

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 487**

51 Int. Cl.:

A23L 33/12	(2006.01)
C11C 3/00	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)
A01H 5/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2013 PCT/AU2013/000639**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13185184**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013 E 13803782 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2861059**

54 Título: **Producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en células vegetales**

30 Prioridad:

15.06.2012 US 201261660392 P
 22.06.2012 US 201261663344 P
 06.09.2012 US 201261697676 P
 14.03.2013 US 201361782680 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2017

73 Titular/es:

COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION (33.3%)
Black Mountain Science and Innovation Park,
Clunies Ross Street
Acton ACT 2601, AU;
GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION (33.3%) y
NUSEED PTY LTD (33.3%)

72 Inventor/es:

PETRIE, JAMES ROBERTSON;
SINGH, SURINDER PAL y
DE FEYTER, ROBERT CHARLES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 636 487 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

Producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en células vegetales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente ácido docosahexaenoico en células vegetales recombinantes.

10 **Antecedentes de la invención**

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de Omega-3 (LC-PUFA, por sus siglas en inglés) son actualmente ampliamente reconocidos como compuestos importantes para la salud humana y animal. Estos ácidos grasos se pueden obtener de fuentes alimenticias o mediante la conversión de ácidos grasos linoleicos (LA, por sus siglas en inglés, 18:2 ω 6) o α -linolénicos (ALA, por sus siglas en inglés, 18:3 ω 3), que son ambos considerados como ácidos grasos esenciales para la alimentación humana. Si bien los seres humanos y muchos otros animales vertebrados son capaces de convertir LA o ALA obtenidos de fuentes vegetales en C22, estos realizan esta conversión a una tasa muy baja. Asimismo, la mayoría de las sociedades modernas tienen dietas que no son balanceadas, en las cuales al menos el 90 % de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son ácidos grasos ω 6, en vez de la relación de 4:1 o menor para los ácidos grasos ω 6: ω 3 que se considera ideal (Trautwein, 2001). La fuente alimenticia inmediata de los LC-PUFA, tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés, 20:5 ω 3) y ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés, 22:6 ω 3) para los seres humanos es mayoritariamente el pescado y el aceite de pescado. Por tanto, los profesionales de la salud han recomendado la inclusión regular del pescado que contiene niveles significativos de LC-PUFA en la dieta de los seres humanos. Cada vez más, se incorporan los aceites de LC-PUFA derivados del pescado en los productos alimenticios y en las fórmulas para lactantes, por ejemplo. Sin embargo, debido a disminución de la pesca a nivel nacional y mundial, se necesitan fuentes alternativas de estos aceites beneficiosos para la potenciación de la salud.

Las plantas florecientes, a diferencia de los animales, carecen de la capacidad de sintetizar los ácidos grasos poliinsaturados con cadenas más largas que 18 carbonos. En particular, las plantas hortícolas y de cultivos junto con otros angiospermas no tienen las enzimas necesarias para sintetizar los ácidos grasos ω 3 de cadenas más largas tales como EPA, ácido docosapentaenoico (DPA, por sus siglas en inglés, 22:5 ω 3) y DHA que derivan de ALA. Por tanto, un objetivo importante en la biotecnología de plantas es la modificación genética de las plantas de cultivo que producen cantidades sustanciales de LC-PUFA, proporcionando de esa manera una fuente alternativa de estos cultivos.

