgtga	tcaccgctct	tgttaccctt	ggagagggat	13380
accacaacct	ccaccagag	ttcccatctg	actacaggaa	cgctatcgag	tggcaccagt	13440
acgatcctac	caagtgtgct	atctgggctt	ggaagcaact	tggattggct	tacgatctca	13500
agaagttcag	ggctaacgag	atcgagaagg	gaagggttca	acaacttcag	aagaagcttg	13560
ataggaagag	ggctactctt	gattggggaa	ccccacttga	tcaacttcca	gtgatggaat	13620
gggatgacta	cgttgagcaa	gctaagaacg	gaaggggact	tgttgctatc	gctggagttg	13680
ttcacgatgt	taccgacttc	atcaaggatc	accaggagg	aaaggctatg	atctcttctg	13740
gaatcggaag	ggatgctacc	gctatgttca	acggaggagt	gtactaccac	tctaacgcag	13800
ctcacaacct	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

ES 2 623 454 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 agtggttaaga agacataaca attataatgg 14340
 aagaagtttg tctccattta tatattatat attaccact tatgtattat attaggatgt 14400
 taaggagaca taacaattat aaagagagaa gtttgtatcc atttatatat tatatactac 14460
 ccatttatat attatactta tccacttatt taatgtcttt ataaggtttg atccatgata 14520
 tttctaatat tttagttgat atgtatatga aaaggacta tttgaactct cttactctgt 14580
 ataaaggttg gatcatcctt aaagtgggtc tatttaattt tattgcttct tacagataaa 14640
 aaaaaatta tgagttgggt tgataaaata ttgaaggatt taaaataata ataaataata 14700
 aataacatat aatatatgta tataaattta ttataatata acatttatct ataaaaaagt 14760
 aaatattgtc ataaatctat acaatcggtt 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 ttgtgcata 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
 cattttcaaa ccgcataaaa ttttatgaag tcccgtctat ctttaatgta gtctaacatt 15540
 ttcattatga aatatataat ttacttaatt ttagcgttgg tagaaagcat aatgatttat 15600
 tcttattctt ctccatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt taccttaaga 15660
 aggatttccc attttatatt ttaaaaatat atttatcaaa tatttttcaa ccacgtaa 15720
 ctcataataa taagttgttt caaaagtaat aaaatttaac tccataattt ttttattcga 15780
 ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccattt ttttcttga ataaaaaat 15840
 ccaattatca ttgtattttt tttatacaat gaaaatttca ccaaacaatg atttggtgta 15900
 tttctgaagc aagtcatggt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta 15960
 actgaagatc tgcttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttta taatagttac 16020
 tatattcaag atttcatata tcaaatctc aatattactt ctaaaaaatt aattagatat 16080
 aattaaaata ttactttttt aattttaagt ttaattgttg aatttgtgac tattgattta 16140

ES 2 623 454 T3

```

ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagtttaaa gtaaatataa gtaatgtagt 16200
agagtgttag agtgttacct taaaccataa actataagat ttatggtgga ctaattttca 16260
tatattttctt attgctttta ctttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg 16320
ggttgccatg acactctgtg gtcttttggt tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac 16380
aaagaacaaa gaaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaaa 16440
ttagtcactg gctgatcaag atcgccgcgt ccatgtatgt ctaaatgccg tgcaaagcaa 16500
cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac aaacacattg 16560
cttttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc gccacctcaa 16620
tttcttctact tcaacacacg tcaacctgca tatgctgtgc atcccatgcc caaatctcca 16680
tgcagtgtcc aaccaccttc tctcttatat aatacctata aatacctcta atatcactca 16740
cttctttcat catccatcca tccagagtac tactactcta ctactataat accccaaccc 16800
aactcatatt caatactact ctaggtacct tgcagggatc caacaatggc tcccaacatt 16860
tctgaggatg tcaatggtgt tctttttgag tcagatgcgg caacccctga tttggctctt 16920
tccacaccac ctgtgcaaaa agctgacaac agacccaagc aacttggtgt gaggaacatt 16980
ttgcttttctg cttacttgca cctcgcagct ctctacggag gctatttggt tctcttcagt 17040
gcaaaatggc agaccgacat tttcgcttac attctttatg tcatctctgg actggggata 17100
actgctgggg cacatagact ctgggctcac aagtcataca aagccaagtg gccactcaga 17160
gttatactgg tcatcttcaa cacggttgcc tttcaagacg ctgctatgga ttgggctcgt 17220
gaccatagaa tgcatacaca gtacagcgag accgacgcgg acccacacaa tgcaacgaga 17280
ggtttcttct tctctcacat tggctggctt cttgttagga aacatcctga tctgaaagaa 17340
aaaggaagg gactcgacat gactgatctc cttgctgac caatactccg ttttcagaag 17400
aagtactatc tgatcctcat gcctctggcc tgttttgtga tgccaaccgt tatcccggtt 17460
tacttttggg gagaaacttg gacaaatgct ttcttcgtgg cagccatggt ccggttatgct 17520
ttcatcctga atgttacctg gttggtgaac tctgccgcac acaagtgggg agacaaaccc 17580
tatgacaagt ccatcaagcc ttccgaaaac ctttcagttg cgatgtttgc tttgggagaa 17640
ggatttcaca attaccatca cacttttccg tgggactaca agacagcaga gcttggaac 17700
aacaagtga acttcacaac aacgttcac aatttctttg cgaaaatcgg ttgggcctat 17760
gatttgaaga ctgtgagtga tgacattgtc aagaacaggg tcaagagaac tggcgatgga 17820
agccatcatc tctggggctg gggatgatg aatcagagca aagaagagat agatgcagcc 17880
attagatca accctaaga cgattgagta gttagcttaa tcacctagag ctcggtcacc 17940
tcgagtatca aaatctattt agaaatacac aatattttgt tgcaggcttg ctggagaatc 18000
gatctgctat cataaaaaatt acaaaaaaat tttatttgcc tcaattattt taggattggt 18060
attaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcac attgtgattg agaagatcag 18120
cgatacgaaa tattcgtagt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa 18180
cgttacatga attgatgaaa caatacaaag acagataaag ccacgcacat ttaggatatt 18240
ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc atgtcttcaa 18300
ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat atgcaggagc ggatcattca 18360
ttgtttggtt ggttgccctt gccaacatgg gactccaagg ttggcgcgcc gaccagctt 18420
tc 18422

```

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

5 <220>
<223> Plásmido pDAB7326

<400> 63

ttgtacaaag	tggttgccgc	cgcttaatta	aatttaaatt	caattaatgc	aatcttgatt	60
ttcaacaacg	aaggtaatgg	cgtaaaagaa	aaaatgtatg	ttattgtatt	gatctttcat	120
gatgttgaag	cgtgccataa	tatgatgatg	tataattaaa	atattaactg	tcgcatttta	180
ttgaaatggc	actgttattt	caaccatata	tttgattctg	ttacatgaca	cgactgcaag	240
aagtaataa	tagacgccgt	tggttaaagaa	ttgctatcat	atgtgcctaa	ctagagggaa	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	tgaaaaacaa	attgcctttg	540
gggagacggt	aaagccagtt	gctcttcaat	aaggaatgtc	gaggaggcaa	tgtaaccgcc	600
tctggtagta	cactttctta	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	ggtggaaaat	gtaagggcgg	aaagtaacct	1020
tatcacaaag	gaatcttatc	ccccactact	tatcctttta	tatttttccg	tgatcttttt	1080
gcccttgagt	tttcttatat	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
agggttgaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgagggtg	agggtgttgt	ggctgggtatt	1440

10

ES 2 623 454 T3

gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactggt 1500
 tacgtgtcac atagggcatca aagggtgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
 aagtcctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
 ccatctgtta ggttgcataa ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct 1680
 ggatacaagc atggtggatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggtatt tgagttgcca 1740
 gctcctccaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
 agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa 1860
 atagttgctg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg 1920
 aggtgggcta tggctctcag ttccttgtgg aagcgcttgg tctaagggtc agaggtgtta 1980
 gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt 2040
 aaagtatgta ttcataccta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat 2100
 gtctttattg tcgccgtatg taatcggcgt cacaaaataa tccccgggtg ctttctttta 2160
 atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tgggtccgtta taggaattga 2220
 agtgtgcttg aggtcggtcg ccaccactcc catttcataa ttttacatgt atttgaaaaa 2280
 taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga 2340
 aatatagttt aaatatattat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa 2400
 cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct 2460
 ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg 2520
 tttaaacgat ctgctgctaa ttttcgggtc aacttgcaca ggaaagacgt cgaccgcggt 2580
 agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgctc gatcgggtcc aatgttgtcc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaaaga ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tgggtgaaggg 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 gaaggctatc cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat 3300
 tgttttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
 aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa 3480

ES 2 623 454 T3

cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaac gaataagagt aaatacacct	3540
tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta	3600
ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa ttgcgggga	3660
gtgtcttgag ttgacctga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga	3720
tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa	3780
ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta	3840
ttaagttgtc taagcgtcaa ttgattttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa	3900
cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgcgtgtcg aggaattctg	3960
atctggtccc catttgagcg tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa	4020
taatttgttt attgcttttcg cctataaata cgacggatcg taatttgtcg ttttatcaaa	4080
atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt	4140
ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga	4200
tttccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgtgc 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 tcacgcgga cgaccaagca agcttggtg ccatttttgg	4560
ggtgaggccg ttcgcgccg agggcgcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc	4620
gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcggt cgtgcgcggt cacgcgcaca	4680
gggagcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga	4740
caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg	4800
tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgctg cccctcatct gtcagcactc tgcccccaa	4860
gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca	4920
gggcacttat cccaggtt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt	4980
tttcgccgat ttgcgaggct ggccagctcc acgtcgccgg ccgaaatcga gcctgcccc	5040
catctgtcaa cgccgcgcg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcatc	5100
tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcgggcg cgggtgtctg	5160
cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag	5220
cggcgagggc aaccagcccgt gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat	5280
aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcgggtata tccatccttt ttcgcacgat	5340
atacaggatt ttgccaaaag gtctgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc	5400
cgggcaggat aggtgaagta ggccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt	5460
attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccg	5520

ES 2 623 454 T3

gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaaccagg aagggcagcc 5580
cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggctac aaaatcacgg 5700
gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcat caatggcgac ctgggcccgc 5760
tgggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgaccccg cagggcgcg ttcggtgatg 5820
ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggtca 5880
tgatggggcgt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
ggggtgcgcg tgattgccaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
gggtcaaact aggaataaag gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
gggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgct gccccgcgaa 6300
accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacgcggcg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
ctcgaacagg aggcggcagg ttggcggaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacagggtcag cgaggccaag 6540
caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttggtc 6600
gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
ctgtttacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa ggtcattttc 6720
cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg 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 ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac ggcccgcg 7140
atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttccgc 7200
ctcatgtgcg gatcggttc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga tgacctggtg 7320
cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgt 7380
ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
tcgggacgca cggcgcgtc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500
tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc 7560

ES 2 623 454 T3

gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tggttcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
aaaagcccat	ggaggcggtc	gctgaacggg	tgcgagatgc	cgtggcattc	ggcgccata	7680
tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcgggtc	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740
acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agcccgaaca	gcgaggccga	ggggtcgccg	7800
gtatgctgct	gcgggcggtg	ccggcggggt	tattgctcgt	gatgatcgtc	cgacagattc	7860
caacgggaat	ctggtggatg	cgcatcttca	tcctcggcgc	acttaatat	tcgctattct	7920
ggagcttggt	gtttatttcg	gtctaccgcc	tgccggggcg	ggtcgcggcg	acggtaggcg	7980
ctgtgcagcc	gctgatgggc	gtgttcattc	ctgccgctct	gctaggtagc	ccgatacgat	8040
tgatggcggt	cctgggggct	atttgcgga	ctgcgggcgt	ggcgtgtgtg	gtgttgacac	8100
caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgctc	cagcgggcct	ggcgggggcg	gtttccatgg	8160
cgttcggaac	cgtgctgacc	cgcaagtggc	aacctcccgt	gcctctgctc	acctttaccg	8220
cctggcaact	ggcgccggga	ggacttctgc	tcgttccagt	agcttttagt	tttgatccgc	8280
caatcccgat	gcctacagga	accaatgttc	tcggcctggc	gtggctcggc	ctgatcggag	8340
cgggtttaac	ctacttcctt	tggttccggg	ggatctcgcg	actcgaacct	acagttgttt	8400
ccttactggg	ctttctcagc	ccccgagcgc	ttagtgggaa	tttgtaaccc	ttatcgaacc	8460
gggagcacag	gatgacgcct	aacaattcat	tcaagccgac	accgcttcgc	ggcgcggttt	8520
aattcaggag	ttaaacaatca	tgagggaagc	ggtgatcgcc	gaagtatcga	ctcaactatc	8580
agaggtagtt	ggcgtcatcg	agcgccatct	cgaaccgacg	ttgctggccg	tacatttgta	8640
cggctccgca	gtggatggcg	gcctgaagcc	acacagtgat	attgatttgc	tggttacggt	8700
gaccgtaagg	cttgatgaaa	caacgcggcg	agctttgatc	aacgaccttt	tggaacttcc	8760
ggcttccctt	ggagagagcg	agattctccg	cgtgttagaa	gtcaccattg	ttgtgcacga	8820
cgacatcatt	ccgtggcggt	atccagctaa	gcgcgaactg	caatttgag	aatggcagcg	8880
caatgacatt	cttgacagga	tcttcgagcc	agccacgacg	gacattgatc	tggttatctt	8940
gctgacaaaa	gcaagagaac	atagcgttgc	cttggttagt	ccagcggcg	aggaactctt	9000
tgatccggtt	cctgaacagg	atctatttga	ggcgctaaat	gaaaccttaa	cgctatggaa	9060
ctcgccgccc	gactgggctg	gcgatgagcg	aaatgtagtg	cttacgttgt	cccgcatttg	9120
gtacagcgca	gtaaccggca	aaatcgcgcc	gaaggatgtc	gctgccgact	gggcaatgga	9180
gcgcctgccg	gccagtatc	agcccgatc	acttgaagct	aggcaggctt	atcttggaca	9240
agaagatcgc	ttggcctcgc	gcgcagatca	gttggaagaa	ttgtttcact	acgtgaaagg	9300
cgagatcacc	aaggtagtcg	gcaaataatg	tctaacaatt	cgttcaagcc	gacgccgctt	9360
cgcggcgcgg	cttaactcaa	gcgttagaga	gctggggaag	actatgcgcg	atctgttgaa	9420
ggtggttcta	agcctcgtct	tgcatgggca	tttcgatcca	ttccatttcc	gcgctcaaga	9480
tggcttcccc	tcggcagttc	atcagggtca	aatcaatcta	gccgacttgt	ccggtgaaat	9540
gggctgcact	ccaacagaaa	caatcaaaca	aacatacaca	gcgacttatt	cacacgagct	9600

ES 2 623 454 T3

caaattacaa cggatatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 aatatatagt ttttatatat atgccttta 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 atcattatit 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta cttaaatttg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaatit ttactaacac 10320
 atatatitac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataattttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc atttgcaccc 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 tatttttaaa aaaatacgca atgacttgga acaaaagaaa 10800
 gtgatataat ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgtctcct tcgttacaac aatttttgac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttta actctagaag ctaggaattc 11040
 gcggccgctt tcctgcatga catcgtctcg cagagccaag cgcagtctta attaaactag 11100
 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cggtggtttt 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 ttactttaat 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 cagtgacaca actagccatt tttttctttg 11640

aataaaaaaa tccaattatc attgtatfff ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
gatttgtggt atttctgaag caagtcatgt tatgcaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
taattagata taattaaaaat attactffff taattttaag ttttaattgtt gaatttgtga 11940
ctattgattt attattctac tatgttttaa ttgttttata gatagttaa agtaaatata 12000
agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatggtgg 12060
actaatfff atatatfffct tattgctfff accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcatgcatg gatcttgccg 12180
aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaga caaaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggct caccatctc aaccacaca 12360
caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgctgt catcccatgc 12480
ccaaatctcc atgcatgttc caaccacctt ctctcttata taataacct aaataacctt 12540
aatatcactc acttctttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
taccccaacc caactcatat tcaatactac tctaggtagc ctgcagggat ccaacaatgg 12660
ctcccaacat ttctgaggat gtcaatggtg ttctttttga gtcagatgcg gcaacccctg 12720
atgtggtctt ttccacacca cctgtgcaaa aagctgacaa cagacccaag caacttgtgt 12780
ggaggaacat tttgcttttc gcttacttgc acctcgagc tctctacgga ggctatttgt 12840
ttctcttcag tgcaaatgg cagaccgaca ttttcgctta cattctttat gtcactcttg 12900
gactggggat aactgctggg gcacatagac tctgggctca caagtcatac aaagccaagt 12960
ggccactcag agttatactg gtcatcttca acacgggtgc ctttcaagac gctgctatgg 13020
attgggctcg tgaccataga atgcatcaca agtacagcga gaccgacgag gaccacaca 13080
atgcaacgag aggtttcttc ttctctcaca ttggctggct tcttgtagg aaacatctg 13140
atctgaaaga aaaagggag ggactcgaca tgagtgatct ccttgctgat ccaatactcc 13200
gttttcagaa gaagtactat ctgatcctca tgcctctggc ctgttttgtg atgccaaccg 13260
ttatcccggg ttacttttgg ggagaaactt ggacaaatgc tttcttcgtg gcagccatgt 13320
tccgttatgc tttcatcctg aatgttacct ggttggtgaa ctctgccga cacaagtggg 13380
gagacaaacc ctatgacaag tccatcaagc cttccgaaaa ctttccagtt gcgatgtttg 13440
ctttgggaga aggatttcac aattaccatc acacttttcc gtgggactac aagacagcag 13500
agcttggaag caacaagtgt aacttcacaa caacgttcat caatttcttt gcgaaaatcg 13560
gttgggccta tgatttgaag actgtgagtg atgacattgt caagaacagg gtcaagagaa 13620
ctggcgatgg aagccatcat ctctggggct ggggtgatga gaatcagagc aaagaagaga 13680

ES 2 623 454 T3

tagatgcagc cattaggatc aaccctaaag acgattgagt agtttagctta atcacctaga 13740
gctcgggtcac ctcgagtatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg ttgcaggcctt 13800
gctggagaat cgatctgcta tcataaaaat tacaaaaaaa ttttattttgc 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 tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaaa atattaactg tcgcatttta 180
ttgaaatggc actgttattt caaccatatac tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
aagtaaataa tagacgccgt tgttaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa 300
tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg 360
taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcagatag 420
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 aaatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa 900
agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga 960
ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 1020
tatcacaag gaatcttata cccactact tatcctttta ttttttccg tgtcattttt 1080
gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt 1140

ES 2 623 454 T3

tggtgtaagc	tat t t t t c t t t	gaagtactga	ggatacaact	tcagagaaat	ttgtaagttt	1200
gtaggtacca	gatctggatc	ccaaaccatg	tctccggaga	ggagaccagt	tgagattagg	1260
ccagctacag	cagctgatat	ggccgcgggt	tgtgatatcg	ttaaccatta	cattgagacg	1320
tctacagtga	acttttaggac	agagccacaa	acaccacaag	agtggattga	tgatctagag	1380
aggttgcaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgagggtg	aggggtgtgt	ggctggtatt	1440
gcttacgctg	ggccctggaa	ggctaggaac	gcttacgatt	ggacagttga	gagtactggt	1500
tacgtgtcac	ataggcatca	aaggttgggc	ctaggatcta	cattgtacac	acatttgctt	1560
aagtctatgg	aggcgcaagg	ttttaagtct	gtgggttgctg	ttataggcct	tccaaacgat	1620
ccatctgtta	ggttgcatga	ggctttggga	tacacagccc	gggttacatt	gcgcgcagct	1680
ggatacaagc	atggtggatg	gcatgatggt	ggtttttggc	aaagggtatt	tgagttgcca	1740
gctcctccaa	ggccagttag	gccagttacc	caaatctgag	tagttagctt	aatcacctag	1800
agctcgatcg	gcggcaatag	cttcttagcg	ccatcccggg	ttgatcctat	ctgtgttgaa	1860
atagttgcgg	tgggcaaggc	tctctttcag	aaagacaggc	ggccaaagga	accaaggtg	1920
aggtgggcta	tggctctcag	ttccttggtg	aagcgcttgg	tctaagggtc	agaggtgtta	1980
gcgggatgaa	gcaaaagtgt	ccgattgtaa	caagatatgt	tgatcctacg	taaggatatt	2040
aaagtatgta	ttcatcacta	atataatcag	tgtattccaa	tatgtactac	gatttccaat	2100
gtctttattg	tcgccgtatg	taatcggcgt	cacaaaataa	tccccggtga	ctttctttta	2160
atccaggatg	aaataatatg	ttattataat	ttttgcgatt	tgggtccgtta	taggaattga	2220
agtgtgcttg	aggtcggtcg	ccaccactcc	catttcataa	ttttacatgt	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	ttttcgggtc	aacttgcaca	ggaaagacgt	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	ccacggcggg	cttattcttt	agggaggatc	2820
tatctcgttg	ctcaagtgca	tggcgcaaag	cagttattgg	agtgcggatt	ttcgttgcca	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

ES 2 623 454 T3

gaaattccgt	cgagttaacg	cagccgctta	cgacggattc	gaagggtcatc	cattcggaat	3240
gtattagttt	gcaccagctc	cgcgtcacac	ctgtcttcat	ttgaataaga	tgtagcaat	3300
tgtttttagc	tttgtcttgt	tgtggcagg	cggcaagtgc	ttcagacatc	attctgtttt	3360
caaattttat	gctggagaac	agcttcttaa	ttcctttgga	aataatagac	tgcgctctaa	3420
aattcagatg	tctggatata	gatatgattg	taaaataacc	tatttaagt	tcatttagaa	3480
cataagtttt	atgaatgttc	ttccattttc	gtcatcgaac	gaataagagt	aaatacacct	3540
tttttaacat	tacaaataag	ttcttatacg	ttgtttatac	accgggaatc	atttccatta	3600
ttttcgcgca	aaagtcacgg	atattcgtga	aagcgacata	aactgcgaaa	tttgcgggga	3660
gtgtcttgag	tttgccctga	ggctagcgca	tgacataga	cacacacatc	atctcattga	3720
tgcttggtaa	taattgtcat	tagattgttt	ttatgcatag	atgcactcga	aatcagccaa	3780
ttttagacaa	gtatcaaacg	gatgtgactt	cagtacatta	aaaacgtccg	caatgtgtta	3840
ttaagttgtc	taagcgtaaa	tttgattttac	aattgaatat	atcctgcccc	agccagccaa	3900
cagctcgatt	tacaattgaa	tatatcctgc	cggccggccc	acgcgtgtcg	aggaattctg	3960
atctggcccc	catttgagcg	tgaatgtaga	cacgtcgaaa	taaagatttc	cgaattagaa	4020
taatttggtt	attgctttcg	cctataaata	cgacggatcg	taatttgctg	ttttatcaaa	4080
atgtactttc	attttataat	aacgctgcgg	acatctacat	ttttgaattg	aaaaaaaatt	4140
ggtaattact	ctttcttttt	ctccatattg	accatcatac	tcattgctga	tccatgtaga	4200
tttcccgga	atgaagccat	ttacaattga	atatatcctg	ccgccgtgc	cgctttgcac	4260
ccggtggagc	ttgcatgttg	gtttctacgc	agaactgagc	cggttaggca	gataatttcc	4320
attgagaact	gagccatgtg	caccttcccc	ccaacacggt	gagcgacggg	gcaacggagt	4380
gatccacatg	ggacttttaa	acatcatccg	tccgatggcg	ttgcgagaga	agcagtcgat	4440
ccgtgagatc	agccgacgca	ccgggcaggc	gcgcaacacg	atcgcaaagt	atttgaacgc	4500
aggtacaatc	gagccgacgt	tcacgaggaa	cgaccaagca	agcttggtcg	ccatttttgg	4560
ggtgaggccg	ttcgcgcccg	aggggagcag	ccccctgggg	gatgggaggc	ccgcgttagc	4620
gggcccggag	ggttcgagaa	gggggggcac	cccccttcgg	cgtgcgcggt	cacgcgcaca	4680
gggycagccc	ctggttaaaa	acaaggttta	taaatattgg	tttaaaagca	ggttaaaaga	4740
caggttagcg	gtggccgaaa	aacgggcgga	aacccttgca	aatgctggat	tttctgcctg	4800
tggacagccc	ctcaaagtgc	aataggtgcg	ccccctcatc	gtcagcactc	tgcccccaa	4860
gtgtcaagga	tcgcgcccct	catctgtcag	tagtcgcgcc	cctcaagtgt	caataaccga	4920
gggcacttat	ccccaggctt	gtccacatca	tctgtgggaa	actcgcgtaa	aatcaggcgt	4980
tttcgccgat	ttgcgaggct	ggccagctcc	acgtcgcccg	ccgaaatcga	gcctgcccct	5040
catctgtcaa	cgccgcgcgg	ggtgagtcgg	cccccaagt	gtcaacgtcc	gccccctatc	5100
tgtcagtgag	ggccaagttt	tccgcgaggt	atccacaacg	ccggcgcccg	cggtgtctcg	5160
cacacggctt	cgacggcggt	tctggcgcg	ttgcagggcc	atagacggcc	gccagcccag	5220