Vías para la biosíntesis de LC-PUFA

La biosíntesis de los LC-PUFA en los organismos tales como microalgas, musgos y hongos por lo general se produce como una serie de reacciones de elongación y desaturación dependientes del oxígeno (Figura 1). La vía más común que produce EPA en estos organismos incluye una desaturación Δ 6, elongación Δ 6 y desaturación Δ 5 (referida como la vía de desaturación Δ 6) mientras que una vía menos común utiliza una elongación Δ 9, desaturación Δ 8 y desaturación Δ 5 (referida como vía de desaturación Δ 9). Estas reacciones de elongación y desaturación consecutivas pueden comenzar ya sea con el sustrato de ácidos grasos ω 6 LA, que se muestran esquemáticamente en la parte superior izquierda de la Figura 1 (ω 6) o con el sustrato ω 3 ALA a través de EPA, que se muestran en la parte superior derecha de la Figura 1 (ω 3). Si la desaturación Δ 6 inicial se realiza en el sustrato de ω 6 LA, el producto del LC-PUFA de la serie de tres enzimas será el ácido graso ω 6 ARA. Los organismos que sintetizan LC-PUFA pueden convertir ácidos grasos ω 6 en ácidos grasos ω 3 utilizando una ω 3-desaturasa, que se muestra en la etapa de Δ 17-desaturasa en la Figura 1 para la conversión de ácido araquidónico (ARA, por sus siglas en inglés, 20:4 ω 6) en EPA. Algunos miembros de la familia ω 3-desaturasa pueden actuar en diversos sustratos que varían de LA a ARA. Las ω 3-desaturasas de plantas generalmente catalizan específicamente la desaturación Δ 15 de LA a ALA, mientras que las ω 3-desaturasas de levadura y hongos pueden ser específicas para la desaturación Δ 17 de ARA a EPA (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). Algunos informes sugieren que las ω 3-desaturasas no específicas pueden existir, las que pueden convertir una amplia diversidad de sustratos de ω 6 en sus productos ω 3 correspondientes (Zhang et al., 2008).

La conversión de EPA en DHA en estos organismos se produce mediante una elongación Δ 5 de EPA para producir DPA, seguido de una desaturación Δ 4 para producir DHA (Figura 1). Por el contrario, los mamíferos utilizan la denominada vía "Sprecher" que convierte DPA en DHA mediante tres reacciones separadas que son independientes de una Δ 4-desaturasa (Sprecher et al., 1995).

Las desaturasas del extremo frontal que generalmente se encuentran en las plantas, musgos, microalgas y animales inferiores tales como *Caenorhabditis elegans* aceptan predominantemente los sustratos de ácidos grasos esterificados en la posición *sn*-2 de un sustrato de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés). Estas desaturasas, por lo tanto, se conocen como desaturasas del extremo frontal unidas a lípidos de acil-PC (Domergue et al., 2003). Por el contrario, las desaturasas del extremo frontal de animales superiores aceptan generalmente sustratos de acil-

CoA donde el sustrato de ácido graso se une a CoA en vez de a PC (Domergue et al., 2005). Se sabe que algunas desaturasas de microalgas y una desaturasa de plantas utilizan sustratos de ácidos grasos esterificados a CoA (Tabla 2).

5 Cada reacción de elongación de PUFA consiste en cuatro etapas catalizadas con un complejo de proteína con múltiples componentes: primero, una reacción de condensación resulta en la adición de una unidad de 2C de malonilo-CoA al ácido graso, lo que resulta en la formación de un intermedio de β -cetoacilo. Después, este se reduce con NADPH, seguido de una deshidratación para proporcionar un intermedio de enoilo. Este intermedio se reduce finalmente una segunda vez para producir el ácido graso elongado. Generalmente, se considera que la etapa de condensación de estas cuatro reacciones es específica de un sustrato mientras que otras etapas no lo son. En la práctica, esto significa que la maquinaria de elongación de plantas nativa es capaz de elongar los PUFA siempre que se introduzca la enzima de condensación (normalmente denominada una 'elongasa') específica al PUFA, aunque la eficiencia de la maquinaria de elongación de plantas nativa puede ser baja elongando los sustratos de PUFA no naturales. En 2007, se publicó la identificación y la caracterización del ciclo de elongación de la levadura dehidratasa (Denic y Weissman, 2007).

La desaturación de PUFA en las plantas, musgos y microalgas se produce naturalmente en los sustratos de ácidos grasos, predominantemente en el grupo acil-PC mientras que la elongación se produce a los sustratos en el grupo acil-CoA. La transferencia de ácidos grasos de moléculas de acil-PC a un transportador de CoA se realiza por las fosfolipasas (PLA, por sus siglas en inglés) mientras que la transferencia de ácidos grasos de acil-CoA a un transportador de PC se realiza con lisofosfatidil-colina aciltransferasa (LPCAT, por sus siglas en inglés) (Figura 21) (Singh et al., 2005).