ES 2 623 454 T3

cggcgagggc	aaccagcccg	gtgagcgctg	gaaagggctg	acggatcttt	tccgctgcat	5280
aacctgctt	cggggtcatt	atagcgattt	tttcgggtata	tccatccttt	ttcgcacgat	5340
atacaggatt	ttgccaaagg	gttcgtgtag	actttccttg	gtgtatccaa	cggcgtcagc	5400
cgggcaggat	aggatgaagta	ggcccacccg	cgagcgggtg	ttcctttctt	actgtccctt	5460
attcgcacct	ggcggtgctc	aacgggaatc	ctgctctgcg	aggctggccg	gctaccgccg	5520
gcgtaacaga	tgagggcaag	cggtatggctg	atgaaaccaa	gccaaccagg	aagggcagcc	5580
cacctatcaa	ggtgtactgc	cttcagacg	aacgaagagc	gattgaggaa	aaggcggcgg	5640
cggccggcat	gagcctgtcg	gcctacctgc	tggccgtcgg	ccagggtac	aaaatcacgg	5700
gcgtcgtgga	ctatgagcac	gtccgcgagc	tggcccgcat	caatggcgac	ctgggccgcc	5760
tgggcggcct	gctgaaactc	tggctcaccg	acgaccgcg	cacggcgcg	ttcgggtgatg	5820
ccacgatcct	cgccctgctg	gcgaagatcg	aagagaagca	ggacgagctt	ggcaaggtca	5880
tgatgggctg	ggtccgccc	agggcagagc	catgactttt	ttagccgcta	aaacggccgg	5940
ggggtgcg	tgattgccaa	gcacgtcccc	atgcgctcca	tcaagaagag	cgacttcg	6000
gagctggtat	tcgtgcagg	caagattcgg	aataccaagt	acgagaagga	cggccagacg	6060
gtctacggga	ccgacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacaccaa	ggcaccaggc	6120
gggtcaaactc	aggaataagg	gcacattgcc	ccggcgtag	tcggggcaat	cccgcaagga	6180
gggtgaatga	atcggacgtt	tgaccggaag	gcatacaggc	agaactgat	cgacgcgggg	6240
ttttccgccg	aggatgccga	aaccatcgca	agccgcaccg	tcatgctgc	gccccgcgaa	6300
accttccagt	ccgtcggctc	gatgggtccag	caagctacgg	ccaagatcga	gcgcgacagc	6360
gtgcaactgg	ctccccctgc	cctgcccgcg	ccatcggccg	ccgtggagcg	ttcgcgctgt	6420
ctcgaacagg	aggcggcagg	tttggcgaag	tcgatgacca	tcgacacgcg	aggaactatg	6480
acgaccaaga	agcgaaaaac	cgccggcgag	gacctggcaa	aacagggtcag	cgaggccaag	6540
caggccgcgt	tgttgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aatgcagct	ttccttgctt	6600
gatattgcgc	cgtggccgga	cacgatgcga	gcgatgccaa	acgacacggc	ccgtcttgcc	6660
ctgttcacca	cgcgcaacaa	gaaaatccc	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	ggtgtcgtg	ctgcaccgct	tccgcgtcct	ggaccgtggc	7020
aagaaaacgt	cccgttgcca	ggtcctgatc	gacgaggaaa	tcgtcgtgct	gtttgctggc	7080
gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tgctgcggac	ggccccgacg	7140
atgttcgact	atttcagctc	gcaccgggag	ccgtaccgcg	tcaagctgga	aaccttccgc	7200
ctcatgtg	gatcggattc	caccgcgtg	aagaagtggc	gcgagcaggt	cggcgaagcc	7260

ES 2 623 454 T3

tgcaagagt	tgcgaggcag	cggcctggtg	gaacacgcct	gggtcaatga	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	cggcttgagg	cggccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tgttcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
aaaagcccat	ggaggcggtc	gctgaacggg	tgcgagatgc	cgtggcattc	ggcgccata	7680
tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcgggtc	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740
acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agcccgaaca	gcgaggccga	ggggtcgccg	7800
gtatgctgct	gcgggcggtg	ccggcggtt	tattgctcgt	gatgatcgtc	cgacagattc	7860
caacgggaat	ctggtggatg	cgcatcttca	tcctcggcgc	acttaatat	tcgctattct	7920
ggagcttggt	gtttatttcg	gtctaccgcc	tgccgggagg	ggtcggggcg	acggtagggc	7980
ctgtgcagcc	gctgatgggc	gtgttcattc	ctgccgctc	gctaggtagc	ccgatacgat	8040
tgatggcggg	cctgggggct	atttgcgga	ctgcgggcgt	ggcgtgttg	gtgttgacac	8100
caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgctc	cagcgggcct	ggcggggggc	gtttccatgg	8160
cgttcggaac	cgtgctgacc	cgcaagtggc	aacctccgt	gcctctgctc	acctttaccg	8220
cctggcaact	ggcggccgga	ggacttctgc	tcgttccagt	agcttttagt	ttgatccgc	8280
caatcccgat	gcctacagga	accaatgttc	tcggcctggc	gtggctcggc	ctgatcggag	8340
cgggtttaac	ctacttcctt	tggttccggg	ggatctcgcg	actcgaacct	acagttgttt	8400
ccttactggg	ctttctcagc	ccccgagcgc	ttagtgggaa	ttgtacccc	ttatcgaacc	8460
gggagcacag	gatgacgcct	aacaattcat	tcaagccgac	accgcttcgc	ggcgcggtt	8520
aattcaggag	ttaaacaatca	tgagggaagc	ggtgatcgcc	gaagtatcga	ctcaactatc	8580
agaggtaggt	ggcgtcatcg	agcgccatct	cgaaccgacg	ttgctggccg	tacatttgta	8640
cggctccgca	gtggatggcg	gcctgaagcc	acacagtgat	attgatttgc	tggttacggg	8700
gaccgtaagg	cttgatgaaa	caacgcggcg	agctttgatc	aacgaccttt	tggaaacttc	8760
ggcttccctt	ggagagagcg	agattctccg	cgtgtagaa	gtcaccattg	ttgtgcacga	8820
cgacatcatt	ccgtggcggt	atccagctaa	gcgcgaactg	caatttgag	aatggcagcg	8880
caatgacatt	cttgcaggta	tcttcgagcc	agccacgac	gacattgatc	tggctatctt	8940
gctgacaaaa	gcaagagaac	atagcgttgc	cttggtagg	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	gccagtatc	agccggtcat	acttgaagct	aggcaggctt	atcttgga	9240
agaagatcgc	ttggcctcgc	gcgcagatca	gttggaagaa	ttgttccact	acgtgaaagg	9300

ES 2 623 454 T3

cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
 cgcgccgccc cttaaactcaa gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca ttctgatcca ttccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccgaa 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccgggtgt 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 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 ataattttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccgggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc 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 tttttttaa aaaatacgca atgacttgga acaaaagaaa 10800
 gtgatataat ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgtccctc tcgttacaac aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcggccgctt tcctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcatgtta attaaactag 11100
 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cggtggtttt ttacctctat 11160
 ttaaaggggg tttccaccta aaaattcttg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg ctccgcaca cgatatccct acaaatttat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgctca tctttaatgt 11340

agtctaacat tttcatattg aaatatataa ttactttaat 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 cagtgcacac actagccatt tttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
 gatttggttg atttctgaag caagtcattg tatgcaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
 ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
 ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
 taattagata taattaaaat attacttttt taattttaag ttttaattgt gaatttggtga 11940
 ctattgattt attattctac tatgttttaa ttgttttata gatagtttaa agtaaatata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatggttg 12060
 actaattttc atatatctct tattgtcttt accctttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcattgcatt gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
 atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggc caccatctc aaccacaca 12360
 caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
 cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgcgtgt catcccatgc 12480
 ccaaactctc atgcatgttc caaccacctt ctctcttata taataacctat aaataacctt 12540
 aatatcactc 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 tggaaatcac gctggatacc 12900
 acaggctttg ggctcactgc tcatactctg ctactcttcc acttaggatt tggcttgctg 12960
 ctgttgaggg aggagctgtt gagggatcta tcagatggtg ggctagggat cacagggctc 13020
 atcataggta caccgatacc gacaaggacc catactctgt taggaaggga cttctctact 13080
 ctacacttgg atggatggtg atgaagcaga acccaaagag gatcggaagg accgacatct 13140
 ctgatctcaa cgaggacca gttgttgttt ggcaacacag gaactacctc aagggttgtgt 13200
 tcaccatggg acttgctgtt ccaatgcttg ttgctggact tggatgggga gattggcttg 13260
 gaggattcgt gtacgctgga atccttagga tcttcttcgt tcaacaagct accttctgct 13320
 tgaactctct tgctcactgg cttggagatc aaccattcga tgataggaac tctcctaggg 13380

ES 2 623 454 T3

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

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7330

<400> 65

ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaaa 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 ctccccgagt ggcatgatag 420
 ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
 caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaacaa attgcctttg 540

ES 2 623 454 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
atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta	840
tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggccaagaaa	900
agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga	960
ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	1020
tatcacaag gaatcttata cccactact tatcctttta tatttttccg tgtcattttt	1080
gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	1140
tggtgtaagc tattttcttt 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 aggggtgtgt ggctggtatt	1440
gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactgtt	1500
tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt	1560
aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat	1620
ccatctgtta ggttgcata ggccttgga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct	1680
ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt ggtttttggc aaagggtatt tgagttgcca	1740
gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag	1800
agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa	1860
atagttgcgg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg	1920
aggtgggcta tggctctcag ttccttggtg aagcgcttg tctaagggtgc agaggtgtta	1980
gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
aaagtatgta ttcactacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100
gtctttattg tcgccgtatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga ctttctttta	2160
atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tgggtccgtta taggaattga	2220
agtgtgcttg aggtcggtcg ccaccactcc catttcataa ttttacatgt atttgaaaaa	2280
taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga	2340
aatatagttt aaatatattat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa	2400
cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatattc aataactgat tatatcagct	2460
ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaatata taggaattcg	2520
tttaaacgat ctgcgtctaa ttttcggtcc aacttgcaca ggaaagacgt cgaccgcggt	2580

ES 2 623 454 T3

agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgctc gatcgggtcc aatgttggtcc 2640
 tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct 2700
 ataccttgat gatcggcctc tggatgaagg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag 2760
 gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc 2820
 tatctcgttg ctcaagtga tggcgcaaag cagttatttg agtgcggtt ttcgttgga 2880
 tattattcgc cagcagttag cagacgaaga gaccttcacg aacgtggcca aggccagagt 2940
 taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagtttg ttgatctttg 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatgtt 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 ctgtcttcac ttgaataaga tgtagcaat 3300
 tgttttttagc tttgtcttgt tgtggcaggc 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
 tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatc accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgattttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa 3900
 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgagcg tgaatgtaga cagctcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat tttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggaac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca 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 agcttggctg ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttcgcggccg aggggcgcag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc 4620

ES 2 623 454 T3

gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcgg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 gggcgcagcc ctgggttaaaa acaagggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740
 caggtttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgcaaatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgccctcaa 4860
 gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat cccagggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgccgat ttgcgaggct ggccagctcc acgtcgcgg cggaaatcga gcctgcccct 5040
 catctgtcaa cgccgcgcgg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctcg 5160
 cacacggctt cgacggcggt tctggcggtt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggg aaccagcccgt gtgagcgctg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aacctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcgggtata tccatccttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgctcagc 5400
 cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggcggtgtc aacgggaatc ctgctctgcg aggttgccg gctaccgccg 5520
 gcgtaacaga tgagggaag cggtggctg atgaaaccaa gccaacagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggtac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcat caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tgggcggcct gctgaaatc tggctcaccg acgaccgcg cacggcgcg ttcggtgatg 5820
 ccacgacct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggtea 5880
 tgatgggctt ggtccgccc agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcagg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 ggggtcaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgct gccccgcgaa 6300
 acctccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggccg ccgtggagcg ttcgctcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggctcag cgaggccaag 6540
 caggccgct tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttcctgttc 6600
 gatattgcgc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660

ES 2 623 454 T3

ctgttcacca	cgcgcaacaa	gaaaatcccg	cgcgaggcgc	tgcaaaacaa	ggtcattttc	6720
cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgtcg	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	gggtgctgctg	ctgcaccgct	tccgcgtcct	ggaccgtggc	7020
aagaaaacgt	cccgttgcca	ggcctgatac	gacgaggaaa	tcgtcgtgct	gtttgctggc	7080
gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tgctgccgac	ggcccgcagg	7140
atgttcgact	atttcagctc	gcaccgggag	ccgtaccgcg	tcaagctgga	aaccttccgc	7200
ctcatgtgcg	gatcggattc	caccgcgctg	aagaagtggc	gcgagcaggt	cggcgaagcc	7260
tgcaagaggt	tgcgaggcag	cggcctggtg	gaacacgcct	gggtcaatga	tgacctggtg	7320
cattgcaaac	gctagggcct	tgtgggggtca	gttccggctg	ggggttcagc	agccagcgct	7380
ttactggcat	ttcaggaaca	agcgggcact	gctcgacgca	cttgcttcgc	tcagtatcgc	7440
tcgggacgca	cggcgcgctc	tacgaactgc	cgataaacag	aggattaaaa	ttgacaattg	7500
tgattaaggc	tcagattcga	cggttgagg	cgcccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tggttcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
aaaagcccat	ggaggcgctt	gctgaacggg	tgcgagatgc	cgtggcattc	ggcgccatac	7680
tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcgggtc	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740
acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agcccgaaca	gcgaggccga	ggggtcgcgg	7800
gtatgctgct	gcgggcgttg	ccggcggggt	tattgctcgt	gatgatcgtc	cgacagattc	7860
caacgggaat	ctggttgatg	cgcatcttca	tcctcggcgc	acttaatat	tcgctattct	7920
ggagcttggt	gtttatttcg	gtctaccgcc	tgccgggcgg	ggtcgcggcg	acggtagggc	7980
ctgtgcagcc	gctgatggtc	gtgttcattc	ctgccgctct	gctaggtagc	ccgatacgat	8040
tgatggcggg	cctgggggct	atttgcgga	ctgcgggcgt	ggcgctgttg	gtgttgacac	8100
caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgctc	cagcgggcct	ggcgggggcg	gtttccatgg	8160
cgttcggaac	cggtgctgacc	cgcaagtggc	aacctcccgt	gcctctgctc	acctttaccg	8220
cctggcaact	ggcggccgga	ggacttctgc	tcgttccagt	agcttttagt	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	ggcgcggtt	8520
aattcaggag	ttaaacaatca	tgagggaagc	ggatgatgcc	gaagtatcga	ctcaactatc	8580
agaggtagtt	ggcgtcatcg	agcgccatct	cgaaccgacg	ttgctggccg	tacatttgta	8640
cggctccgca	gtggatggcg	gcctgaagcc	acacagtgat	attgatttgc	tggttacggg	8700

ES 2 623 454 T3

gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc 8760
ggcttcccc ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttggag aatggcagcg 8880
caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgacgac gacattgatc tggctatctt 8940
gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcg aggaactctt 9000
tgatccgggt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa 9060
ctcgccgccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga 9180
gcgcctgccg gccagtatc agcccgcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca 9240
agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300
cgagatcacc aaggtagtcg gcaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt 9360
cgcggcgcg cttaaactca gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa 9420
ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca tccccattcc gcgctcaaga 9480
tggcttcccc tcggcagttc atcagggtca aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
gggctgcact ccaacagaaa caatcaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
caaattacaa cggatatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
caatattact caccggatcc taaccggtgt 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 tactaaaatg 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
atatattttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataattttca tctaacaaaa 10380
aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc atttgcacc ctaatcataa 10500
tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtgggtgtaa 10620
tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
aggtttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagt attgaagctc 10740

ES 2 623 454 T3

gaaatatacg aaggaacaaa tattttttaa aaaatacgca atgacttgga acaaaaagaaa 10800
 gtgatataatt ttttggttctt 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 catcgctctg cagagccaag cgcatgctta attaaactag 11100
 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctctat 11160
 ttaaaggggt tttccaccta aaaattcttg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg cttccgcaca cgatatccct acaaatttat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaactt tttcatattg aaatatataa ttactttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tttcatataa aatgtttaat atacaatata aacaaattct 11460
 ttaccttaag aaggatttcc ctttttatat tttaaaaata tatttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttgtt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgcacac actagccatt tttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt 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 taattaaaat attacttttt taattttaag tttattgtt gaatttgatga 11940
 ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagttaa agtaaatata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtggtacc ctaaaccata aactataaga tttatggttg 12060
 actaattttc atatatcttct tattgctttt accctttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcattgcatg gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaga caaaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
 atgcaaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggct caccatctc aaccacaca 12360
 caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
 cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgcgtgt catcccatgc 12480
 ccaaactctc atgcatgttc caaccacctt ctctcttata taataacctat aaataacctt 12540
 aatatcactc acttctttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
 taccaccaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgcagggat ccaacaatgg 12660
 ccagcagttc ttcaagtgtg ccagaacttg ccgcagcttt ccctgatggg acaacggact 12720
 tcaaacccat gaggaacacc aaaggctatg atgtctccaa acctcacatc tctgaaacac 12780

ES 2 623 454 T3

cgatgacttt gaagaactgg cacaacatg tgaactggct caacaccaca ttcattctct 12840
 ttgttccact ggctgggttg atctcaacct attgggttcc tcttcaatgg aaaactgcag 12900
 tgtgggcagt tgtgtactac ttcaacactg gacttgggat cactgctggc taccatagat 12960
 tgtgggcaca ttctctttac aaggccagct tgcctctcaa 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 cttgttgctg gcctgggatg gggagactac tggggagggt 13320
 tcacttatgg agggatcttg agagtgttct ttgttcagca agccaccttc tgtgtcaact 13380
 cacttgacaca ttggcttgggt gatcaaccgt ttgatgacag aaactctcca cgtgaccatg 13440
 tcataactgc tcttgtcacg ctgggtgaag gctatcacaa ctttcaccat gagtttccgt 13500
 cagactatag aaatgcgatt gagtggatc agtatgaccc cacgaagtgg agcatttgga 13560
 tttggaagca acttggactt gtcacaatc tcaagcagtt cagacagaat gagatagaga 13620
 agggaagggt tcaacagttg cagaagaac tggatcagaa gagagcgaaa cttgattggg 13680
 gaataccggt ggaacaactc cctgttgtgt cttgggatga ctttgttgaa cagtcaaaga 13740
 atggcaaggc atggattgct gttgctggtg tcattcacga tgttggtgac ttcacaaagg 13800
 atcatcctgg tggacgtgct ctcatcaact ctgcgattgg caaagatgcc acagcgatct 13860
 tcaatggagg tgtctacaat cattcaaatg ccgcacacaa ctttctctcc accatgaggg 13920
 ttggtgtcct ccgtggaggg tgcgaagtgg agatatggaa acgtgctcaa agtgagaaca 13980
 aagatgtctc tactgtggtt gatagtcttg gcaaccgtat tgtgagagct ggtggacaag 14040
 ctaccaaagt ggttcagcca gtccctggtg ctcaagcagc ttgatgagta gttagcttaa 14100
 tcacctagag ctcggtcacc tcgagtatca aaatctatct agaaatacac aatattttgt 14160
 tgcaggcttg ctggagaatc gatctgctat cataaaaatt acaaaaaaat tttattttgcc 14220
 tcaattatct taggattggt attaaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcatc 14280
 attgtgattg agaagatcag cgatacgaaa tattcgtagt actatcgata atttatttga 14340
 aaattcataa gaaaagcaaa cgttacatga attgatgaaa caatacaaag acagataaag 14400
 ccacgcacat ttaggatatt ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc 14460
 tgacaggagc atgtcttcaa ttacagccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat 14520
 atgcaggagc ggatcattca ttgtttgttt ggttgccttt gccaacatgg gagtccaagg 14580
 ttggcgcgcc gacccagctt tc 14602

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7331

<400> 66

ES 2 623 454 T3

taaattttaa	ttcaattaat	gcaatcttga	ttttcaacaa	cgaaggtaat	ggcgtaaaag	60
aaaaaatgta	tgttattgta	ttgatctttc	atgatgttga	agcgtgccat	aatatgatga	120
tgtataatta	aaatattaac	tgtcgcattt	tattgaaatg	gcaactgttat	ttcaaccata	180
tctttgattc	tgttacatga	cacgactgca	agaagtaa	aatagacgcc	gttggttaaag	240
aattgctatc	atatgtgcct	aactagaggg	aatttgagcg	tcagacctaa	tcaaatatta	300
caaaatatct	cactctgtcg	ccagcaatgg	tgtaatcagc	gcagacaaat	ggcgtaaaga	360
tcgcggaaaa	acctccccga	gtggcatgat	agctgcctct	gtattgctga	tttagtcagc	420
cttatttgac	ttaaggggtgc	cctcgtagt	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
agaaggtaat	tatccaagat	gtagcatcaa	gaatccaatg	tttacgggaa	aaactatgga	720
agtattatgt	aagctcagca	agaagcagat	caatatgcgg	cacatatgca	acctatgttc	780
aaaaatgaag	aatgtacaga	tacaagatcc	tatactgcca	gaatacgaag	aagaatacgt	840
agaaattgaa	aaagaagaac	caggcgaaga	aaagaatctt	gaagacgtaa	gcactgacga	900
caacaatgaa	aagaagaaga	taaggtcggt	gattgtgaaa	gagacataga	ggacacatgt	960
aagggtgaaa	atgtaagggc	ggaaagtaac	cttatcacaa	aggaatctta	tccccacta	1020
cttatccttt	tatatTTTTc	cgtgtcattt	ttgcccttga	gttttcctat	ataaggaacc	1080
aagttcgga	tttgtgaaaa	caagaaaaaa	tttgggtgaa	gctattttct	ttgaagtact	1140
gaggatacaa	cttcagagaa	atttgtaagt	ttgtaggtac	cagatctgga	tcccaaacca	1200
tgtctccgga	gaggagacca	gttgagatta	ggccagctac	agcagctgat	atggccgcgg	1260
tttgtgatat	cgtaaaccat	tacattgaga	cgctacagt	gaactttagg	acagagccac	1320
aaacaccaca	agagtggatt	gatgatctag	agaggttgca	agatagatac	ccttggttgg	1380
ttgctgaggt	tgaggggtgtt	gtggctggta	ttgcttacgc	tgggccctgg	aaggctagga	1440
acgcttacga	ttggacagtt	gagagtactg	tttacgtgtc	acataggcat	caaagggttg	1500
gcctaggatc	tacattgtac	acacatttgc	ttaagtctat	ggaggcgcaa	ggttttaagt	1560
ctgtggttgc	tgttataggc	cttccaaacg	atccatctgt	taggttgcat	gaggctttgg	1620
gatacacagc	ccgggggtaca	ttgcgcgcag	ctggatacaa	gcatggtgga	tggcacgatg	1680
ttggtttttg	gcaaagggat	tttgagttgc	cagctcctcc	aaggccagtt	aggccagtta	1740
cccaaactctg	agtagttagc	ttaatcacct	agagctcgat	cggcggcaat	agcttcttag	1800
cgccatcccc	ggttgatcct	atctgtgttg	aaatagttgc	ggtgggcaag	gctctctttc	1860
agaaagacag	gcggccaaaag	gaaccaagg	tgagggtggc	tatggctctc	agttccttgt	1920

ES 2 623 454 T3

ggaagcgctt ggtctaaggt gcagagggtg tagcgggatg aagcaaaagt gtccgattgt 1980
 aacaagatat gttgatccta cgtaaggata ttaaagtatg tattcatcac taatataatc 2040
 agtgtattcc aatatgtact acgatttcca atgtctttat tgcgcgcgta tgtaatcggc 2100
 gtcacaaaat aatccccggt gactttcttt taatccagga tgaaataata tgttattata 2160
 atttttgcga tttgggtccg tataggaatt gaagtgtgct tgagggtcggc cgccaccact 2220
 cccatttcat aattttacat gtatttgaaa aataaaaatt tatggatttc aatttaaaca 2280
 cgtatacttg taaagaatga tatcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa 2340
 taacaagtca ggtatttatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt 2400
 cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag 2460
 tgcgatatta tgggtgtaata cataggaatt cgtttaaacg atctgcgtct aattttcggc 2520
 ccaacttgca caggaaagac gtcgaccgcg gtagctcttg ccagcagac tgggcttcca 2580
 gtcctttcgc tcgatcgggt ccaatgttgt cctcagctgt gaaccggaag cggacgacca 2640
 acagtggaag aactgaaagg aacgagccgt ctataccttg atgatcggcc tctggtgaag 2700
 ggtatcatcg cagccaagca agctcatgaa aggctgatgg gggaggtgta taattatgag 2760
 gccacggcg ggccttattct ttagggagga tctatctcgt tgctcaagt catggcgcaa 2820
 agcagttatt ggagtgcgga ttttcgttg catattattc gccacgagtt agcagacgaa 2880
 gagaccttca tgaacgtggc caaggccaga gttaagcaga tgttacgcc tgctgcaggc 2940
 ctttctatta tccaatagtt ggttgatctt tggaaagagc ctcggtgag gcccatactg 3000
 aaagagatcg atggatatcg atatgccatg ttgtttgcta gccagaacca gatcacatcc 3060
 gatatgctat tgcagcttga cgcagatatg gaggataagt tgattcatgg gatcgctcag 3120
 gagtagctca tccatgcacg ccgacaagaa cagaaattcc gtcgagttaa cgcagccgct 3180
 tacgacggat tcgaaggcca tccattcgga atgtattagt ttgcaccagc tccgcgtcac 3240
 acctgtcttc atttgaataa gatgttagca attgttttta gctttgtctt gttgtggcag 3300
 ggcggcaagt gcttcagaca tcattctgtt ttcaaatatt atgctggaga acagcttctt 3360
 aattcctttg gaaataatag actgcgtctt aaaattcaga tgtctggata tagatatgat 3420
 tgtaaaataa cctattttaag tgcatttag aacataagtt ttatgaatgt tcttccattt 3480
 tcgtcatcga acgaataaga gtaaatcac cttttttaac attacaaata agttcttata 3540
 cgttgtttat acaccgggaa tcatttccat tttttcgcg caaaagtcac ggatattcgt 3600
 gaaagcgaca taaactgcga aatttgcggg gagtgtcttg agtttgctc gaggctagcg 3660
 catgcacata gacacacaca tcatctcatt gatgcttggc aataattgtc attagattgt 3720
 ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aattttagac aagtatcaa cggatgtgac 3780
 ttcagtacat taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgattt 3840
 acaattgaat atatcctgcc ccagccagcc aacagctcga tttacaattg aatatacct 3900
 gccggccggc ccacgcgtgt cgaggaattc tgatctggcc cccatttgga cgtgaatgta 3960

ES 2 623 454 T3

gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt cgcctataaa	4020
tacgacggat cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata ataacgctgc	4080
ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt ttctccatat	4140
tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt	4200
gaatatatcc tgccgccgct gccgctttgc acccgggtgga gcttgcatgt tggtttctac	4260
gcagaactga gccggttagg cagataatth ccattgagaa ctgagccatg tgcaccttcc	4320
ccccaacacg gtgagcgacg gggcaacgga gtgatccaca tgggactttt aaacatcatc	4380
cgtcggatgg cgttgcgaga gaagcagtcg atccgtgaga tcagccgacg caccgggcag	4440
gcgcgcaaca cgatcgcaaa gtatttgaac gcaggtaaca tcgagccgac gttcacgcgg	4500
aacgaccaag caagcttggc tgccattttt ggggtgaggc cgttcgcggc cgagggggcg	4560
agccccctgg gggatgggag gcccgcgta gcgggccggg agggttcgag aagggggggc	4620
accccccttc ggcgtgcgcg gtcacgcgca cagggcgcag ccctgggtta aaacaagggt	4680
tataaatatt ggtttaaaag caggttaaaa gacaggttag cggtgggcga aaaacgggcg	4740
gaaacccttg caaatgctgg attttctgcc tgtggacagc ccctcaaag tcaatagggtg	4800
cgcctctcat ctgtcagcac tctgccctc aagtgtcaag gatcgcgccc ctcatctgtc	4860
agtagtcgcg cccctcaagt gtcaataaccg cagggcactt atccccaggc ttgtccacat	4920
catctgtggg aaactcgcgt aaaatcaggc gttttcgccg atttgcgagg ctggccagct	4980
ccacgtcgcc ggccgaaatc gagcctgccc ctcatctgtc aacgccgcgc cgggtgagtc	5040
ggccccctaa gtgtcaacgt ccgccccctc tctgtcagtg agggccaagt tttccgcgag	5100
gtatccacaa gcgccggcgc cgcggtgtct cgcacacggc ttcgacggcg tttctggcgc	5160
gtttgcaggg ccatagacgg ccgccagccc agcggcgagg gcaaccagcc cggtgagcgt	5220
cggaaagggg cgacggatct tttccgctgc ataaccctgc ttcgggggtca ttatagcgat	5280
tttttcggta tatccatcct ttttcgcacg atatacagga ttttgccaaa gggttcgtgt	5340
agactttcct tgggtgatcc aacggcgctc gccgggcagg atagggtgaag tagggccacc	5400
cgcgagcggg tgttccttct tctactgtccc ttattcgcac ctggcgggtgc tcaacgggaa	5460
tcctgctctg cgaggctggc cggctaccgc cggcgtaaca gatgagggca agcggatggc	5520
tgatgaaacc aagccaacca ggaagggcag ccacacctatc aagggtgtact gccttccaga	5580
cgaacgaaga gcgattgagg aaaaggcggc ggcggccggc atgagcctgt cggcctacct	5640
gctggccgct ggccagggct acaaaatcac gggcgctcgtg gactatgagc acgtccgcga	5700
gctggcccg atcaatggcg acctgggccc cctgggcggc ctgctgaaac tctggctcac	5760
cgacgacccg cgcacggcgc ggttcgggtga tgccacgac ctcgccctgc tggcgaagat	5820
cgaagagaag caggacgagc ttggcaaggc catgatgggc gtggtccgcc cgagggcaga	5880
gccatgactt ttttagccgc taaaacggcc ggggggtgcg cgtgattgcc aagcacgtcc	5940
ccatgcgctc catcaagaag agcgacttcg cggagctggg attcgtgcag ggcaagattc	6000

ES 2 623 454 T3

ggaataccaa gtacgagaag gacggccaga cgggtctacgg gaccgacttc attgccgata 6060
 aggtggatta tctggacacc aaggcaccag gcgggtcaaa tcaggaataa gggcacattg 6120
 ccccggcgtg agtcggggca atcccgaag gaggggtgaat gaatcggacg tttgaccgga 6180
 aggcatacag gcaagaactg atcgacgcgg ggttttccgc cgaggatgcc gaaaccatcg 6240
 caagccgcac cgtcatgcgt gcgccccgcg aaaccttcca gtccgtcggc tcgatgggcc 6300
 agcaagctac ggccaagatc gagcgcgaca gcgtgcaact ggctccccct gccctgcccc 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 cagcgcgaac aagaaaaatcc 6660
 cgcgcgagggc gctgcaaac aaggtcattt tccacgtcaa caaggacgtg aagatcacct 6720
 acaccggcgt cgagctgcgg gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag gtgttggagt 6780
 acggaagcg caccctatc ggcgagccga tcaccttcac gttctacgag ctttgccagg 6840
 acctgggctg gtcgatcaat ggccggtatt acacgaaggc cgaggaatgc ctgtcgcgcc 6900
 tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg accgcgttgg gcacctggaa tcggtgtcgc 6960
 tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg gcaagaaac gtcccgttgc caggtcctga 7020
 tcgacgagga aatcgctcgt ctgtttgctg gcgaccacta cagcaaattc atatgggaga 7080
 agtaccgcaa gctgtcgcgg acggcccgac ggatgttcga ctatttcagc tcgcaccggg 7140
 agccgtaccc gctcaagctg gaaaccttcc gcctcatgtg cggatcggat tccaccgcg 7200
 tgaagaagtg gcgcgagcag gtcggcgaag cctgcgaaga gttgcgaggc agcggcctgg 7260
 tggaacacgc ctgggtcaat gatgacctgg tgcattgcaa acgctagggc cttgtgggg 7320
 cagttccggc tgggggttca gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa caagcgggca 7380
 ctgctcgacg cacttgcttc gtcagtatc gtcgggacg cacggcgcgc tctacgaact 7440
 gccgataaac agaggattaa aattgacaat tgtgattaag gtcagattc gacggcttgg 7500
 agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga aagctccaga 7560
 gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt tcgctgaacg 7620
 gttgcgagat gccgtggcat tcgggccta catcgacggc gagatcattg ggctgtcgg 7680
 cttcaaacag gaggacggc ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg gcgttttcgt 7740
 ggagcccga cagcgaggcc gaggggtcgc cggatgtctg ctgcgggcgt tgccggcggg 7800
 tttattgctc gtgatgatc tccgacagat tccaacggga atctggtgga tgcgcattt 7860
 catctcggc gcacttaata tttcgtatt ctggagctt tttttatctt cggctctaccg 7920
 cctgccgggc ggggtcgcgg cgacggtagg cgctgtgcag ccgctgatgg tcgtgttcat 7980
 ctctgccgct ctgctaggtg gcccgatacg attgatggcg gtccctgggg ctatttgccg 8040

ES 2 623 454 T3

aactgcgggc	gtggcgctgt	tggtgttgac	accaaacgca	gcgctagatc	ctgtcggcgt	8100
cgcagcgggc	ctggcggggg	cggtttccat	ggcgttcgga	accgtgctga	cccgcaagtg	8160
gcaacctccc	gtgcctctgc	tcacctttac	cgcctggcaa	ctggcggccg	gaggacttct	8220
gctcgttcca	gtagctttag	tgtttgatcc	gccaatcccc	atgcctacag	gaaccaatgt	8280
tctcggcctg	gcgtggctcg	gcctgatcgg	agcgggttta	acctacttcc	tttggttccg	8340
ggggatctcg	cgactcgaac	ctacagtgtg	ttccttactg	ggctttctca	gccccgagc	8400
gcttagtggg	aatttgtacc	ccttatcgaa	ccgggagcac	aggatgacgc	ctaacaattc	8460
attcaagccg	acaccgcttc	gcggcgccgc	ttaattcagg	agttaaacad	catgagggaa	8520
gcggtgatcg	ccgaagtatc	gactcaacta	tcagaggtag	ttggcgatcat	cgagcgccat	8580
ctcgaaccga	cgttgctggc	cgtacatttg	tacggctccg	cagtggatgg	cggcctgaag	8640
ccacacagtg	atattgattt	gctggttacg	gtgaccgtaa	ggcttgatga	aacaacgcgg	8700
cgagctttga	tcaacgacct	tttgaaaact	tccgcttccc	ctggagagag	cgagattctc	8760
cgcgctgtag	aagtcaccat	tggtgtgcac	gacgacatca	ttccgtggcg	ttatccagct	8820
aagcgcgaa	tgcaatttgg	agaatggcag	cgcaatgaca	ttcttgacag	tatcttcgag	8880
ccagccacga	tcgacattga	tctggctatc	ttgctgacaa	aagcaagaga	acatagcggt	8940
gccttggtag	gtccagcggc	ggaggaactc	tttgatccgg	ttcctgaaca	ggatctattt	9000
gaggcgctaa	atgaaacctt	aacgctatgg	aactcgccgc	ccgactgggc	tggcgatgag	9060
cgaatgtag	tgcttacgtt	gtcccgcat	tggtacagcg	cagtaaccgg	caaatcgcg	9120
ccgaaggatg	tcgctgccga	ctgggcaatg	gagcgctgc	cggcccagta	tcagcccgtc	9180
atacttgaag	ctaggcaggc	ttatcttggg	caagaagatc	gcttggcctc	gcgcgcagat	9240
cagttggaag	aatttgttca	ctacgtgaaa	ggcgagatca	ccaaggtagt	cggcaaataa	9300
tgtctaacaa	ttcgttcaag	ccgacgccgc	ttcgcgccgc	ggcttaactc	aagcgttaga	9360
gagctgggga	agactatgcg	cgatctgttg	aagggtggtc	taagcctcgt	cttgcgatgg	9420
catttcgatc	cattccatt	ccgcgctcaa	gatggcttcc	cctcggcagt	tcacagggc	9480
taaatcaatc	tagccgactt	gtccggtgaa	atgggctgca	ctccaacaga	aacaatcaaa	9540
caaacataca	cagcgactta	ttcacacgag	ctcaaattac	aacggtatat	atcctgccag	9600
tcagcatcat	cacacaaaa	gttaggcccc	aatagtttga	aattagaaag	ctcgcaattg	9660
aggctctacg	gccaaattcg	ctcttagccg	tacaatatta	ctcaccggat	cctaaccggt	9720
gtgatcatgg	gccgcgatta	aaaatctcaa	ttatatattg	tctaatttag	tttggtattg	9780
agtaaaacaa	attcgaacca	aacaaaaata	taaatatata	gtttttatat	atatgccttt	9840
aagacttttt	atagaatttt	ctttaaaaaa	tatctagaaa	tatttgcgac	tcttctggca	9900
tgtaatatatt	cgttaaatat	gaagtgtctc	atttttatta	actttaaata	attggttgta	9960
cgatcacctt	cttatcaagt	gttactaaaa	tgcgtaatc	tctttgttct	tccatattca	10020
tatgtcaaaa	cctatcaaaa	ttcttatata	tctttttcga	atttgaagtg	aaatttcgat	10080

ES 2 623 454 T3

aattttaa at taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt tataactta at 10140
tactaaattt ggttaacttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa acgactaaaa 10200
taaataaata tcatgtgtta ttaagaaaat tctcctataa gaatatttta atagatcata 10260
tgtttgtaaa aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa aatttgacaa 10320
agtaagatta aaataatatt catctaacaa aaaaaaaacc agaaaatgct gaaaacccgg 10380
caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt tggtttggtt tgattttgat ataaaccgaa 10440
ccaactcggg ccaattgcac ccctaatacat aatagcttta atatttcaag atattattaa 10500
gttaacgttg tcaatatcct ggaaattttg caaaatgaat caagcctata tggctgta at 10560
atgaatttaa aagcagctcg atgtggtggt aatatgta at tacttgatt ctaaaaaa at 10620
atcccaagta ttaataattt ctgctaggaa gaaggttagc tacgatttac agcaaagcca 10680
gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca aatattttta 10740
aaaaaatacg caatgacttg gaacaaaaga aagtgtatata ttttttggtt ttaacaagc 10800
atcccctcta aagaatggca gtttcccttt gcatgtaact attatgctcc cttcgttaca 10860
aaaatttttg actactattg ggaacttctt ctgaaaatag tggccaccgc tta at 10915

<210> 67
<211> 1448
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Promotor de PvPhas v2

<400> 67

ctcccagtat cattatagtg aaagtttttg ctctctcgcc ggtggttttt tacctctatt 60
taaagggggt tccaccta aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt 120
tctcataatc tttggttgaa attatcacgc tccgcacac gatatcccta caaatttatt 180
atttgttaaa cattttcaa ccgcataaaa tttatgaag tcccgcttat ctttaatgta 240
gtctaacatt tcatattga aatatataat ttacttaatt ttagcgttg tagaaagcat 300
aatgatttat tcttattctt ctcatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt 360
taccttaaga aggatttccc attttatatt ttaaaaatat atttatcaa tatttttcaa 420
ccacgtaaat ctcataataa taagttgttt caaaagtaat aaaatttaac tccataattt 480
ttttattcga ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccattt ttttcttgga 540
ataaaaaaat ccaattatca ttgtattttt ttatataaat gaaaatttca ccaaacaatg 600
atttgtggtt tttctgaagc aagtcagtgt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac 660
tacggaagta actgaagatc tgcttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttaa 720
taatagttac tatattcaag atttcatata tcaaatactc aatattactt ctaaaaaatt 780
aattagatat aattaaaata ttactttttt aattttaagt ttaattgttg aatttgtagc 840
tattgattta ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagtttaaa gtaaatataa 900

ES 2 623 454 T3

	gtaatgtagt agagtgttag agtgttaccc taaaccataa actataagat ttatggtgga	960
	ctaattttca tatatttctt attgctttta ccttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg	1020
	aattactgtg ggttgccatg acactctgtg gtcttttggg tcatgcatgg atcttgcgca	1080
	agaaaaagac aaagaacaaa gaaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa	1140
	ccaactcaaa ttagtcactg gctgatcaag atcgccgct ccatgtatgt ctaaagtcca	1200
	tgcaaagcaa cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac	1260
	aaacacattg cctttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc	1320
	gccacctcaa tttcttctact tcaacacacg tcaacctgca tatgcgtgtc atcccatgcc	1380
	caaatctcca tgcattgttc aaccaccttc tctcttatat aataacctata aataacctta	1440
	atatcact	1448
	<210> 68	
	<211> 85	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> PvPhas 5' UTR	
10	<400> 68	
	cacttctttc 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 gcttcaata gtacaaaaac aaatgtgtac	120
	tataagactt tctaaacaat tctaacttta gcattgtgaa cgagacataa gtgttaagaa	180
	gacataacaa ttataatgga agaagtttgt ctccatttat atattatata ttaccacctt	240

ES 2 623 454 T3

	atgtattata ttaggatggt aaggagacat aacaattata aagagagaag tttgtatcca	300
	tttatatatt atatactacc catttatata ttatacttat ccacttattt aatgtcttta	360
	taaggtttga tccatgatat ttctaatttt ttagttgata tgtatatgaa aaggtactat	420
	ttgaactctc ttactctgta taaaggttgg atcatcctta aagtgggtct atttaatttt	480
	attgcttctt acagataaaa aaaaaattat gagttggttt gataaaatat tgaaggattt	540
	aaaataataa taaataataa ataacatata atatatgtat ataaatttat tataatataa	600
	catttatcta taaaaaagta aatattgtca taaatctata caatcgttta gccttgctgg	660
	aacgaatctc aattatttta acgagagtaa acataattga ctttttggtt atttaacaaa	720
	ttattattta acactatatg aaattttttt tttttatcag caaagaataa aattaaatta	780
	agaaggacaa tgggtgtcca atccttatac aaccaacttc cacaagaaag tcaagtcaga	840
	gacaacaaaa aaacaagcaa aggaaatttt ttaatttgag ttgtcttggt tgctgcataa	900
	tttatgcagt aaaacactac acataaccct tttagcagta gagcaatggt tgaccgtgtg	960
	cttagcttct tttattttat tttttatca gcaaagaata aataaaataa aatgagacac	1020
	ttcagggatg tttcaaccct tatacaaaac cccaaaaaca agtttcctag caccctacca	1080
	acgaattc	1088
	<210> 71	
	<211> 457	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> AtuORF 3' UTR v1	
	<400> 71	
	tatcaaaatc tatttagaaa tacacaatat tttgttgag gcttgctgga gaatcgatct	60
	gctatcataa aaattacaaa aaaattttat ttgcctcaat tattttagga ttggtattaa	120
	ggacgcttaa attatttgtc gggtcactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata	180
	cgaaatattc gtagtactat cgataattta ttgaaaatt cataagaaaa gcaaacgtta	240
	catgaattga tgaaacaata caaagacaga taaagccacg cacatttagg atattggccg	300
	agattactga atattgagta agatcacgga atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag	360
	cccaaatggc agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca ggagcggatc attcattggt	420
	tgtttggttg cctttgccaa catgggagtc caagggtt	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 2 623 454 T3

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
65

<210> 73
<211> 175
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Restos C-terminales 281-455 de AnD9DS

10 <400> 73

Ser Ile Trp Ala Trp Lys Gln Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Leu Lys Lys
1 5 10 15

Phe Arg Ala Asn Glu Ile Glu Lys Gly Arg Val Gln Gln Leu Gln Lys
20 25 30

Lys Leu Asp Arg Lys Arg Ala Thr Leu Asp Trp Gly Thr Pro Leu Asp
35 40 45

Gln Leu Pro Val Met Glu Trp Asp Asp Tyr Val Glu Gln Ala Lys Asn
50 55 60

Gly Arg Gly Leu Val Ala Ile Ala Gly Val Val His Asp Val Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ile Lys Asp His Pro Gly Gly Lys Ala Met Ile Ser Ser Gly Ile
85 90 95

Gly Lys Asp Ala Thr Ala Met Phe Asn Gly Gly Val Tyr Tyr His Ser
100 105 110

Asn Ala Ala His Asn Leu Leu Ser Thr Met Arg Val Gly Val Ile Arg
115 120 125

Gly Gly Cys Glu Val Glu Ile Trp Lys Arg Ala Gln Lys Glu Asn Val
130 135 140

Glu Tyr Val Arg Asp Gly Ser Gly Gln Arg Val Ile Arg Ala Gly Glu
145 150 155 160

Gln Pro Thr Lys Ile Pro Glu Pro Ile Pro Thr Ala Asp Ala Ala
15 165 170 175

<210> 74
<211> 14103
<212> ADN
20 <213> Artificial

<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
tacttggttac ttttaatttct cataatcttt ggttgaaatt atcacgcttc cgcacacgat      240
atccctacaa atttattatt tggttaacat tttcaaaccg cataaaattt tatgaagtcc      300
cgtctatctt taatgtagtc taacattttc atattgaaat atataattta cttaatttta      360
gcgttggttag aaagcataat gattttattct tattcttctt catataaatg ttttaataac      420
aatataaaca aattctttac cttaagaagg atttcccatt ttatatttta aaaatatatt      480
tatcaaatat ttttcaacca cgtaaatctc ataataataa gttgtttcaa aagtaataaa      540
atttaactcc ataatttttt tattcgactg atcttaaagc aacaccagc gacacaacta      600
gccatttttt tctttgaata aaaaaatcca attatcattg ttttttttt atacaatgaa      660
aatttcacca aacaatgatt tgtggtattt ctgaagcaag tcatgttatg caaaattcta      720
taattcccat ttgacactac ggaagtaact gaagatctgc ttttacatgc gagacacatc      780
ttctaaagta attttaataa tagttactat attcaagatt tcatatatca aataactcaat      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 gccgcgtcca     1260
tgtatgtcta aatgccatgc aaagcaacac gtgcttaaca tgcactttaa atggctcacc     1320
catctcaacc cacacacaaa cacattgcct ttttcttcat catcaccaca accacctgta     1380
tatattcatt ctcttcgcc acctcaattt cttcacttca acacacgtca acctgcatat     1440
gcgtgtcatc ccatgcccaa atctccatgc atgttccaac caccttctct cttatataat     1500
acctataaat acctctaata tcaactcatt ctttcatcat ccatccatcc agagtactac     1560
tactctacta ctataatacc ccaaccaaac tcatattcaa tactactcta ggatccaaca     1620

```

ES 2 623 454 T3

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

ES 2 623 454 T3

aattattgaag gattttaa	aatataaat aataaataac	atataatata tgtatataaa	3720
tttattataa tataacattt	atctataaaa aagtaa	at tgcataaat ctatacaatc	3780
gttttagcctt gctggaacga	atctcaatta tttaaacgag	agtaaacata tttgactttt	3840
tggttattta acaaattatt	atttaacact atatgaaatt	tttttttttt atcagcaaag	3900
aataaaatta aattaagaag	gacaatggtg tcccaatcct	tataacaacca acttccacaa	3960
gaaagtcaag tcagagacaa	caaaaaaaca agcaaaggaa	at ttttttaat ttgagttgtc	4020
ttgtttgctg cataatttat	gcagtaaaac actacacata	acccttttag cagtagagca	4080
atggttgacc gtgtgcttag	cttcttttat tttatttttt	tatcagcaaa gaataaataa	4140
aataaaatga gacacttcag	ggatgtttca acccttatac	aaaaccccaa aaacaagttt	4200
cctagcacc cccaacgaa	ttcgcggccg cttaattaag	atgagtgata ctcaggactc	4260
aggactcact ctgctgatca	ctagtgttag cctcgaggtc	gaccagcttt cttgtacaaa	4320
gtggttgccg ccgcttaatt	aaatttaa	at tcaattaatg caatcttgat	4380
gaaggtaatg gcgtaaaaga	aaaaatgtat gttattgtat	tgatctttca tgatgttgaa	4440
gcgtgccata atatgatgat	gtataattaa aatattaact	gtcgcatttt attgaaatgg	4500
cactgttatt tcaaccatat	ctttgattct gttacatgac	acgactgcaa gaagtaaata	4560
atagacgccg ttgttaaaga	attgctatca tatgtgccta	actagaggga atttgagcgt	4620
cagaccta	at caaatattac aaaa	tatctgtcgc cagcaatggt	4680
cagacaaatg gcgtaaat	gcgga	aaaaa cctccccgag	4740
tattgctgat ttagtcagcc	ttatttgact taagggtgcc	ctcgttagtg acaaattgct	4800
ttcaaggaga cagccatgcc	ccacactttg ttgaaaaaca	aattgccttt ggggagacgg	4860
taaagccagt tgctcttcaa	taaggaatgt cgaggaggca	atgtaaccgc ctctggtagt	4920
acacttctct aatccaaaa	tcaatttgta ttcaagatac	cgcaaaaaac ttatggttta	4980
aaccttcgag gactagtcca	gaaggtaatt atccaagatg	tagcatcaag aatccaatgt	5040
ttacgggaaa aactatggaa	gtattatgta agctcagcaa	gaagcagatc aatatgcggc	5100
acatatgcaa cctatgttca	aaaatgaaga atgtacagat	acaagatcct atactgccag	5160
aatacgaaga agaatacgt	gaaattgaaa aagaagaacc	aggcgaagaa aagaatcttg	5220
aagacgtaag cactgacgac	aacaatgaaa agaagaagat	aaggtcggtg attgtgaaag	5280
agacatagag gacacatgta	agggtgaaaa tgtaaggcg	gaaagtaacc ttatcacaaa	5340
ggaatcttat cccccactac	ttatcctttt atatttttcc	gtgtcatttt tgcccttgag	5400
ttttcctata taaggaa	acca agttcggcat	ttgtgaaaac aagaaaaaat	5460
ctattttctt tgaagtactg	aggatacaac ttcagagaaa	tttgtagtt tgtaggtacc	5520
agatctggat cccaaaccat	gtctccggag aggagaccag	ttgagattag gccagctaca	5580
gcagctgata tggccgcggt	ttgtgatatc gttaaccatt	acattgagac gtctacagtg	5640
aacttttagga cagagccaca	aacaccacaa gagtggattg	atgatctaga gaggttgcaa	5700

ES 2 623 454 T3

gatagataacc cttggttggt tgctgagggt gaggggtgtt tggctggtat tgcttacgct	5760
gggccctgga aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt ttacgtgtca	5820
cataggcatc aaagggttggg cctaggatct acattgtaca cacatttgct taagtctatg	5880
gaggcgcaag gttttaagtc tgtggttgct gttataggcc ttccaaacga tccatctggt	5940
agggtgcatg aggccttggg atacacagcc cggggtacat tgcgcgcagc tggatacaag	6000
catggtggat ggcattgatg tggtttttgg caaagggtt ttgagttgcc agtcctcca	6060
aggccagtta ggccagttac ccaaactctga gtagttagct taatcaccta gagctcgatc	6120
ggcggcaata gcttcttagc gccatcccgg gttgatccta tctgtgttga aatagttgcg	6180
gtgggcaagg ctctctttca gaaagacagg cggccaaagg aaccaagggt gaggtgggct	6240
atggctctca gttccttctg gaagcgcttg gtctaagggt cagagggtgt agcgggatga	6300
agcaaaagtg tccgattgta acaagatatg ttgatcctac gtaaggatat taaagtatgt	6360
attcatcact aatataatca gtgtattcca atatgtacta cgatttccaa tgtctttatt	6420
gtcgcggtat gtaatcgcg tcacaaaata atccccgtg actttctttt aatccaggat	6480
gaaataatat gttattataa tttttgcgat ttggtccgtt ataggaattg aagtgtgctt	6540
gaggtcggtc gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa ataaaaattt	6600
atggtattca atttaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag aaatatagtt	6660
taaatattta ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt	6720
attgatgcaa gtttaaattc agaaatattt caataactga ttatatacgc tggtagattg	6780
ccgtagatga aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac ataggaattc gtttaaacga	6840
tctgcgtcta attttcggtc caacttgac aggaaagacg tcgaccgagg tagctcttgc	6900
ccagcagact gggcttccag tcctttcgct cgatcgggtc caatgttgct ctcagctgtg	6960
aaccggaagc ggacgaccaa cagtgaaga actgaaagga acgagccgtc tataccttga	7020
tgatcggcct ctggtgaagg gtatcatcgc agccaagcaa gctcatgaaa ggctgatggg	7080
ggagggtgat aattatgagg cccacggcgg gcttattctt tagggaggat ctatctcggt	7140
gctcaagtgc atggcgcaaa gcagttattg gagtgcggtt ttcggttggc atattattcg	7200
ccacgagtta gcagacgaag agaccttcat gaacgtggcc aaggccagag ttaagcagat	7260
gttacgccct gctgcaggcc tttctattat ccaatagttg gttgatcttt ggaaagagcc	7320
tcggctgagg ccatactga aagagatcga tggatatcga tatgccatgt tgtttgctag	7380
ccagaaccag atcacatccg atatgctatt gcagcttgac gcagatatgg aggataagtt	7440
gattcatggg atcgcctcag agtagctcat ccatgcacgc cgacaagaac agaaattccg	7500
tcgagttaac gcagccgctt acgacggatt cgaaggatc ccattcggaa tgtattagtt	7560
tgcaccagct ccgcgtcaca cctgtcttca tttgaataag atgttagcaa ttgtttttag	7620
ctttgtcttg ttgtggcagg gcggcaagtg cttcagacat cattctgttt tcaaatttta	7680
tgctggagaa cagcttctta attccttttg aaataataga ctgcgtctta aaattcagat	7740

ES 2 623 454 T3

gtctggatat	agatatgatt	gtaaaataac	ctattttaagt	gtcattttaga	acataagttt	7800
tatgaatggt	cttccatttt	cgtcatcgaa	cgaataagag	taaatacacc	ttttttaaca	7860
ttacaataaa	gttctttatac	gttgttttata	caccgggaat	catttccatt	attttcgcgc	7920
aaaagtcacg	gatattcgtg	aaagcgacat	aaactgcgaa	atttgcgggg	agtgtcttga	7980
gtttgcctcg	aggctagcgc	atgcacatag	acacacacat	catctcattg	atgcttggtg	8040
ataattgtca	ttagattggt	tttatgcata	gatgcactcg	aaatcagcca	atttttagaca	8100
agtatcaaac	ggatgtgact	tcagtacatt	aaaaacgtcc	gcaatgtggt	attaagttgt	8160
ctaagcgtca	atttgattta	caattgaata	tatcctgccc	cagccagcca	acagctcgat	8220
ttacaattga	atatatcctg	ccggccggcc	cacgcgtgtc	gaggaattct	gatctggccc	8280
ccatttgga	gtgaatgtag	acacgtcgaa	ataaagattt	ccgaattaga	ataatttggt	8340
tattgctttc	gcctataaat	acgacggatc	gtaatttgtc	gttttatcaa	aatgtacttt	8400
cattttataa	taacgctgcg	gacatctaca	tttttgaatt	gaaaaaaaaat	tggttaattac	8460
tctttctttt	tctccatatt	gaccatcata	ctcattgctg	atccatgtag	atttcccggg	8520
catgaagcca	tttacaattg	aatatatacct	gccgccgctg	ccgctttgca	cccggtgagg	8580
cttgcattgt	ggtttctacg	cagaactgag	ccggttaggc	agataatttc	cattgagaac	8640
tgagccatgt	gcaccttccc	ccaacacgg	tgagcgacgg	ggcaacggag	tgatccacat	8700
gggactttta	aacatcatcc	gtcggatggc	gttgcgagag	aagcagtcga	tccgtgagat	8760
cagccgacgc	accgggcagg	cgcgcaacac	gatcgcaaag	tatttgaacg	caggtacaat	8820
cgagccgacg	ttcacgcgga	acgaccaagc	aagcttggct	gccatttttg	gggtgaggcc	8880
gttcgcggcc	gaggggcgca	gcccctgggg	ggatgggagg	cccgcgttag	cgggccggga	8940
gggttcgaga	agggggggca	cccccttcg	gcgtgcgcgg	tcacgcgcac	agggcgacgc	9000
cctgggttaa	aacaagggtt	ataaatattg	gtttaaaagc	aggttaaaag	acaggttagc	9060
gggtggccga	aaacgggcgg	aaacccttgc	aaatgctgga	ttttctgcct	gtggacagcc	9120
cctcaaatgt	caatagggtg	gcccctcatc	tgtcagcact	ctgcccctca	agtgtcaagg	9180
atcgcgcccc	tcatctgtca	gtagtcgcgc	ccctcaagtg	tcaataaccg	agggcactta	9240
tccccaggct	tgtccacatc	atctgtggga	aactcgcgta	aaatcaggcg	ttttcgccga	9300
tttgcgaggg	tgccagctc	cacgtcgccg	gccgaaatcg	agcctgcccc	tcatctgtca	9360
acgccgcgcc	gggtgagtcg	gcccctcaag	tgtcaacgtc	cgcccctcat	ctgtcagtga	9420
gggccaagtt	ttccgcgagg	tatccacaac	gccggcggcc	gcgggtgtct	gcacacggct	9480
tcgacggcgt	ttctggcgcg	tttgcagggc	catagacggc	cgccagccca	gcggcgaggg	9540
caaccagccc	ggtgagcgtc	ggaaagggtc	gacggatctt	ttccgctgca	taaccctgct	9600
tcgggggtcat	tatagcgatt	ttttcggtat	atccatcctt	tttcgcacga	tatacaggat	9660
tttgccaaag	ggttcgtgta	gactttcctt	ggtgtatcca	acggcgctcag	ccgggcagga	9720
taggtgaagt	agggccaccc	gcgagcgggt	gttccttctt	cactgtccct	tattcgcacc	9780

ES 2 623 454 T3

tggcggtgct	caacgggaat	cctgctctgc	gaggctggcc	ggctaccgcc	ggcgtaacag	9840
atgagggcaa	gcggatggct	gatgaaacca	agccaaccag	gaagggcagc	ccacctatca	9900
aggtgtactg	ccttcagac	gaacgaagag	cgattgagga	aaagggcgcg	gcggccggca	9960
tgagcctgtc	ggcctacctg	ctggccgtcg	gccagggcta	caaaatcacg	ggcgtcgtgg	10020
actatgagca	cgctccgcgag	ctggcccgc	tcaatggcga	cctggggccg	ctgggcggcc	10080
tgctgaaact	ctggctcacc	gacgaccgc	gcacggcgcg	gttcggtgat	gccacgatcc	10140
tcgccctgct	ggcgaagatc	gaagagaagc	aggacgagct	tggcaaggtc	atgatggcg	10200
tggtcgcccc	gagggcagag	ccatgacttt	tttagccgct	aaaacggccg	gggggtgcgc	10260
gtgattgcc	agcacgtccc	catgcgtcc	atcaagaaga	gcgacttcgc	ggagctggta	10320
ttcgtgcagg	gcaagattcg	gaataccaag	tacgagaagg	acggccagac	ggtctacggg	10380
accgacttca	ttgccgataa	ggtggattat	ctggacacca	aggcaccagg	cgggtcaaat	10440
caggaataag	ggcacattgc	cccggcgtga	gtcggggcaa	tcccgcaagg	aggggtgaatg	10500
aatcggacgt	ttgaccggaa	ggcatacagg	caagaactga	tcgacgcggg	gttttcgcc	10560
gaggatgcc	aaaccatcgc	aagccgcacc	gtcatgcgtg	cgcgcgcga	aaccttcag	10620
tccgtcggct	cgatggcca	gcaagctacg	gccaagatcg	agcgcgacag	cgtgcaactg	10680
gctccccctg	ccctgcccgc	gccatcggcc	gccgtggagc	gttcgcgtcg	tctcgaaacag	10740
gaggcggcag	gtttggcgaa	gtcgatgacc	atcgacacgc	gaggaactat	gacgaccaag	10800
aagcgaaaa	ccgccggcga	ggacctggca	aaacaggtca	gcgaggccaa	gcaggccgcg	10860
ttgctgaaac	acacgaagca	gcagatcaag	gaaatgcagc	tttccttggt	cgatattgcg	10920
ccgtggccgg	acacgatgcg	agcgatgcca	aacgacacgc	cccgtctgc	cctgttcacc	10980
acgcgcaaca	agaaaatccc	gcgcgaggcg	ctgcaaaaca	aggtcatttt	ccacgtcaac	11040
aaggacgtga	agatcaccta	caccggcgtc	gagctgcggg	ccgacgatga	cgaactgggtg	11100
tggcagcagg	tgttgagta	cggaagcgc	acccctatcg	gcgagccgat	caccttcacg	11160
ttctacgagc	tttgccagga	cctgggctgg	tcgatcaatg	gccggtatta	cacgaaggcc	11220
gaggaatgcc	tgtcgcgcct	acaggcgacg	gcgatgggct	tcacgtccga	ccgcgttggg	11280
cacctggaat	cggtgtcgtc	gctgcaccgc	ttccgcgtcc	tggaccgtgg	caagaaaacg	11340
tcccgttgcc	aggtcctgat	cgacgaggaa	atcgctcgtc	tgtttgctgg	cgaccactac	11400
acgaaattca	tatgggagaa	gtaccgcaag	ctgtcgccga	cggcccgacg	gatgttcgac	11460
tatttcagct	cgcaccggga	gccgtaccgc	ctcaagctgg	aaaccttcgc	cctcatgtgc	11520
ggatcggatt	ccaccgcgt	gaagaagtgg	gcgagcagg	tcggcgaagc	ctgcgaagag	11580
ttgcgaggca	gcggcctggt	ggaacacgcc	tgggtcaatg	atgacctggt	gcattgcaaa	11640
cgctagggcc	ttgtggggtc	agttccggct	gggggttcag	cagccagcgc	tttactggca	11700
tttcaggaac	aagcgggcac	tgctcgacgc	acttgcttcg	ctcagtatcg	ctcgggacgc	11760
acggcgcgct	ctacgaactg	ccgataaaca	gaggattaaa	attgacaatt	gtgattaagg	11820

ES 2 623 454 T3

```

ctcagattcg acggccttga gcgccgacg tgcaggattt ccgcgagatc cgattgtcgg 11880
ccctgaagaa agctccagag atgttcgggt ccgtttacga gcacgaggag aaaaagccca 11940
tggaggcggt cgctgaacgg ttgcgagatg ccgtggcatt cggcgccctac atcgacggcg 12000
agatcattgg gctgtcggtc ttcaaacagg aggacggccc caaggacgct cacaaggcgc 12060
atctgtccgg cgttttcgtg gagcccgaac agcgaggccg aggggtcgcc ggtatgctgc 12120
tgcgggcggt gccggcggtt ttattgctcg tgatgatcgt ccgacagatt ccaacgggaa 12180
tctggtggat gcgcatcttc atctcggcg cacttaatat ttcgctattc tggagcttgt 12240
tggttatttc ggtctaccgc ctgcccggcg gggctcgccg gacggtaggc gctgtgcagc 12300
cgctgatggc cgtgttcacg tctgccgctc tgctaggtag cccgatacga ttgatggcgg 12360
tcctgggggc tatttgcgga actcgggcg tggcgctgtt ggtgttgaca ccaaagcag 12420
cgctagatcc tgcggcgctc gcagcgggccc tggcgggggc ggtttccatg gcgttcggaa 12480
ccgtgctgac ccgcaagtgg caacctcccg tgcctctgct cacctttacc gcctggcaac 12540
tggcgccggg aggaacttctg ctggtccag tagctttagt gtttgatccg ccaatcccga 12600
tgcctacagg aaccaatgtt ctgcgcctgg cgtggctcgg cctgatcgga gcgggtttaa 12660
cctacttctt ttggttcggg gggatctcgc gactcgaacc tacagttgtt tccttactgg 12720
gctttctcag ccccgagcg cttagtggga atttgtaccc cttatcgaac cgggagcaca 12780
ggatgacgcc taacaattca ttcaagccga caccgcttcg cggcgcggt taattcagga 12840
gttaaacatc atgaggggaag cggatgacgc cgaagtatcg actcaactat cagaggtagt 12900
tggcgctacg gagcgccatc tcgaaccgac gttgctggcc gtacatttgt acggctccgc 12960
agtggatggc ggcctgaagc cacacagtga tattgatttg ctggttacgg tgaccgtaag 13020
gcttgatgaa acaacgcggc gagctttgat caacgacctt ttggaaactt cggcttcccc 13080
tggagagagc gagattctcc gcgctgtaga agtcaccatt gttgtgcagc acgacatcat 13140
tccgtggcgt tatccagcta agcgcgaact gcaatttggg gaatggcagc gcaatgacat 13200
tcttgacggt atcttcgagc cagccacgat cgacattgat ctggctatct tgctgacaaa 13260
agcaagagaa catagcgttg ccttggtagg tccagcggcg gaggaactct ttgatccggt 13320
tcctgaacag gatctatttg aggcgctaaa tgaaacctta acgctatgga actcgccgcc 13380
cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt gcttacgttg tcccgcattt ggtacagcgc 13440
agtaaccggc aaaatcgcg cgaaggatgt cgctgccgac tgggcaatgg agcgctgcc 13500
ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc taggcaggct tatcttgac agaagatcg 13560
cttgccctcg cgcgagatc agttggaaga atttgttcac tacgtgaaag gcgagatcac 13620
caaggtagtc ggcaaataat gtctaacaat tcgttcaagc cgacgccgct tcgcgcgcg 13680
gcttaactca agcggttagag agctggggaa gactatgcgc gatctgttga aggtggttct 13740
aagcctcgtc ttgcgatggc atttcgatcc attccattc cgcgctcaag atggcttccc 13800
ctcggcagtt catcagggct aatcaatct agccgacttg tccggtgaaa tgggctgcac 13860

tccaacagaa acaatcaaac aaacatacac agcgacttat tcacacgagc tcaaattaca 13920
acggtatata tcctgccagt cagcatcatc acacaaaag ttaggcccga atagtttgaa 13980
attagaaagc tcgcaattga ggtctacagg ccaaattcgc tcttagccgt acaatattac 14040
tcaccggatc ctaaccggtt taattaaggc gcgccatgcc cgggcaagcg gccgcacaag 14100
ttt 14103

```

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

5 <220>
<223> Plásmido pDAB110112

<400> 75

```

cttgtacaaa gtggttgcgg ccgcttaatt aaatttaaatt tcaattaatg caatcttgat      60
tttcaacaac gaaggtaatg gcgtaaaaga aaaaatgtat gttattgtat tgatctttca     120
tgatgttgaa gcgtgccata atatgatgat gtataattaa aatattaact gtcgcatttt     180
attgaaatgg cactgttatt tcaaccatat ctttgattct gttacatgac acgactgcaa     240
gaagtaaata atagacgccg ttgttaaaga attgctatca tatgtgccta actagagggga     300
atgtgagcgt cagacctaatt caaatattac aaaaatcttc actctgtcgc cagcaatggt     360
gtaatcagcg cagacaaatg gcgtaaagat cgcggaaaaa cctccccgag tggcatgata     420
gctgcctctg tattgtctgat ttagtcagcc ttatttgact taagggtgcc 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 aaaaatgaaga atgtacagat acaagatcct     840
atactgccag aatacgaaga agaatacgta gaaattgaaa aagaagaacc aggcgaagaa     900
aagaatcttg aagacgtaag cactgacgac aacaatgaaa agaagaagat aaggtcgggtg     960
attgtgaaag agacatagag gacacatgta aggtggaaaa tgtaaggggc gaaagtaacc    1020
ttatcacaaa ggaatcttat cccccactac ttatcctttt atatttttcc gtgtcatttt    1080
tgcccttgag ttttcctata taaggaacca agttcggcat ttgtgaaaac aagaaaaaat    1140
ttggtgtaag ctattttctt tgaagtactg aggatacaac ttcagagaaa tttgtaagtt    1200
tgtaggtacc agatctggat cccaaacat gtctccggag aggagaccag ttgagattag    1260
gccagctaca gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gttaaccatt acattgagac    1320
gtctacagtg aacttttaga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg atgatctaga    1380
gaggttgcaa gatagatacc cttggttggt tgctgagggt gaggggtgtg tggctgggtat    1440

```

10

ES 2 623 454 T3

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

ES 2 623 454 T3

acataagttt tatgaatggt cttccatttt cgtcatcgaa cgaataagag taaatacacc	3540
ttttttaaca ttacaaataa gttcttatac gttgtttata caccgggaat catttccatt	3600
attttcgcgc 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 atatatcctg ccggccggcc cagcgtgtc gaggaattct	3960
gatctggccc ccatttggtg gtgaatgtag acacgtcgaa ataaagattt ccgaattaga	4020
ataatttggt tattgcttcc gcctataaat acgacggatc gtaatttgct gttttatcaa	4080
aatgtacttt cattttataa taacgctgct gacatctaca tttttgaatt gaaaaaaaaat	4140
tggttaattac tctttctttt tctccatatt gaccatcata ctcatgtctg atccatgtag	4200
atttcccgga catgaagcca tttaacaattg aatatatcct gccgccgctg ccgctttgca	4260
cccggtagag 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 ggggttcgaga agggggggca ccccccttcg gcgtgcgcgg tcacgcgcac	4680
agggcgcagc cctgggttaa aacaagggtt ataaatattg gtttaaaagc aggttaaaag	4740
acagggttagc ggtggccgaa aaacgggcgg aaacccttgc aaatgctgga ttttctgcct	4800
gtggacagcc cctcaaatgt caatagggtc gcccctcatc tgtcagcact ctgcccctca	4860
agtgtcaagg atcgcgcccc tcatctgtca gtagtcgcgc ccctcaagtg tcaataccgc	4920
agggcactta tccccaggct tgtccacatc atctgtggga aactcgcgta aaatcaggcg	4980
ttttcgccga tttgcgaggc tggccagctc cacgtcgccg gccgaaatcg agcctgcccc	5040
tcatctgtca acgcccgcgc gggtaggtcg gcccctcaag tgtcaacgct cgcccctcat	5100
ctgtcagtga gggccaagtt ttccgcgagg tatccacaac gccggcgggc gcggtgtctc	5160
gcacacggct tcgacggcgt ttctggcgcg tttgcagggc catagacggc cgccagccca	5220
gcggcgaggg caaccagccc ggtgagcgtc ggaaagggtc gacggatctt ttccgtgca	5280
taaccctgct tcgggggtcat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga	5340
tatacaggat tttgccaaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag	5400
ccgggcagga taggtgaagt agggccaccc gcgagcgggt gttccttctt cactgtccct	5460
tattcgcacc tggcgggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggtggcc ggctaccgcc	5520

ES 2 623 454 T3

ggcgtaacag atgaggggcaa gcggtatggct gatgaaacca agccaaccag gaagggcagc 5580
 ccacctatca aggtgtactg ccttccagac gaacgaagag cgattgagga aaaggcggcg 5640
 gcggccggca tgagcctgtc ggcctacctg ctggccgtcg gccagggcta caaatcacg 5700
 ggcgtcgtgg actatgagca cgtccgcgag ctggcccga tcaatggcga cctgggccgc 5760
 ctgggcggcc tgctgaaact ctggctcacc gacgaccgc gcacggcgcg gtccgtgat 5820
 gccacgatcc tcgccctgct ggcgaagatc gaagagaagc aggacgagct tggcaaggtc 5880
 atgatggggc tggctccccc gagggcagag ccatgacttt tttagccgct aaaacggccg 5940
 ggggggtgcg gtgattgcc aacacgtccc catgcgctcc atcaagaaga gcgacttcgc 6000
 ggagctggta ttcgtgcagg gcaagattcg gaataccaag tacgagaagg acggccagac 6060
 ggtctacggg accgacttca ttgccgataa ggtggattat ctggacacca aggcaccagg 6120
 cgggtcaaat caggaataag ggcacattgc cccggcgtga gtcggggcaa tcccgcgaag 6180
 aggggtgaatg aatcggacgt ttgaccggaa ggcatacagg caagaactga tcgacgcggg 6240
 gttttccgcc gaggatgccg aaaccatcgc aagccgcacc gtcatgcgtg cgtcccgca 6300
 aaccttcag tccgtcggct cgatgggtcca gcaagctacg gccaaagatcg agcgcgacag 6360
 cgtgcaactg gctccccctg ccctgccgc gccatcggcc gccgtggagc gtccgcgtcg 6420
 tctcgaacag gaggcggcag gtttggcgaa gtcgatgacc atcgacacgc gaggaactat 6480
 gacgaccaag aagcgaaaaa ccgccggcga ggacctggca aaacagggtca gcgaggccaa 6540
 gcaggccgcg ttgctgaaac acacgaagca gcagatcaag gaaatgcagc tttccttgtt 6600
 cgatattgct ccgtggccgg acacgatgct agcgatgcca aacgacacgg cccgctctgc 6660
 cctgttcacc acgcgcaaca agaaaatccc gcgcgaggcg ctgcaaaaca aggtcatttt 6720
 ccacgtcaac aaggacgtga agatcaccta caccggcgtc gagctgcggg ccgacgatga 6780
 cgaactgggt tggcagcagg tgttgagta cgcgaagcgc acccctatcg gcgagccgat 6840
 caccttcacg ttctacgagc tttgccagga cctgggctgg tcgatcaatg gccgggtatta 6900
 cacgaaggcc gaggaatgcc tgctcgcct acaggcgacg gcgatgggct tcacgtccga 6960
 ccgcgttggg cacctggaat cgggtgcgtc gctgcaccgc ttccgcgtcc tggaccgtgg 7020
 caagaaaacg tcccgttgcc aggtcctgat cgacgaggaa atcgtcgtgc tgtttgcgtg 7080
 cgaccactac acgaaattca tatgggagaa gtaccgcaag ctgtcgccga cggcccgcg 7140
 gatgttcgac tatttcagct cgcaccggga gccgtacccg ctcaagctgg aaaccttcg 7200
 cctcatgtgc ggatcggatt ccacccgcgt gaagaagtgg cgcgagcagg tcggcgaagc 7260
 ctgcaagag ttgagaggca gcggcctggg ggaacacgcc tgggtcaatg atgacctgg 7320
 gcattgcaaa cgctagggcc ttgtggggc agttccggct gggggttcag cagccagcgc 7380
 tttactggca tttcaggaa aagcgggcac tgctcgacgc acttgcttcg ctacgtatcg 7440
 ctccggacgc acggcgcgct ctacgaactg ccgataaaca gaggattaaa attgacaatt 7500
 gtgattaagg ctacagattcg acggcttggg cgggccgcg tgacggattt ccgcgagatc 7560

ES 2 623 454 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	aggggtcgcc	7800
ggtagtctgc	tgcgggcggt	gccggcgggg	ttattgctcg	tgatgatcgt	ccgacagatt	7860
ccaacgggaa	tctggtggat	gcgcatcttc	atcctcggcg	cacttaatat	ttcgctattc	7920
tggagcttgt	tgtttatttc	ggtctaccgc	ctgccggggc	gggtcgcggc	gacggtaggc	7980
gctgtgcagc	cgctgatggg	cggtttcatc	tctgccgctc	tgctaggtag	cccgatacga	8040
ttgatggcgg	tcctgggggg	tatttgcgga	actgcggggc	tggcgtgtgt	ggtgttgaca	8100
ccaaacgcag	cgctagatcc	tgctggcgctc	gcagcggggc	tggcgggggc	ggtttccatg	8160
gcgttcggaa	ccgtgctgac	ccgcaagtgg	caacctcccg	tgctcttgct	cacctttacc	8220
gcctggcaac	tggcgggcgg	aggacttctg	ctcgttccag	tagctttagt	gtttgatccg	8280
ccaatcccg	tgctacagc	aaccaatggt	ctcggcctgg	cgtaggctcg	cctgatcgga	8340
gcgggtttaa	cctacttcct	ttggttcggg	gggatctcgc	gactcgaacc	tacagtgtgt	8400
tccttactgg	gctttctcag	ccccgagcg	cttagtggga	atttgtacct	cttatcgaac	8460
cgggagcaca	ggatgacgcc	taacaattca	ttcaagccga	caccgcttcg	cggcgcggct	8520
taattcagga	gttaaaccatc	atgagggaag	cgggtgatcg	cgaagtatcg	actcaactat	8580
cagaggtagt	tggcgtcatc	gagcgccatc	tcgaaccgac	gttgctggcc	gtacatttgt	8640
acggctccgc	agtggatggc	ggcctgaagc	cacacagtga	tattgatttg	ctggttacgg	8700
tgaccgtaag	gcttgatgaa	acaacgcggc	gagctttgat	caacgacctt	ttggaaactt	8760
cggcttcccc	tggagagagc	gagattctcc	gcgctgtaga	agtcaccatt	gttggtgcacg	8820
acgacatcat	tccgtggcgt	tatccagcta	agcgcgaact	gcaatttgga	gaatggcagc	8880
gcaatgacat	tcttgaggt	atcttcgagc	cagccacgat	cgacattgat	ctggctatct	8940
tgctgacaaa	agcaagagaa	catagcggtg	ccttggtagg	tccagcggcg	gaggaaactct	9000
ttgatccggt	tcctgaacag	gatctatttg	aggcgctaaa	tgaaacctta	acgctatgga	9060
actcgcgcc	cgactgggct	ggcgtgagc	gaaatgtagt	gcttacgttg	tcccgcatct	9120
ggtacagcgc	agtaaccggc	aaaatcgcg	cgaaggatgt	cgctgccgac	tgggcaatgg	9180
agcgcttgc	ggcccagtat	cagcccgctc	tacttgaagc	taggcaggct	tatcttggac	9240
aagaagatcg	cttggcctcg	cgcgcatc	agttggaaga	atttggtcac	tacgtgaaag	9300
gcgagatcac	caaggtagtc	ggcaataat	gtctaacaat	tcgttcaagc	cgacgccgct	9360
tcgcggcgcg	gcttaactca	agcgttagag	agctggggaa	gactatgcgc	gatctgttga	9420
aggtggttct	aagcctcgtc	ttgcgatggc	atttcgatcc	attccattc	cgcgctcaag	9480
atggcttccc	ctcggcaggt	catcagggtc	aaatcaatct	agccgacttg	tccggtgaaa	9540
tgggctgcac	tccaacagaa	acaatcaaac	aaacatacac	agcgacttat	tcacacgagc	9600

ES 2 623 454 T3

tcaaattaca	acggtatata	tctgccagt	cagcatcatc	acacccaaaag	ttaggcccca	9660
atagtttgaa	attagaaaagc	tcgcaattga	ggtctacagg	ccaaattcgc	tcttagccgt	9720
acaatattac	tcaccggatc	ctaaccggtt	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	atttggttaa	cattttcaaa	ccgcataaaa	10080
ttttatgaag	tcccgtctat	ctttaatgta	gtctaacatt	ttcatattga	aatatataat	10140
ttacttaatt	ttagcggttg	tagaaagcat	aatgatttat	tcttattctt	cttcatataa	10200
atgtttaata	tacaatataa	acaaattctt	taccttaaga	aggatttccc	attttatatt	10260
ttaaaaatat	atttatcaaa	tatttttcaa	ccacgtaaat	ctcataataa	taagttggtt	10320
caaaaagtaat	aaaatttaac	tccataatct	ttttattcga	ctgatcttaa	agcaacaccc	10380
agtgacacaa	ctagccattt	ttttctttga	ataaaaaaat	ccaattatca	ttgtattttt	10440
tttatacaat	gaaaatttca	ccaaacaatg	atttgtggta	tttctgaagc	aagtcattgt	10500
atgcaaaaatt	ctataattcc	catttgacac	tacggaagta	actgaagatc	tgcttttaca	10560
tgcgagacac	atcttctaaa	gtaattttta	taatagttac	tatattcaag	atttcatata	10620
tcaaatactc	aatattactt	ctaaaaaatt	aattagatat	aattaaaata	ttactttttt	10680
aattttaagt	ttaattgttg	aatttgtagc	tattgattta	ttattctact	atgtttaaat	10740
tgttttatag	atagttttaa	gtaaatataa	gtaatgtagt	agagtgttag	agtgttaccc	10800
taaaccataa	actataagat	ttatgggtga	ctaattttca	tatatttctt	attgctttta	10860
ccttttcttg	gtatgtaagt	ccgtaactgg	aattactgtg	ggttgccatg	acactctgtg	10920
gtcttttgg	tcattgcatg	atcttgcgca	agaaaaagac	aaagaacaaa	gaaaaaagac	10980
aaaacagaga	gacaaaacgc	aatcacacaa	ccaactcaaa	ttagtcaactg	gctgatcaag	11040
atgcgccgct	ccatgtatgt	ctaaatgcc	tgcaaaagcaa	cacgtgctta	acatgcactt	11100
taaatggctc	acccatctca	acccacacac	aaacacattg	cctttttctt	catcatcacc	11160
acaaccacct	gtatatattc	attctcttcc	gccacctcaa	tttcttccact	tcaacacacg	11220
tcaacctgca	tatgcgtgtc	atcccatgcc	caaattctcca	tgcatgttcc	aaccaccttc	11280
tctcttatat	aataacctata	aataacctta	atatcactca	cttctttcat	catccatcca	11340
tccagagtac	tactactcta	ctactataat	accccaaccc	aactcatatt	caatactact	11400
ctaggatcca	acaatggctc	ccaacatttc	tgaggatgtc	aatgggtgtc	tttttgagtc	11460
agatgcggca	acccctgatt	tggtcttttc	cacaccacct	gtgcaaaaag	ctgacaacag	11520
acccaagcaa	cttgtgtgga	ggaacatttt	gcttttcgct	tacttgcacc	tcgcagctct	11580
ctacggaggc	tatttgtttc	tcttcagtgc	aaaatggcag	accgacattt	tcgcttacat	11640

ES 2 623 454 T3

```

tctttatgtc atctctggac tggggataac tgctggggca catagactct gggctcaca 11700
gtcatacaaa gccaaagtggc cactcagagt tatactgggtc 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 atactccgtt ttcagaagaa gtactatctg atcctcatgc ctctggcctg 12000
ttttgtgatg ccaaccgta tcccggttta cttttgggga gaaacttgga caaatgcctt 12060
cttcgtggca gccatgttcc gttatgcttt catcctgaat gttacctggt tggatgaactc 12120
tgccgcacac aagtggggag acaaaccta tgacaagtcc atcaagcctt ccgaaaacct 12180
ttcagttgctg atgtttgctt tgggagaagg atttcacaat taccatcaca cttttccgtg 12240
ggactacaag acagcagagc ttggaaacaa caagttgaac ttcacaacaa cgttcatcaa 12300
tttctttgctg aaaatcggtt gggcctatga tttgaagact gtgagtgatg acattgtcaa 12360
gaacagggctc aagagaactg gcgatggaag ccatcatctc tggggctggg gtgatgagaa 12420
tcagagcaaa gaagagatag atgcagccat taggatcaac cctaaagacg attgagtagt 12480
tagcttaatc acctagagct cggtcaccag tatgaactaa 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 catatatata 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
aggttggatc atccttaaag tgggtctatt taattttatt gcttcttaca gataaaaaaa 13140
aaattatgag ttggtttgat aaaatattga aggatttaaa ataataataa ataataata 13200
acataataa tatgtatata aatttattat aatataacat ttatctataa aaaagtaaat 13260
attgtcataa atctatacaa tcgtttagcc ttgctggaac gaatctcaat tatttaaacg 13320
agagtaaaca tatttgactt tttggttatt taacaaatta ttatttaaca ctatatgaaa 13380
tttttttttt ttatcagcaa agaataaaat taaattaaga aggacaatgg tgtcccaatc 13440
cttatacaac caacttcac aagaaagtca agtcagagac aacaaaaaaa caagcaaagg 13500
aaatttttta atttgagttg tcttggttgc 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

<400> 76

```

gaattcatgg ctctgcatc ttctccgtg ccggagttgg ctgccgcctt ccctgatggc      60
actaccgact tcaagcccat gaggaacacc aagggtacg 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 cgtcgagggc tccatcagat ggtgggtcaa cggtcaccgc     420
gcacaccacc gatacaccga taccgagaag gaccctact cagtccgcaa gggctctcctg     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 caactcgccg     780
cgtgatcacg tcatcacagc cctggtcacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac     840
gagttccctt cggactaccg caacgctatt gagtggtagc agtatgaccc caccaagtgg     900
tcaatctgga tctggaagca gcttggctct gccacaaacc tgaagcagtt ccgcaaaaac     960
gagattgaga agggacgcgt ccagcagctg cagaagaagc tcgaccagaa gcgcgccaag    1020
cttgattggg gtattccctt ggagcagctt cccgttggtt gctgggatga ctttgttgag    1080
cagtccaaga acggaagggc ttggattgca gttgccggtg 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
ggtgggcaag cgaccaaggt cgtccagcct gttccgggtg ctcaggccgc gtga          1434

```

5

<210> 77

<211> 212

<212> PRT

<213> Leptosphaeria nodorum

10

<400> 77

ES 2 623 454 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 2 623 454 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 delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO:13, 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:10, SEQ ID NO:16, y SEQ ID NO:45; que comprende además un elemento de regulación génica.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima delta-9 desaturasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a la SEQ ID NO: 13, en donde la molécula de ácido nucleico comprende además un elemento de regulación génica 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 nervadura de mandioca, la región 3' no traducida de ORF1 de *Agrobacterium tumefaciens*, la región de unión de la matriz RB7 de *Nicotiana tabacum*, secuencias 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 polipéptido quimérico de delta-9 desaturasa que comprende SEQ ID NO:72 y/o SEQ ID NO: 73, en donde el polipéptido comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.
4. Un método para disminuir la cantidad de ácidos grasos saturados en una célula, cuyo método comprende: transformar una célula vegetal con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, tal que la cantidad de ácidos grasos saturados en la célula vegetal disminuya.
5. El método según la reivindicación 4, que comprende transformar además la célula vegetal 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:13.
6. El método según la reivindicación 5, en donde además la transformación de la célula vegetal introduce dentro de la célula vegetal un medio para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula vegetal.
7. El método según la reivindicación 6, en donde el medio para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula vegetal es una desaturasa extraplastidial, siendo la desaturasa preferiblemente HzD9DS desaturasa.
8. Una planta de semilla oleaginosa que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 1.
9. Una semilla de planta que expresa una desaturasa extraplastidial que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 13.
10. La semilla de planta de la reivindicación 9, en donde la desaturasa extraplastidial comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
11. La semilla de la reivindicación 9, en donde la semilla es una semilla de una línea de *Brassica napus* transgénica, teniendo la semilla niveles disminuidos de 16:0 ACP, con relación a una versión isogénica de la línea transgénica de *Brassica napus*.
12. Un método para crear una planta genéticamente modificada que comprende cantidades disminuidas de ácidos grasos saturados en la planta comparada con la planta de tipo silvestre, cuyo 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:13; y, cultivar el material de planta transformado para obtener una planta, en donde la semilla de la planta expresa la enzima delta-9 desaturasa.
13. El método de la reivindicación 4 o 12, en donde la célula de 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*, *Limnathes*, *Linola*, *Tropaeolum*, *Oenothera*, *Olea*, *Elaeis*, *Arachis*, rapeseed, *Carthamus*, *Glycine*, *Soja*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Vernonia*, *Triticum*, *Hordeum*, *Oryza*, *Avena*, *Sorghum*, *Secale*, y demás miembros de las *Gramineae*.
14. Una planta obtenida por el método de acuerdo con la reivindicación 12.
15. Un material de planta obtenido a partir de la planta de la reivindicación 14, siendo el material de planta preferiblemente una semilla, en donde el material de planta comprende 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: 13.

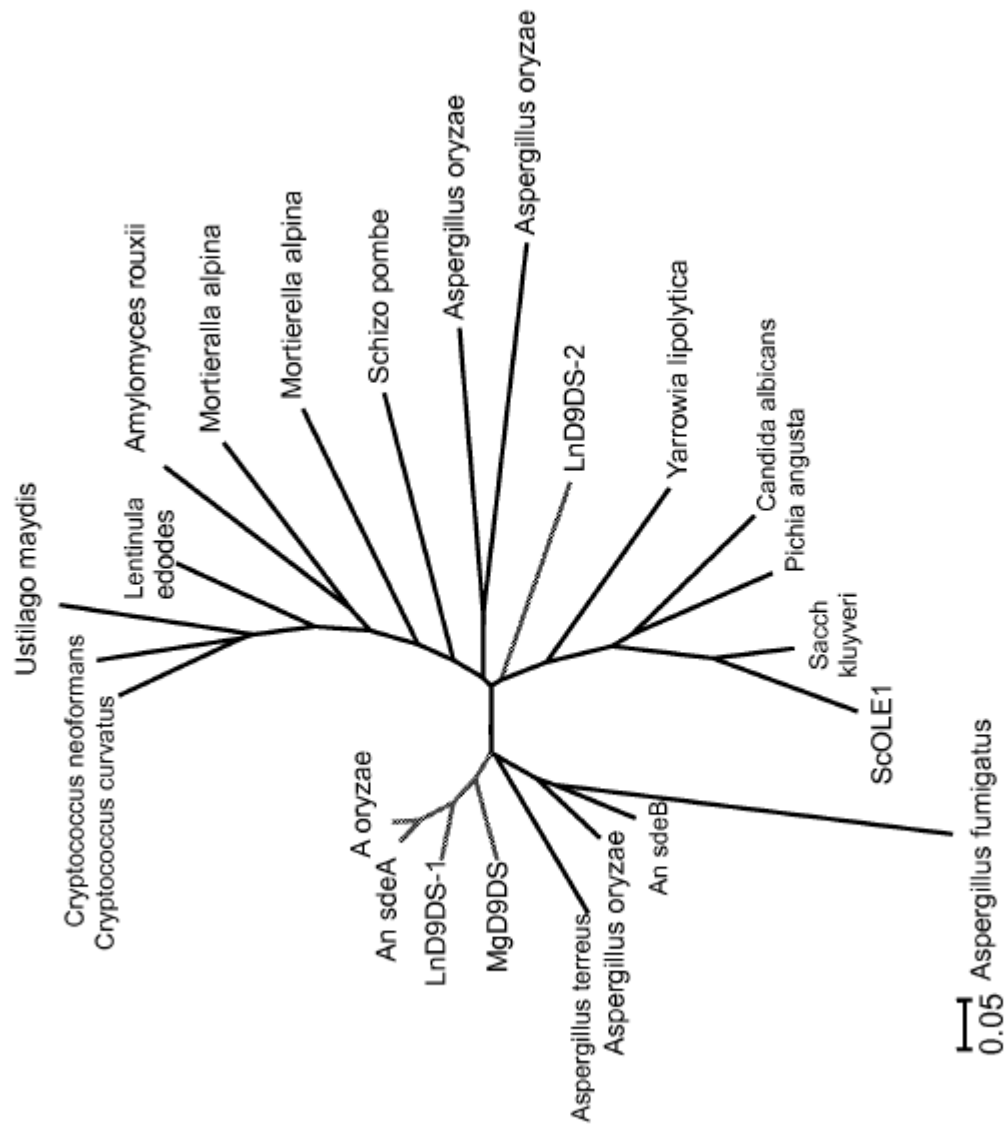


Fig. 1

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

(37) cgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcatta
 (1) -----
 (1) -----

(94) caggctttacacttttatgcttccggctcgatgttggtggaattgtgagggcaccc
 (1) -----
 (1) -----

(151) cggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagctcgaaat
 (1) -----
 (1) -----

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

(265) aactagtggatcccccggtgcaggaattcggcacgagtatgccttcccaccAggc
 (1) -----
 (1) -----gAatt

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

(377) GCgAGCacCTCgGAGCCCAaccGcAACTCCAAG---TACGAtcCtAAgAAGCCGCAC
 (19) GacAGCAttcCaGAGgatAAGgctAcCTC---G---T-----CgAAatcGaCtCat
 (61) aCtAcCgaCTtcaAGCCCAAtGaGgAACaCCAAGggcTACGAcgtcAgcAAGCCGCAC

(431) ATTaCAGAcAtgCCcATcACgCggtcaAACTGGTAccAGCAtGTCAACTGGCTCAAC
 (64) ATTcaAtAtcaAgaagTaACttTtcgGAACTGGTATAAGaAgaTaAATTGGCTCAAC
 (118) ATTtCcGAgAcACcTATgACaCTcaaGAACTGGcATAAGCacGTCAACTGGCTCAAC

(488) gtCAcCTTCATCaTcggCGTGCCtCTCGCTGGCTgCGTCgCCgCCTtCTGGaCCcCT
 (121) ACgACgcTggTggTGcTCaTaCC---CGCT--CTTgGaCTcTAcCTAacacGCaCCa
 (175) ACCACCTTCATCtTGtTtGTGCCcCTgGCTGGtcTCaTaTCCAcTtACTGGGtCCCT

(545) CTGCAGTGGAA-GACCGCTGCg----TGGGCTGTcTCTACTAtTTCTGgAcTGGCC
 (173) CgcCAcTtacAcGACctacGctcateTGGtCcGTCCtTgTACTACTTCTGCACaGctt
 (232) CTGCAGTGGAA-GACgGCTGta----TGGGCTGTcTCTACTACTTCaaCACcGGCC

Fig. 2a

(597) TCGGtATCACcGCCGGATACCATCGtCTcTGGGCaCACAagTCaTACAACGCCgGTC
 (230) TCGGcATCACaGgCGGATAtCATCGACTaTGGagTCatcGCagcTActcCGctcGTC
 (284) TgGGaATtACTGCCGGtTACCAcCGACTtTGGGCTCACAGCTCgTACAAGGCCctcgC

 (654) TTCCtCTgAGgATCTggCTcGCCGCCGTcGGCGCTGGTGctGttGAGGGTTCCATCC
 (287) TaCCGCTacGctTaTtCCTaGCCttCacaGGCGCcGGaGCCaTCCaAGGTagtgtC
 (341) TTCCGCTcAaaATCTaCCTtGCCGCCGTtGGCGCTGGTGCCGTCGAGGGcTCCATCa

 (711) GcTGGTGGAGCcgtGAcCACCgCGCCACCACCgCtACACCgACACCAAcAAGGACC
 (344) GATGGTGGAGCcgaATCACCgCGCCACCACCgATggACCGACACaAtGAAGGACC
 (398) GATGGTGGtcCaacGgTCACCgCGCaCACCACCgATACACCgAtACCgAGAAGGACC

 (768) CCTACagtGTCCGCAAGGGCCTtCTcTACagcCAtcTCGGATGGATGGTcaTGAAGC
 (401) CCTACTCcGTtatgcgCGCCTatTaTtCTCgCACATCGGATGGATGGTatTGAACA
 (455) CCTACTCaGTCCGCAAGGGtCTcCTgTACTCaCATgGGATGGATGctTtcTGAAGC

 (825) AGAACCCCAAGcgtAtcGGCCGCACCGACATCACCGACTTGAACGAGGACCCCGTTG
 (458) gcgACCCCAAgctAAaGGCCGaACaGACgTCAGtGAtCTcgACagcGACCCCGTcG
 (512) AGAACCCCAAGaagcAgGGCCGCACCGACATCACCGACCTGAACGAGGACCCCGTTG

 (882) TCGTCTGGCAGCACAAAGAACTACaTCAAGgcCGTcgTCacCATGGgCTTGATCTTtC
 (515) TaGTCTGGCAGCACAAAGcACTACggCAAGTGCCtGcTgTTCgcccGcTgGATaTTCC
 (569) TCGTtTGGCAGCACcgcAACTtCcTCAAGTGtGtTaTCTTCATGGCCcTcgTCTTCC

 (939) CCtCtgcCGTcGCCGGtCTCatgTGGGGcGATTGGatGGGtGGCTTCATCTACGctG
 (572) CCAtgaTCGTaGCCGGCTCGGaTGGGGaGATTGGTGGGGAGGcCtTgTCTACGcG
 (626) CCACacTtGTgGCTGGCCTtGGcTGGGGtGAcTAcTGGGGAGGtTTCATCTACGgaG

 (996) GTATCCTcCGTaTCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGCGTCAACTCGCTTGctC
 (629) GcATCaTtCGaGcgTgtTTCGTCCAGCAGGCgACaTTtTGCgTgAACTCtCTcGCgC
 (683) GTATtCTgCGTGTCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGCGTCAACTCGCTTGccC

 (1053) ACTGGCTCGGTGACCAGCCcTTCGACGACCGCAACTCtCCTCGTGACCACGTcATtA
 (686) AtTGGaTCGGcGAgCAGCCgTTCGACGACaGacgCaCGCCTCGaGACCACGTtTgA
 (740) ACTGGCTCGGTGACCAGCCtTTCGACGAtCGCAACTCGCCgCGTGAtCACGTcATcA

 (1110) CcGctCTtGTCACTCTcGGAGAGGGcTACCACAACCTCCACCACGAGTTCCCcTCCG
 (743) CAGCgtTGGTaACgaTgGGAGaAGGATAtCatAACTTCCACCACGAaTTCCCaaGCG
 (797) CAGCcCTGGTCACcCTtGGAGAGGGATACCACAACCTCCACCACGAGTTCCCtTCgG

 (1167) ACTACCGCAACGcATCGAGTGGcACCAGTACGACCCTACCAAGTGGTCCATCTGGC
 (800) AtTAtCGCAACGcATCatcTGGTACCAaTACGACCCTACCAaTGGctCATtTacC
 (854) ACTACCGCAACGctATtGAGTGGTACCAGTAtGACCCcACCAAGTGGTCaATCTGGa

Fig. 2b

(1224) TgTGGA-----GCaAGCTCGGCCTCGCCTcCAACCTCAAGCAGTTCCGCTCCAACG
 (857) TCTtctccctcgGCCctTcccCTCGCaTACtgcCTCAaaccTTCCGgTCCAAtG
 (911) TCTGGA-----agCAGCTtGGtCTtGCCcACAACCTgAAGCAGTTCCGcCaaAACG

 (1275) AaATcGAGAAGGGtCGtGTCCAGCAGCTcCAGAAGAAGaTtGACCAGAAGCGCGCCA
 (914) AGATTGAaAAaGGgCGgtTgCAaCAaCAaCAaAAagccCTgGACaAGAAGCGCTCag
 (962) AGATTGAGAAGGGaCGcGTCCAGCAGCTgCAGAAGAAGCTcGACCAGAAGCGCGCCA

 (1332) AGCTcGAcTGGGGTgTcCCtCTCGACCAGCTgCCTGTCATAgaaTGGGACGACTaTG
 (971) gaCTTGATTGGGGccTaCCCCtCttCCAaCTcCCTGTCATAtcgTGGGACGACTTcc
 (1019) AGCTTGATTGGGGTaTtCCtTgGAGCAGCTtCCcGTtgTtagcTGGGAtGACTTTG

 (1389) TcGAGCAG-GCCAAGAA-CgGcCGtGGT-CTcATcGCTGTcGCTGGTGTgTTCAtG
 (1028) aaGcGCgttGCaAAGAgTCCGGCGAGaTgCTGgTTGCTGTcGCaGGTGTgATTcACG
 (1076) TtGAGCAG-tCCAAGAA--CGGaaAGGcttgGATTGCaGttGCcGGTGTcATcCACG

 (1443) ACGTTAcCGACTTCATCAAcGAgCACCCcGGTGGCAaGACgCTtATCAAGAGcGgCG
 (1085) ACGTcAGCcAgTTtATtgAaGAtCACCTGGaGGCAGGAgTtTgAttcgGAGtGCgG
 (1130) AtGTTgGtGACTTCATCAAGGAcCACCTGGTGGCAGagCTCTcATCAActcgGCCa

 (1500) TTGGCAAGGATGcCACCcCATGTTCAACGGCGGTGTcTACtTCCACTCCAACGgaG
 (1142) TgGGCAaAGATGggACaGggATGTTtAAtGGaGGcGTaTAtgAgCACagtAAtGCgG
 (1187) TTGGCAAGGAcGCaACCcCATcTTCAACGGCGGTGTtTACaACCACTCCAACGcG

 (1557) CcCACAACCTcCTtTcTAcCAtGAGGGTtGGTGTcaTcCGcGGTGGCTGtGAaGTTG
 (1199) CgCatAAtCTGtTgTCGACaATGAGGGTGGGAGTgcTtaGaGGTGGgcagGAGGTgG
 (1244) CtCACAACCTGCTcTCGACTATGcGtGtGGGTGTtTgCGtGGcGGCTGcGAGGTG

 (1614) AGATCTGGAAGCGCGCtCAGcGTGAgAACAAAGGATGTcGGtctGGTC--CTgGAcGA
 (1256) AGgTgTGGAAGaa-GCagAGaGTGg----AtGtTtTaGGgAaGagCGaCaTttTGA
 (1301) AGATCTGGAAGCGCGCcCAGtccGAaACAAGGAcGTCTcaAccGTCG--TTGATtc

 (1669) cgCAGGcAACCCaATCaTcAGGGCTGGTaacCAGattACCAAGGTTGCGCAaCCcAT
 (1307) gaCAGGTtACgCgggtGgagaGGtTGGTt--gAGGgGgCtgtGGcTcCGtAGCtaAc
 (1356) ttCgGGTAACCgcATCGTCcGcGcGGTgggCAaGcGACCAAGGTcGtcCAGCctgT

 (1726) TCAGaGTGCTagtGCaGCaTagattggatccttcacgagcgatgtatggcgt
 (1362) TgAccaTGg-----
 (1413) TCCgGgGTGCTcagGCCGCgTga-----

Fig. 2c

```

(1783) ttggttggtctctctcttcttggcggacagagtaattcaatttcttagcgatcgta
(1371) -----
(1435) -----

(1840) gaaagcatcatgggttacgatgctcagtcattgtagatggcgtatgtttgtagccttc
(1371) -----
(1435) -----

(1897) ctcgagtgattggstatgaaaagtagcctcacggcctagaccaagaatgaaaacatt
(1371) -----
(1435) -----

(1954) cacgatttcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgagggggggcc
(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) MPTSGTTIELIDDPKDDSDAS

(1) -----MAALDSI
(1) -----MPSHQAVAGMQAIDPEFVKQPSMASTSEPN
(1) -----MSAPTADI
(1) -----MASSSSSVPELAAAFPDGTTDFKPM
(23) SGIVDEVLDLLEANILATGLNKKAPRIVNGFGSLMGSKEMVSVFDDKKGNEKKSINLDR

(8) PEDKA----TSSKSTHIQYQEVTFRNWYKKNWLNNTTLVVLIPALGLYLTRT--TPLT
(32) RNSK-----YDPKKPHITDMPITRSNWYQHVNWLNVIIFIIGVPLAGCVAAPF--TPLQ
(9) RARA-----PEAKKVHIADTAIRHNWYKHVNWLNVLIIIGIPLYGCIQAFW--VPLQ
(26) RNTKG----YDVSCKPHISETPMTLKNWKKHVNWLNNTTFILFVPLAGLISTYW--VPLQ
(81) LEKDNQEKKEAKTKIHISEQPWTLLNWHQHLLNWLNMVLVCGMFMIGWYFALSFGKVLH

(60) RPTLIWSVLYYFCTAFGITGGYHRLWSHRSYSARLPLRLFLAFTGAGAIQGSARWWSA
(83) WKTAAWAVIYYFWTGLGITAGYHRLWAHKSYNAGLPLRIWLAAVGAGAVEGSIRWWSR
(60) LKTAIWAVIYYFFTGLGITAGYHRLWAHCSYSATLPLRIWLAAVGGGAVEGSIRWWAR
(78) WKTAVWAVVYYFNTGLGITAGYHRLWAHSSYKASLPLKIYLAAGAGAVEGSIRWWSN
(139) LNVFLFSVFYYAVGGVSITAGYHRLWSHRSYSAHWPLRLFYAIFGCASVEGSAKWGH

(118) NHRAHHRWTDTKMDPYSVMRGLLFSHIGWMLNSDPKVKGRDVSBLSDPVSVVWQHK
(141) DHRAHHRWTDTKMDPYSVRKGLLYSHLGWMMVKQNPKRIGRTDITDLNEDPVSVVWQHK
(118) DHRAHHRWTDTKMDPYSVRKGLLYSHLGWMMVKQNPKRIGRTDISDLNEDPVSVVWQHR
(136) GHRAHHRWTDTEKDPYSVRKGLLYSHMGWMLLKQNPCKQGRDITDLNEDPVSVVWQHR
(197) SHRIHHRWTDTLRDPYDARRGLWYSHMGWMLLKPNPKYKARADITDMTDDWTIRFQHR

(176) HYGKCLLFAAWIFPMIVAGLGWGDWWGGLVYAGIIRACFVQQATFCVNSLAHWIGEOP
(199) NYIKAVVTMGLIFPSAVAGLMWGDWMMGGFIYAGILRIFPVQQATFCVNSLAHWLGDOP
(176) NYLKVVFTMGLAVPMLVAGLGWGDWLGGFVYAGILRIFPVQQATFCVNSLAHWLGDOP
(194) NFLKCVIFMALVFPTLVAGLGWGDYWGQFIYGGILRVFFVQQATFCVNSLAHWLGDOP
(255) HYILLMLLTAFVIPTLICGYFFNDYMGGLIYAGFIRVFVIOQATFCINSMHYIGTOP

(234) FDDRRTPRDHVLTALVTMGEYHNFHHEFPPSDYRNAIHWYQYDPTKWLIIYLSLGPFP
(257) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIEWHQYDPTKWSIWLSK--LG
(234) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIEWHQYDPTKWSIWAWKQ--LG
(252) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPPSDYRNAIEWYQYDPTKWSIWIWKQ--LG
(313) FDDRRTPRDNWITAIVTFGEYHNFHHEFPTDYRNAIKWYQYDPTKVIIYLTSL--VG

```

Fig. 3a

(292) LAYSLKTFRSNEIEKGRLOQQQKALDKKRSGLDWGLPLFQLPVISWDDFQARCKESGE
 (313) LASNLKQFRSNEIEKGRVQQLQKKIDQKRAKLDWGVPLDQLPVIEWDDYVEQAK-NGR
 (290) LAYDLKKFRANEIEKGRVQQLQKKLDRKRATLDWGTPLDQLPVMWDDYVEQAK-NGR
 (308) LAHNLKQFRONEIEKGRVQQLQKKLDQKRAKLDWGIPLQLPVVSWDDFVEQSK-NGK
 (369) LAYDLKKFSQNAIEEALIQQEOKKINKKKAKINWGPVLTDLPMWDKQTFLLAKSK-ENK

(350) MLVAVAGVIHDVSQFIEDHPGGRSLIRSAVGKDGTMFNGGVYHSNAAHNLSTMRV
 (370) GLIAGVGVHDVTDFINEHPGGKTLIKSGVGKDATAMFNGGVYFHSNGAHNLSTMRV
 (347) GLVAIAGVGVHDVTDFIKDHPGGKAMISSGIGKDATAMFNGGVYHSNAAHNLSTMRV
 (365) AWIAGVGVHDVGDFTIKDHPGGRALINSAIGKDATAIFNGGVYNHSNAAHNLSTMRV
 (426) GLVIISGIVHDVSGYIIEHPGGETLIKALGKDATKAFSGGVYRHSNAAQNVLADMRV

(408) GVLGGQEVVWKKQR-----VDVLGKSD----ILRQVTRVERLVEGAVAA
 (428) GVIRGGCEVEIWKRAQRENKDVGLVLDDAGNPIIRAGNQITKVAQPIQSASAA
 (405) GVIRGGCEVEIWKRAQKEN--VEYVRDGGSGQRVIRAGEQPTKIPEPIPTADAA
 (423) GVLGGQEVVWKKQRSENKDVSTVVDSSGNRIVRAGGQATKVVQPVPGAQAA
 (484) AVIK-----ESKN-S-----AIRMASKRGEIYETGKFF

Fig. 3b

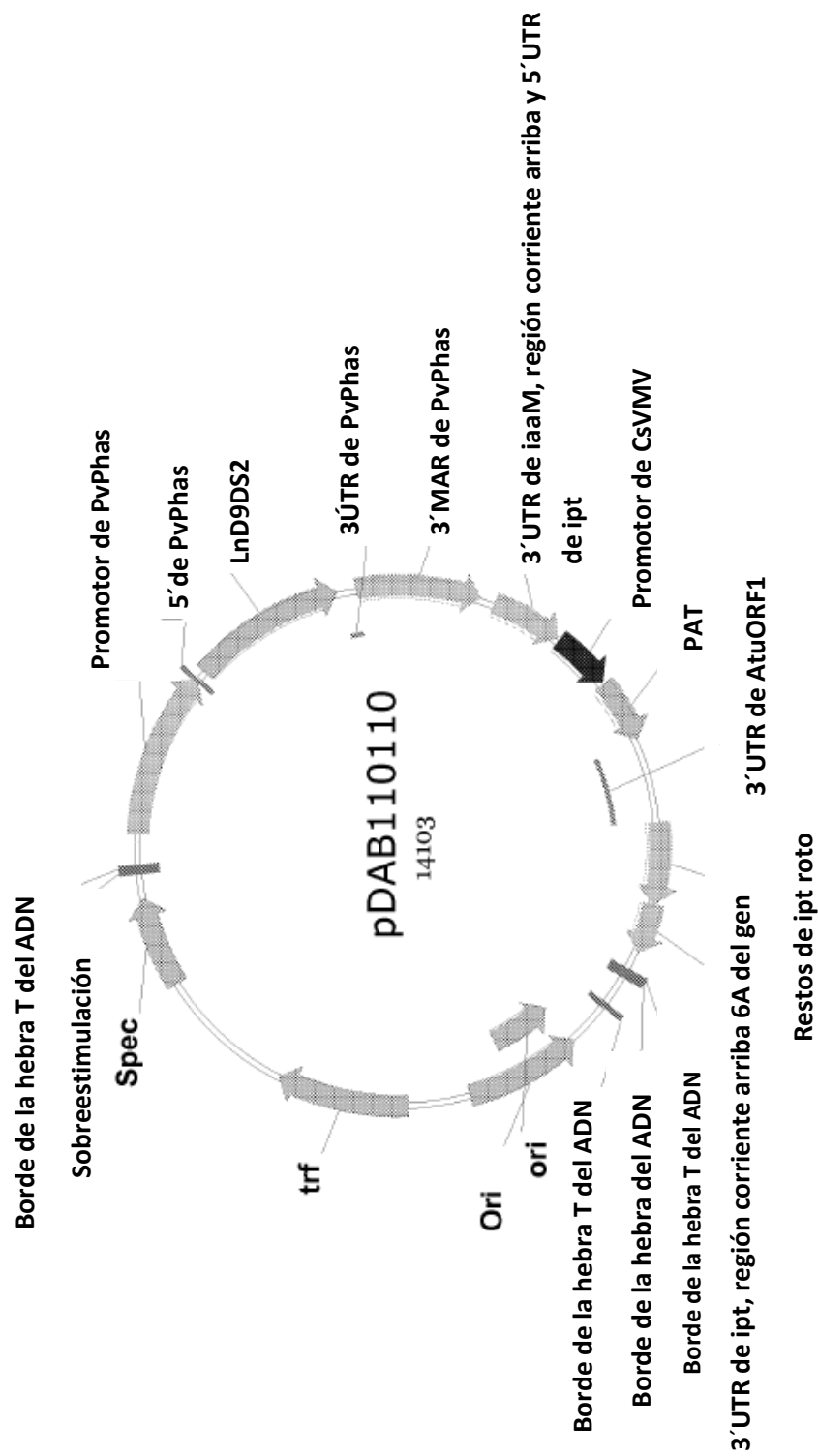


Fig. 4a

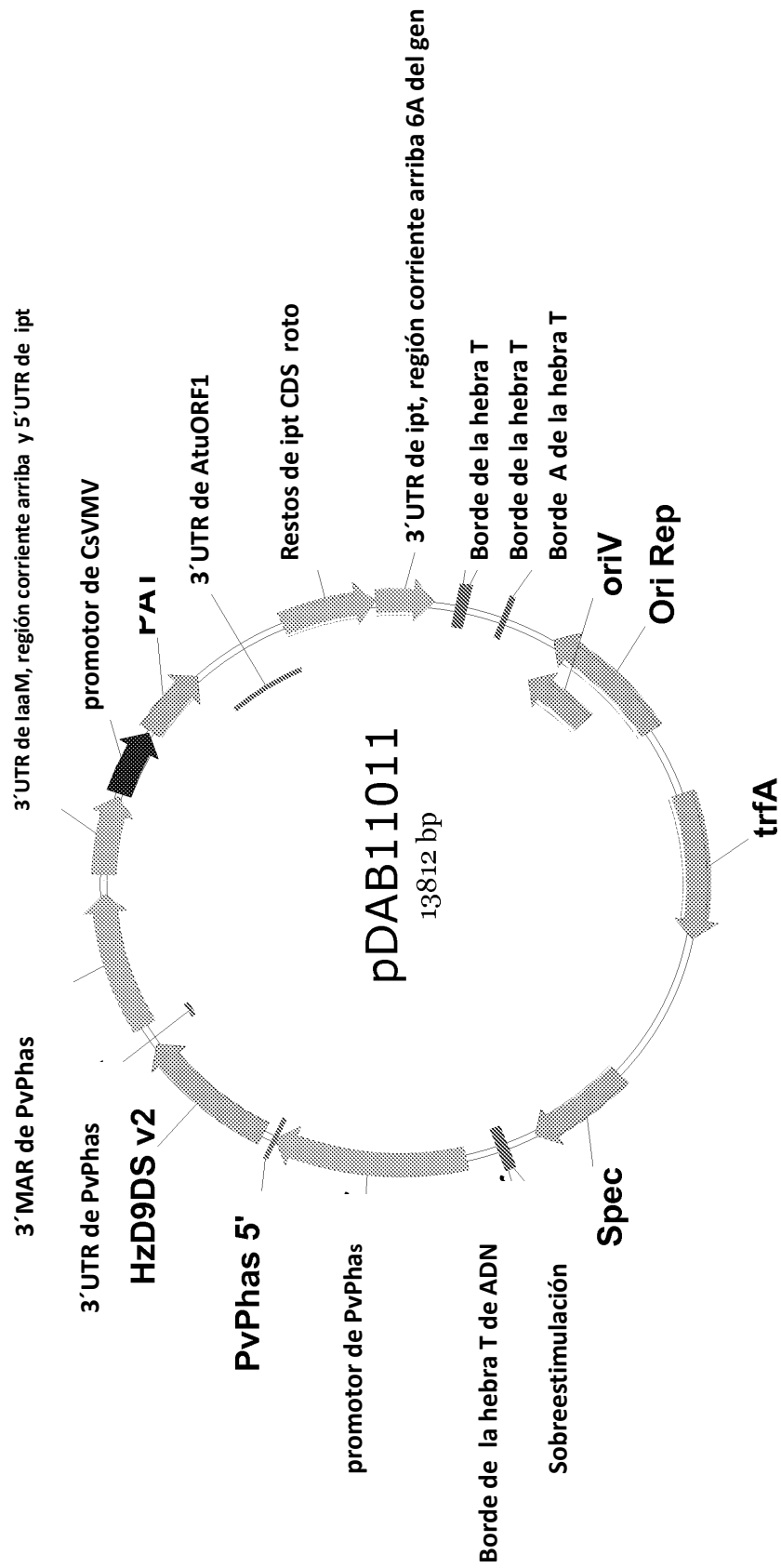


Fig. 4b

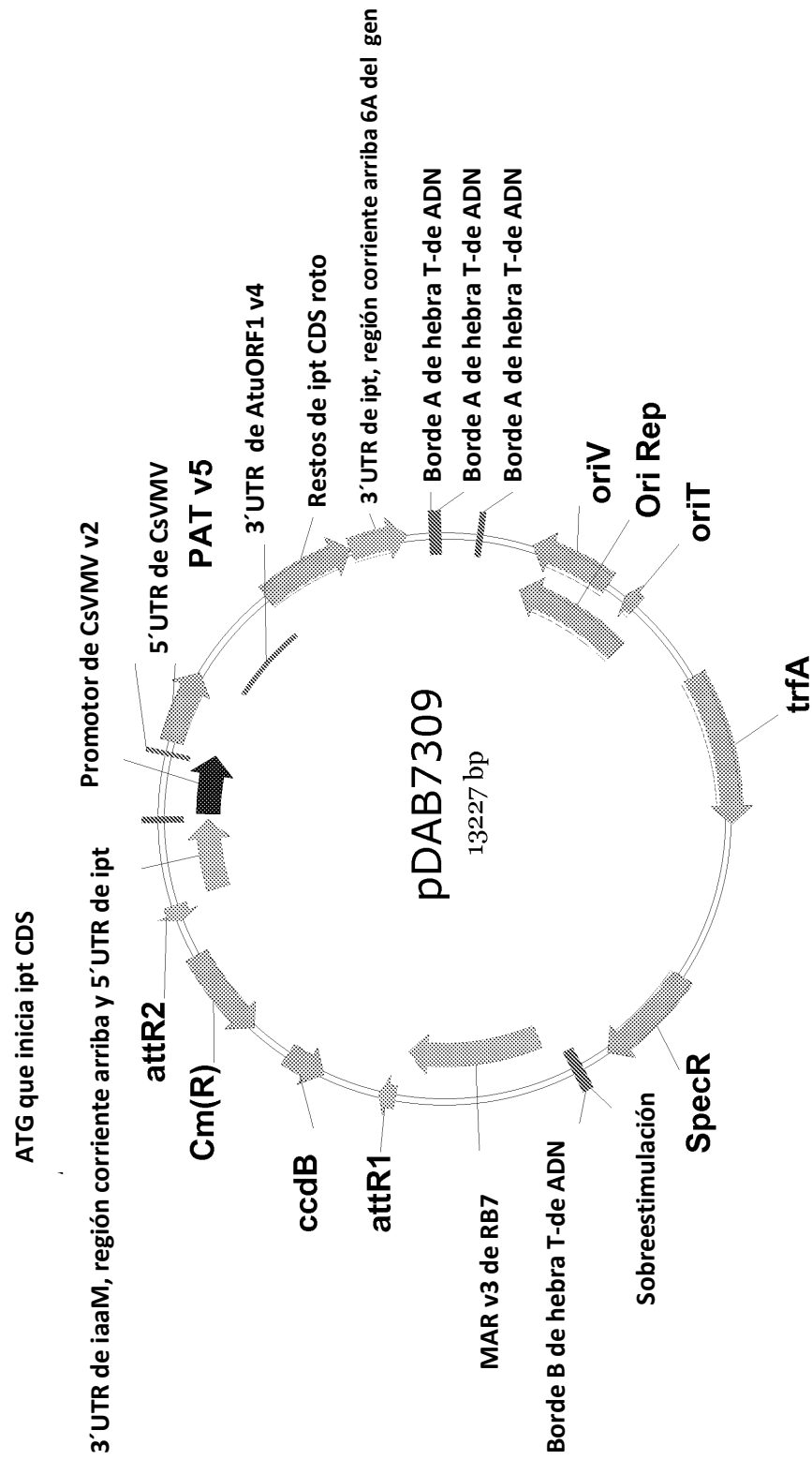


Fig. 5

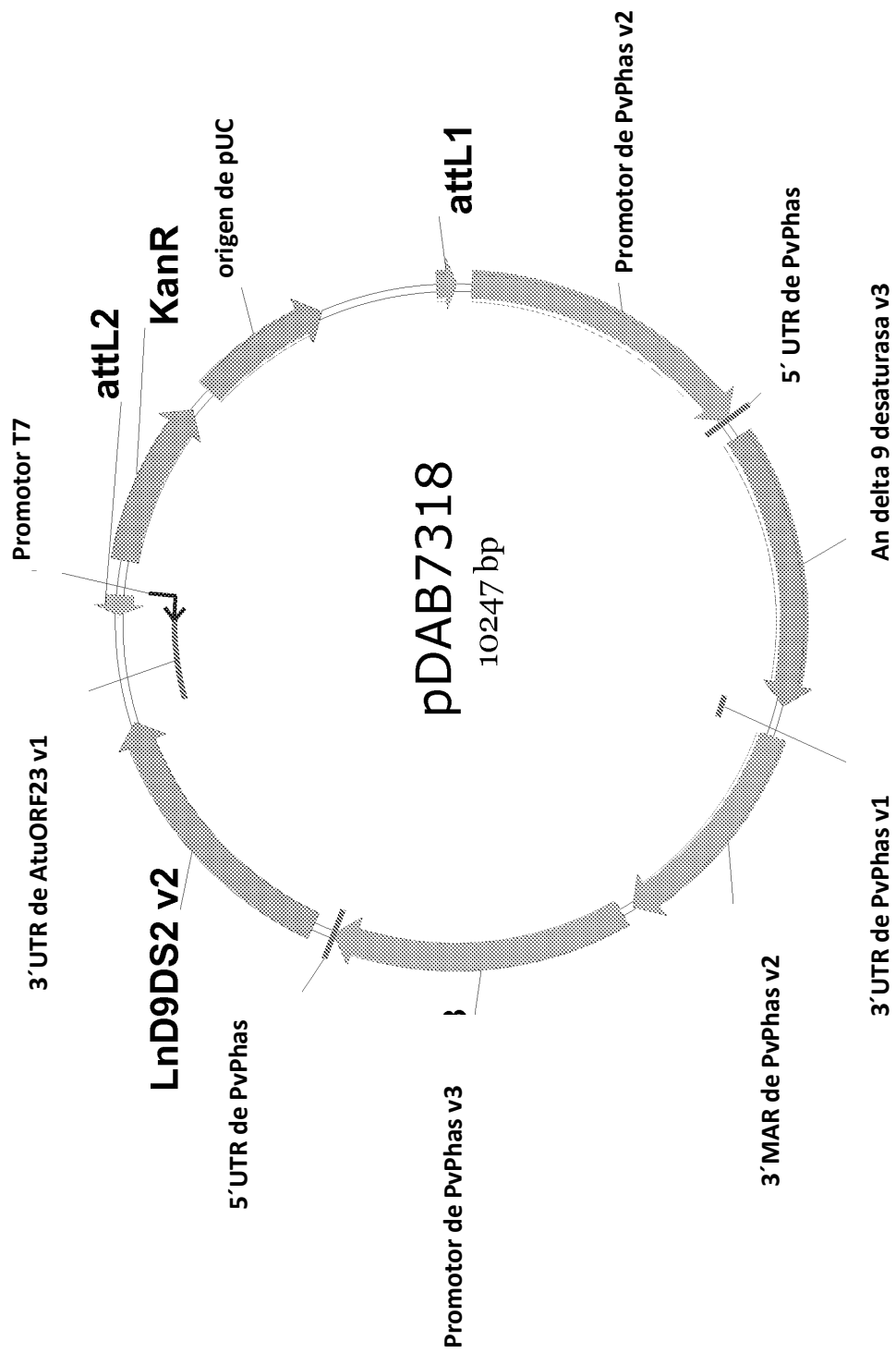


Fig. 6

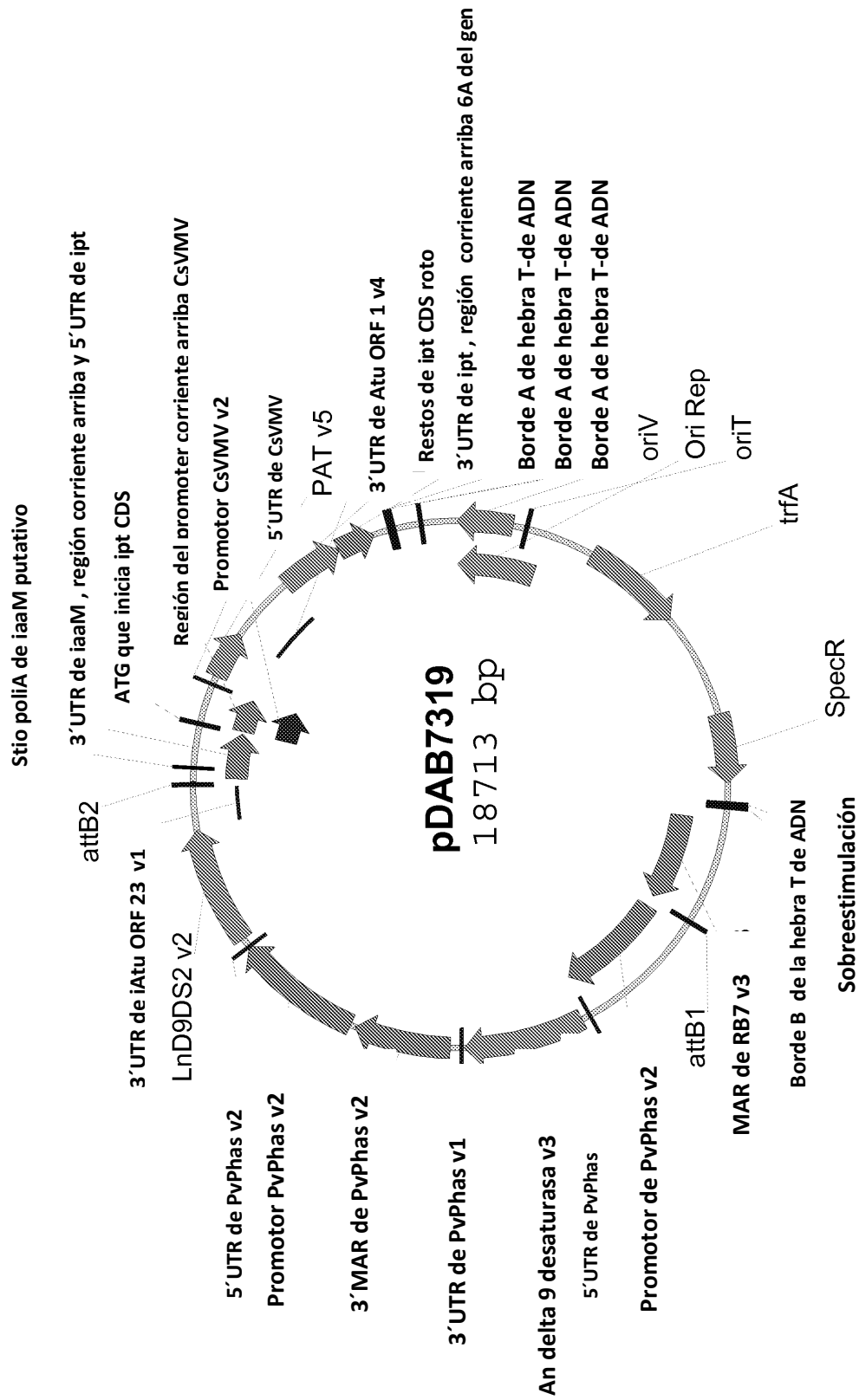


Fig. 7

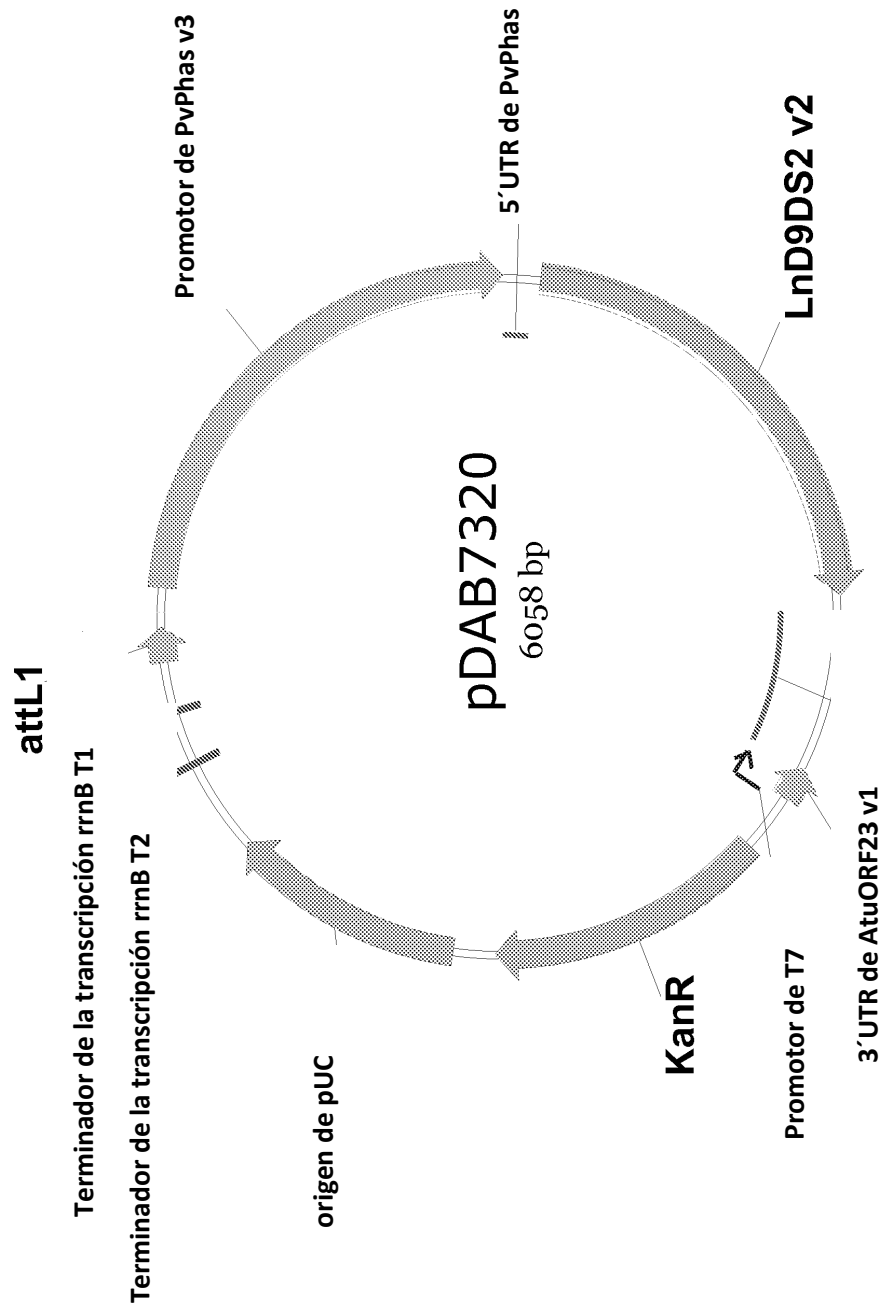


Fig. 8

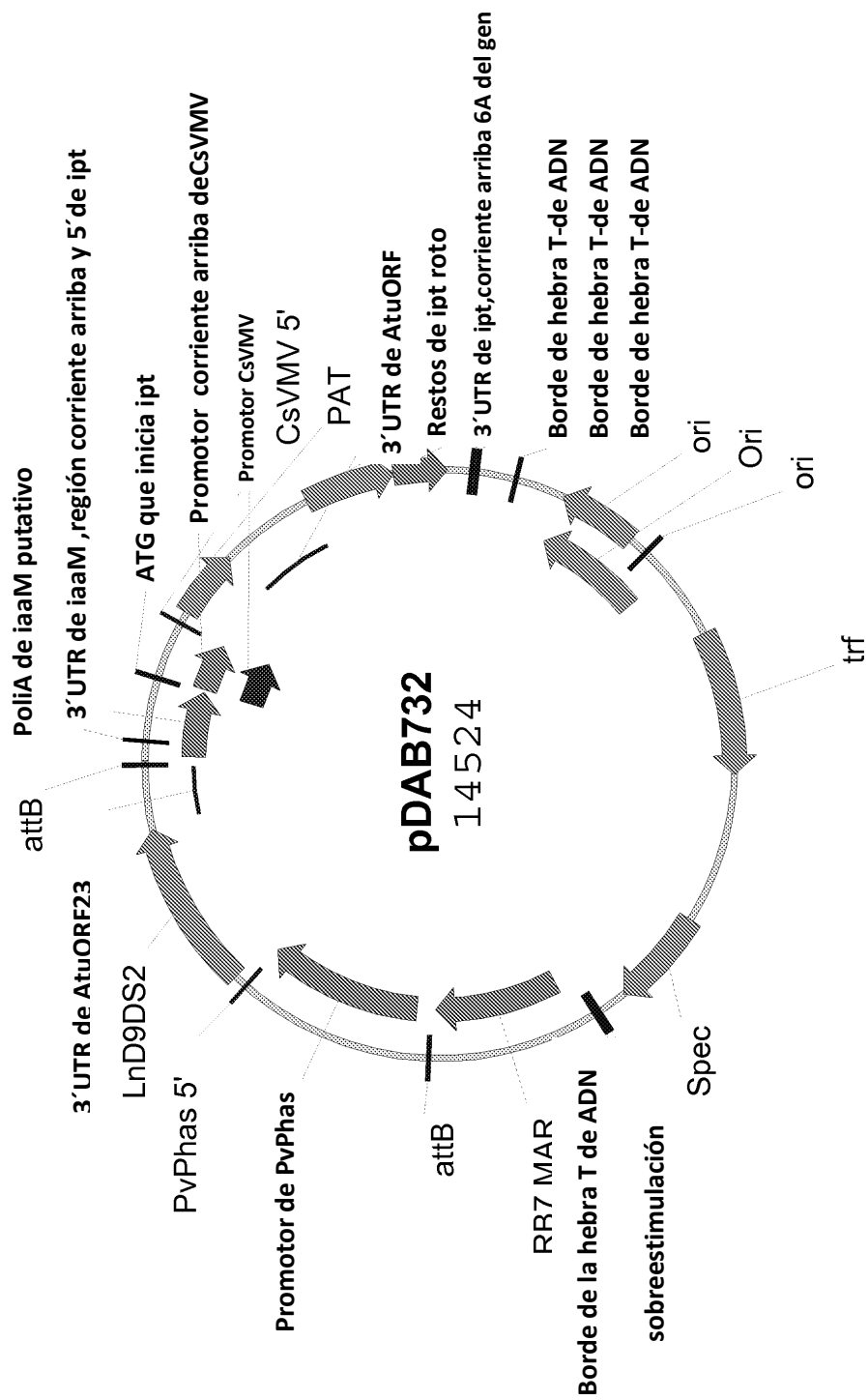


Fig. 9

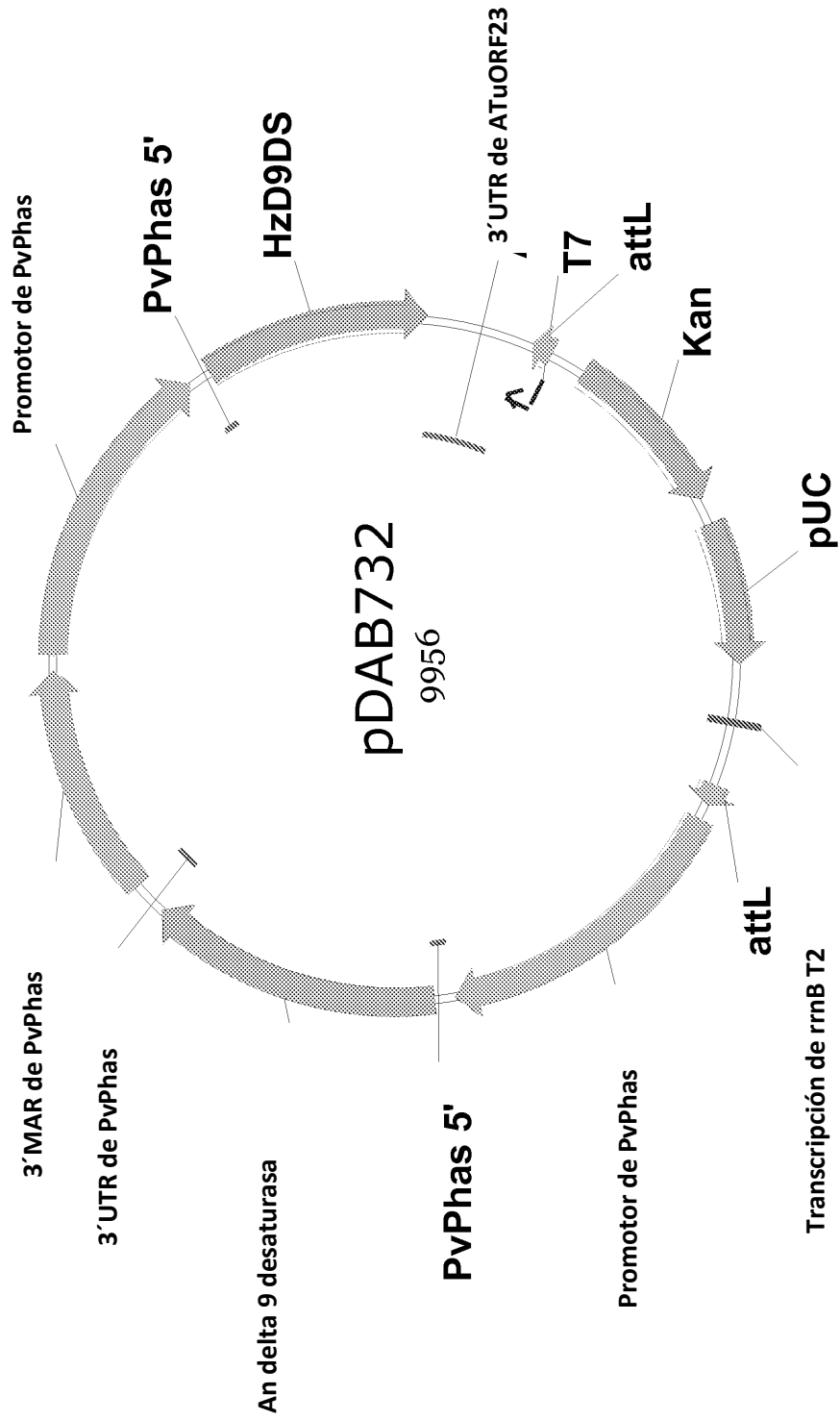


Fig. 10

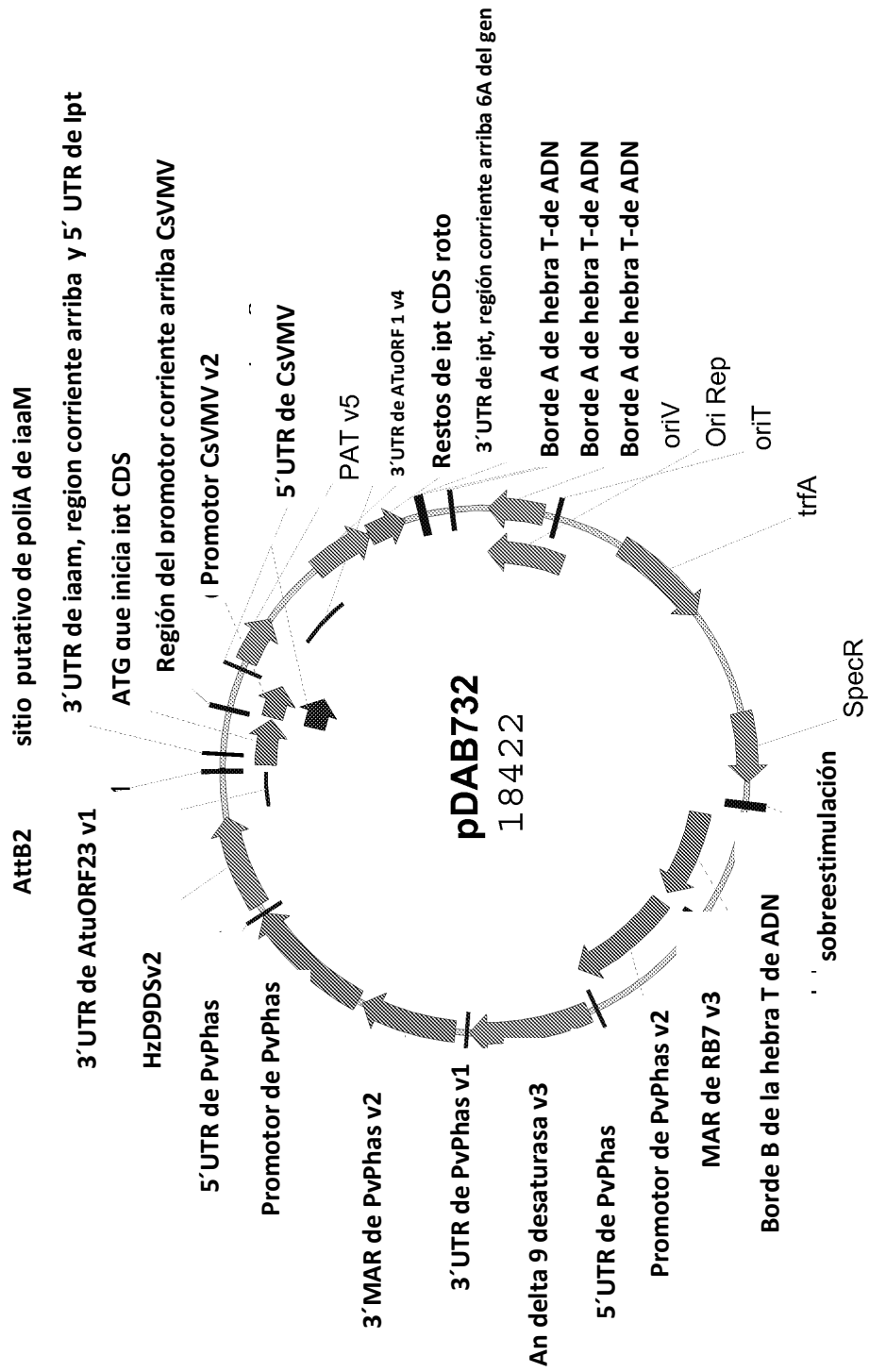


Fig. 11

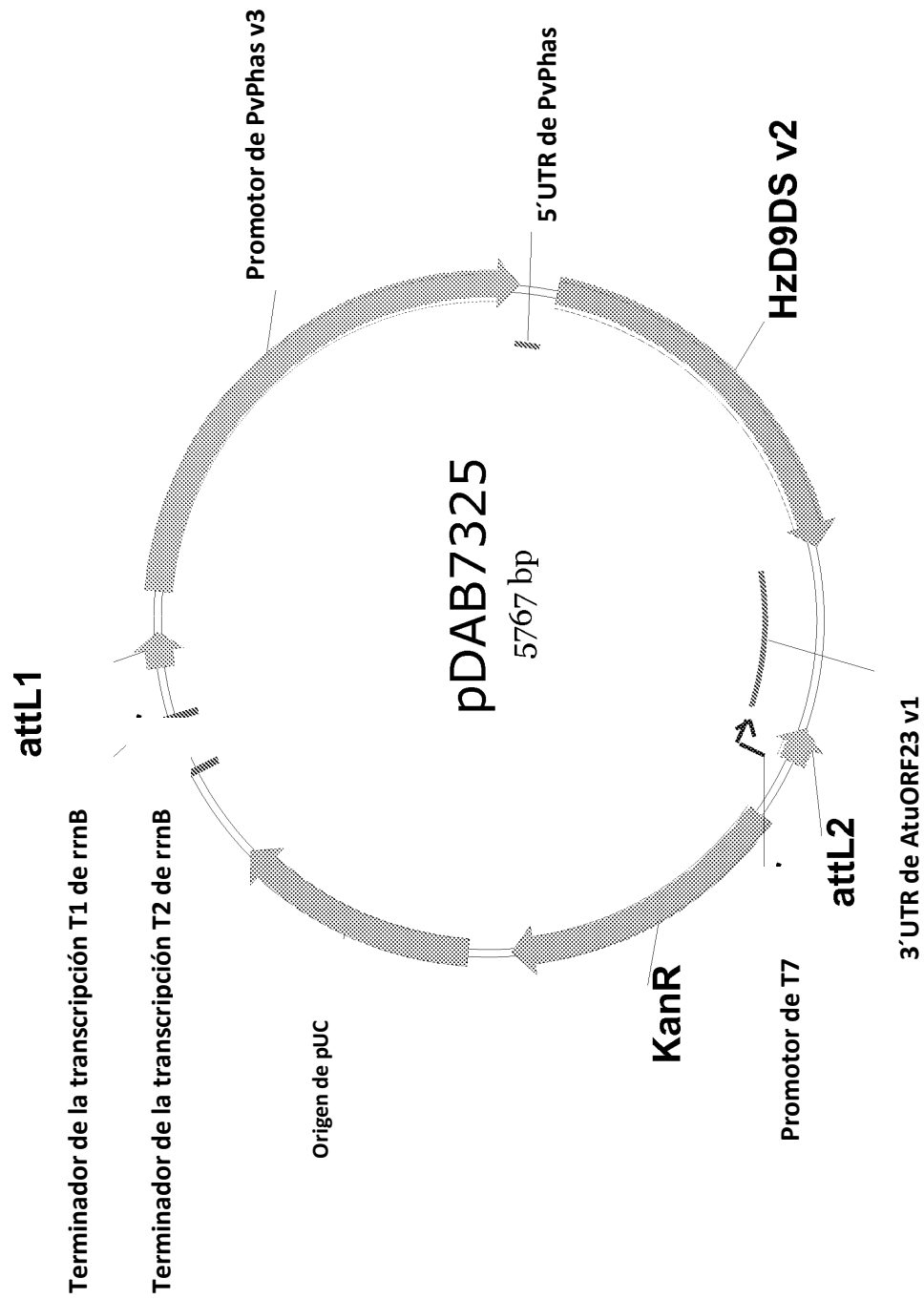


Fig. 12

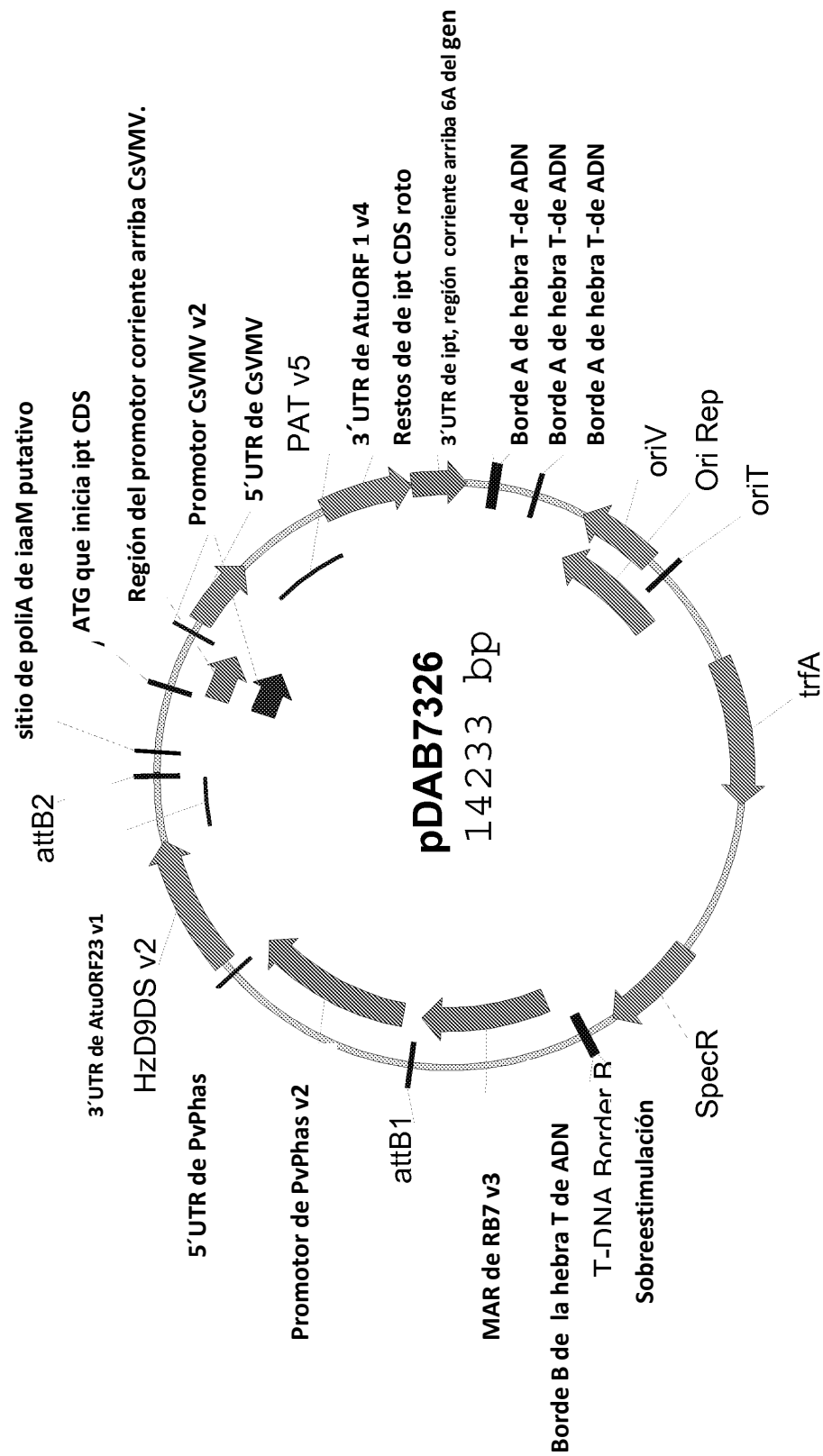


Fig. 13

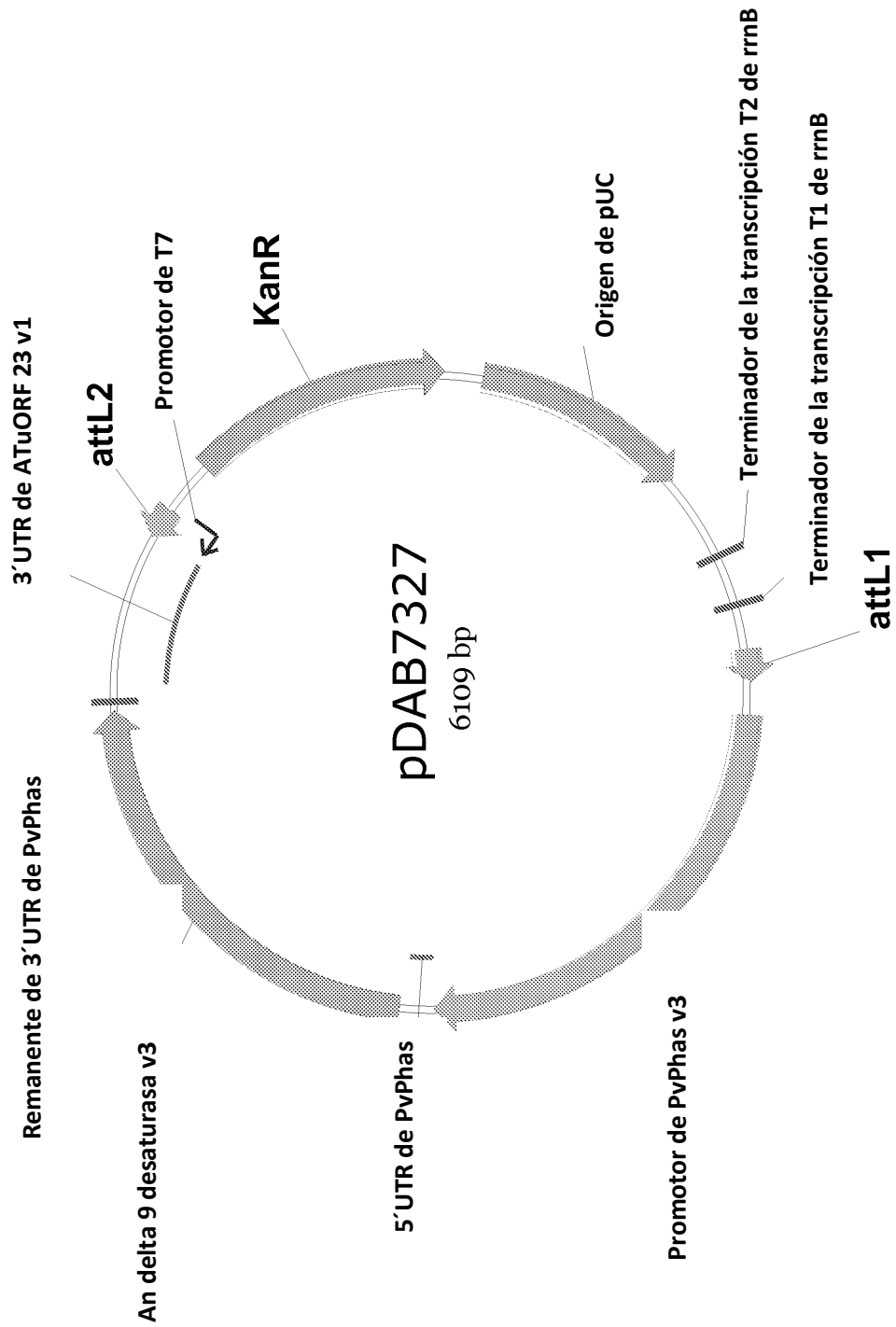


Fig. 14

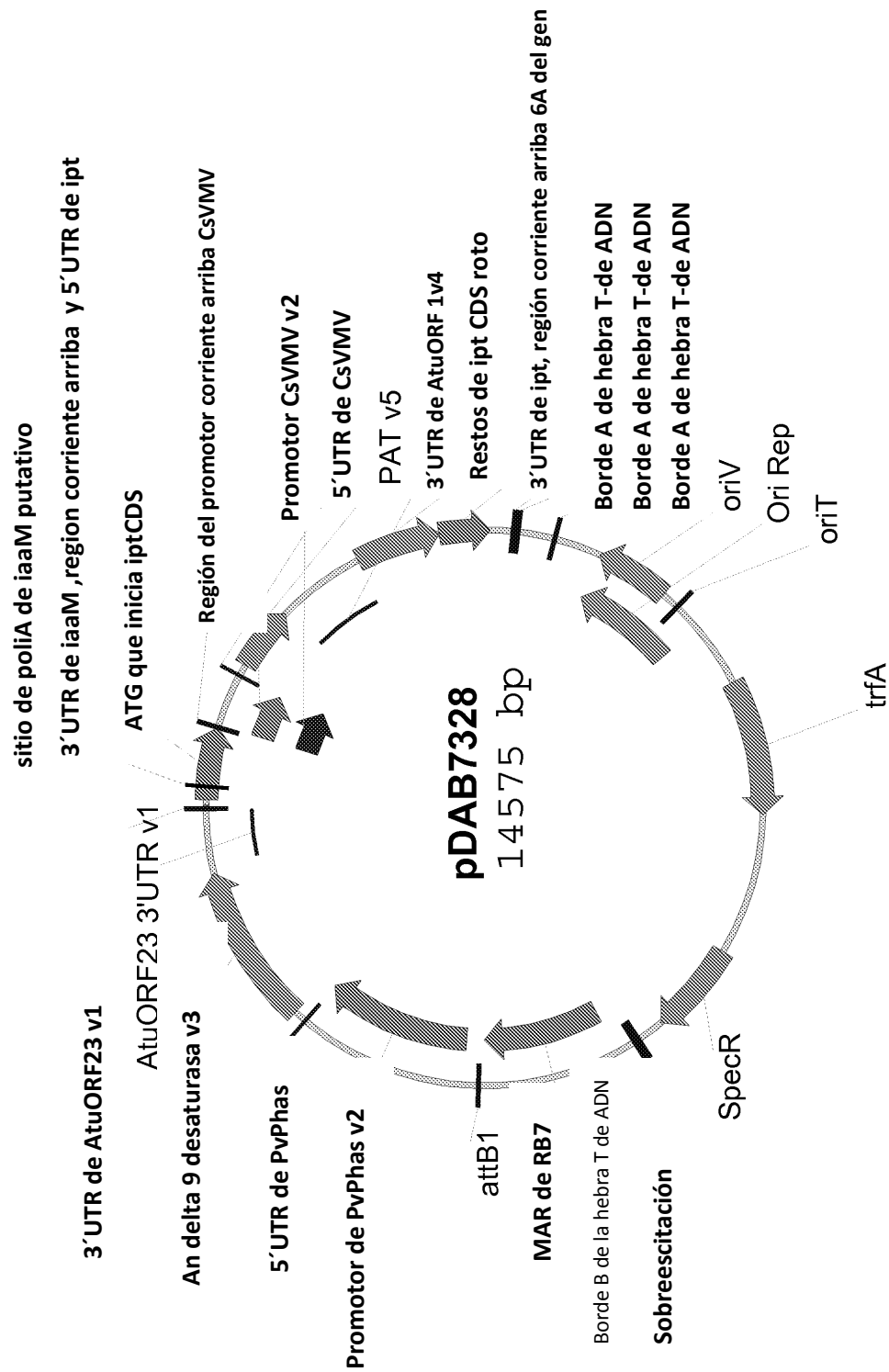


Fig. 15

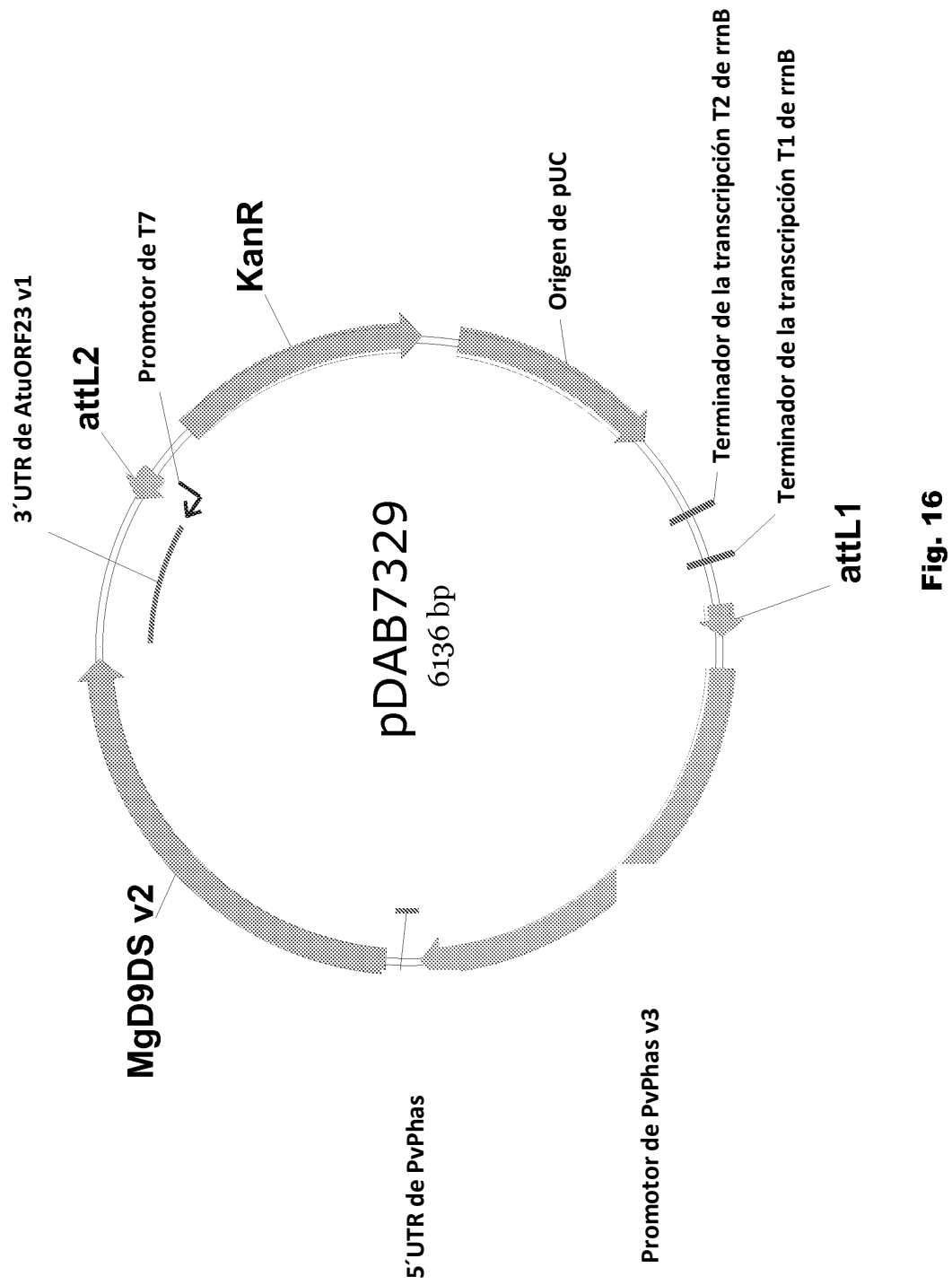


Fig. 16

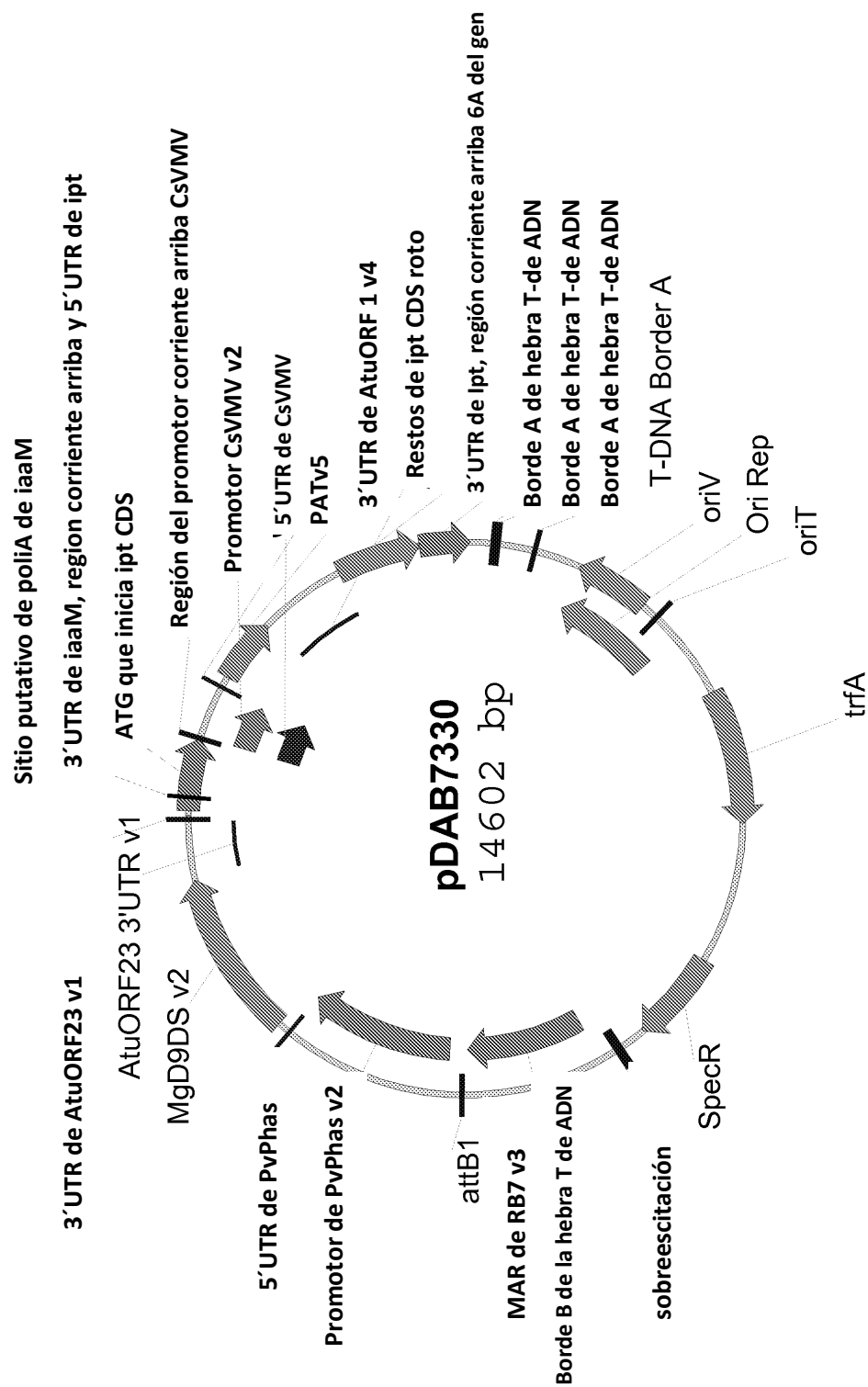


Fig. 17

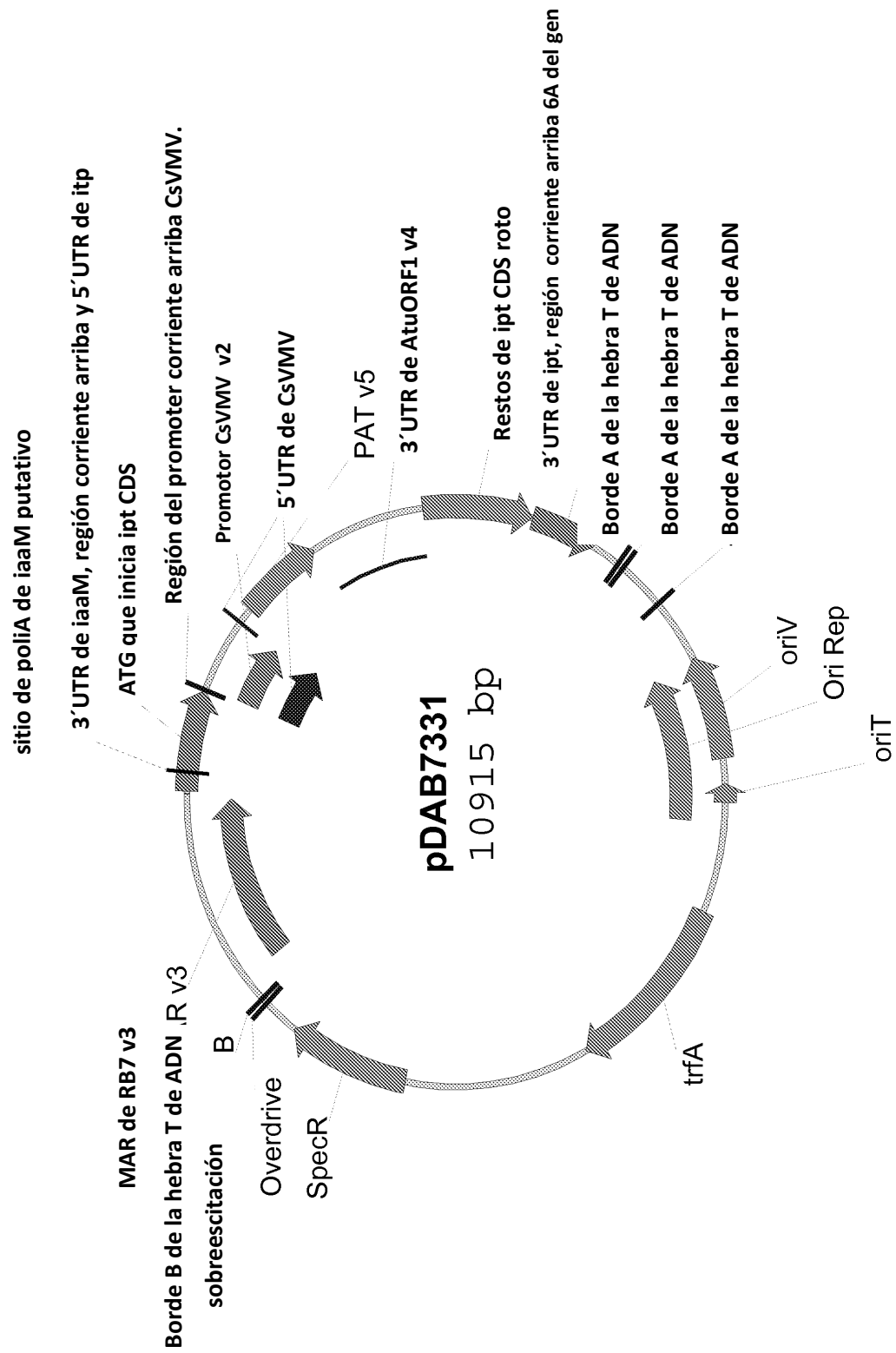


Fig. 18

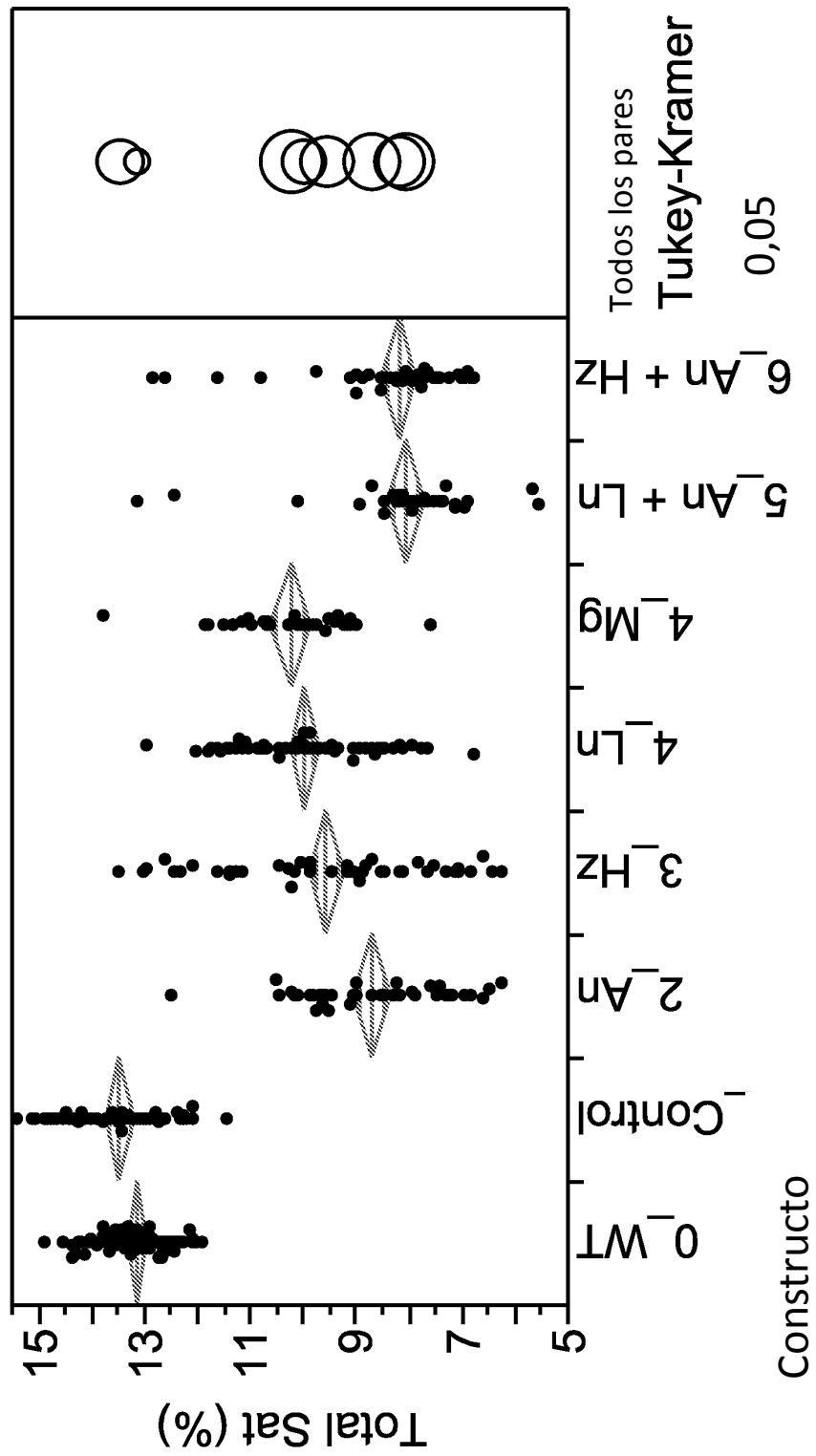


Fig. 19

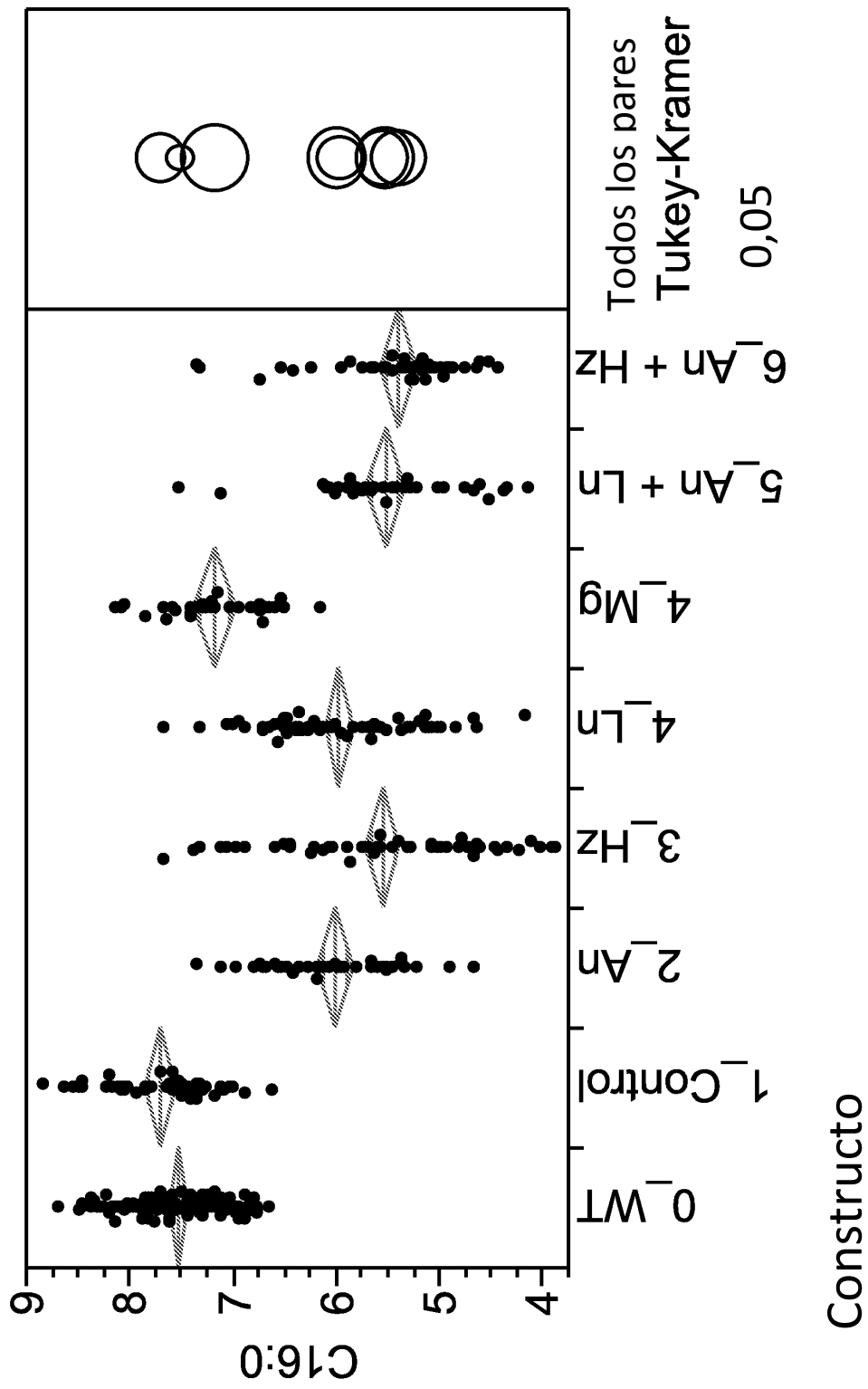


Fig. 20

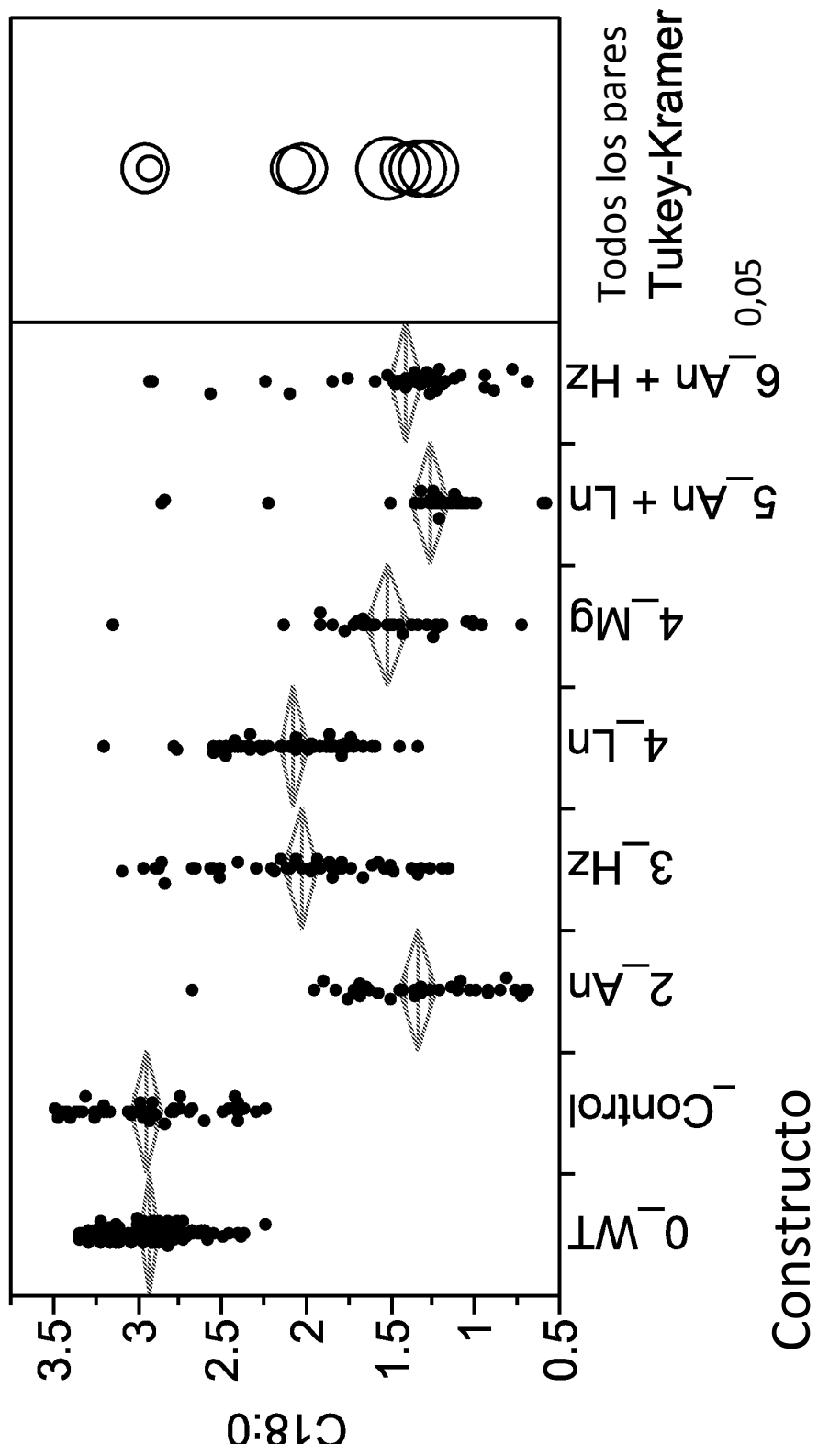
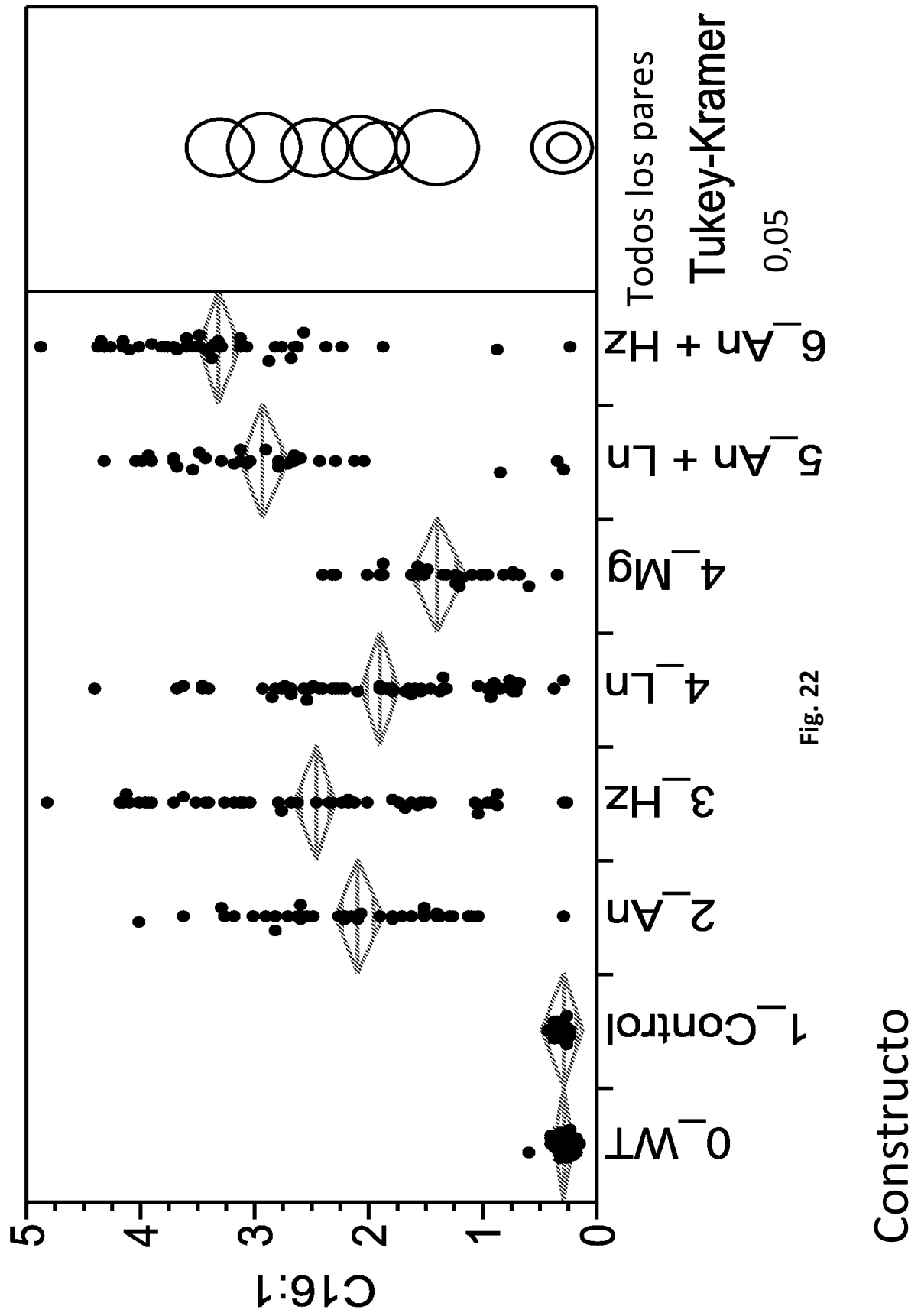


Fig. 21



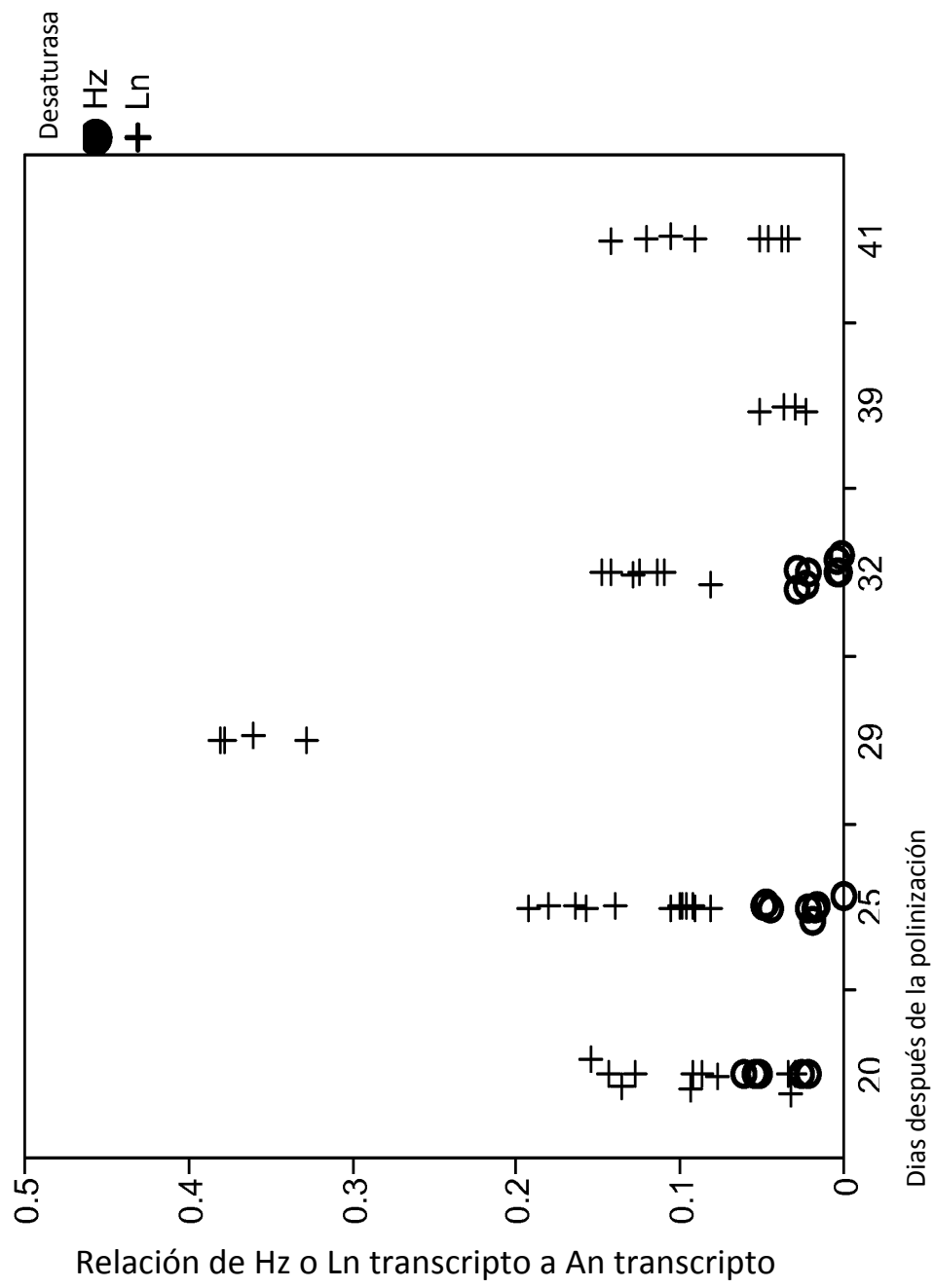


Fig. 23