Producción diseñada por ingeniería de LC-PUFA

25 La mayoría de las modificaciones genéticas metabólicas de LC-PUFA se han realizado utilizando la vía de elongación/ $\Delta 6$ -desaturación aeróbica. La biosíntesis del ácido γ -linolénico (GLA, por sus siglas en inglés, 18:3 ω 6) en el tabaco se describió por primera vez en 1996 utilizando una $\Delta 6$ -desaturasa de la cianobacteria *Synechocystis* (Reddy y Thomas, 1996). Más recientemente, se ha producido GLA en las plantas de cultivo tal como cártamo (73 % de GLA en aceite de semilla; Knauf et al., 2006) y soja (28 % de GLA; Sato et al., 2004). La producción de LC-PUFA tal como EPA y DHA implica una modificación genética más complicada debido a la cantidad en aumento de las etapas de elongación y desaturación implicadas. La producción de EPA en una planta terrestre se describió por primera vez por Qi et al. (2004) quien introdujo genes que codifican una $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana*, una $\Delta 8$ -desaturasa de *Euglena gracilis* y una $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina* en *Arabidopsis* lo que da un rendimiento de hasta 3 % de EPA. Este trabajo fue seguido por Abbadi et al. (2004) quien describió la producción de hasta 0,8 % de EPA en semillas de lino que utilizan genes que codifican una $\Delta 6$ -desaturasa y $\Delta 6$ -elongasa de *Physcomitrella patens* y una $\Delta 5$ -desaturasa de *Phaeodactylum tricornutum*.

40 El primer informe de la producción de DHA, y hasta la fecha los niveles de producción más altos, fue en el documento WO 04/017467 donde se describe la producción de un 3 % de DHA en embriones de soja, pero no en las semillas, mediante la introducción de genes que codifican la $\Delta 6$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, $\Delta 6$ -desaturasa de *Mortierella alpina*, $\Delta 5$ -desaturasa de *Mortierella alpina*, $\Delta 4$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, $\Delta 17$ -desaturasa de *Saprolegnia diclina*, $\Delta 6$ -elongasa de *Mortierella alpina* y $\Delta 5$ -elongasa de *Pavlova lutheri*. El nivel máximo de EPA en los embriones que también producen DHA fue del 19,6 %, lo que indica que la eficiencia de la conversión de EPA a DHA fue muy pobre (documento WO 2004/071467). Este descubrimiento fue similar al publicado por Robert et al. (2005), donde el flujo de EPA a DHA fue escaso, con la producción del 3 % de EPA y el 0,5 % de DHA en *Arabidopsis* utilizando la $\Delta 5/6$ -desaturasa de *Danio rerio*, la $\Delta 6$ -elongasa de *Caenorhabditis elegans*, y la $\Delta 5$ -elongasa y $\Delta 4$ -desaturasa de *Pavlova salina*. La producción de EPA y DHA se notificó utilizando la misma combinación de enzimas que en el documento WO2005/103253. También en el 2005, Wu et al. publicó la producción del 25 % de ARA, el 15 % de EPA, y el 1,5 % de DHA en *Brassica juncea* utilizando la $\Delta 6$ -desaturasa de *Pythium irregulare*, una $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrid*, la $\Delta 6$ -elongasa de *Physcomitrella patens*, la $\Delta 12$ -desaturasa de *Calendula officianalis*, una $\Delta 5$ -elongasa de *Thraustochytrid*, la $\Delta 17$ -desaturasa de *Phytophthora infestans*, el LC-PUFA elongasa de *Oncorhynchus mykiss*, una $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrid* y un LPCAT de *Thraustochytrid* (Wu et al., 2005). Se proporcionan resúmenes de los esfuerzos para producir cultivos de semillas de aceite que sintetizan $\omega 3$ LC-PUFA en Venegas-Caleron et al. (2010) y Ruiz-Lopez et al. (2012). Como fue indicado por Ruiz-Lopez et al. (2012), los resultados obtenidos hasta la fecha para la producción de DHA en las plantas transgénicas no se ha ni acercado a los niveles observados en los aceites de pescado.

60 Por tanto, aun existe la necesidad de más producción eficiente de LC-PUFA en las células recombinantes, en particular de DHA en las semillas de las plantas oleaginosas.

Sumario de la invención

65 Los inventores han encontrado métodos y plantas para la producción de lípidos con niveles altos de DHA.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona lípidos vegetales extraídos, que comprenden ácidos grasos

en una forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω3 que comprenden ácido α-linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA) y opcionalmente uno o más ácidos estearidónicos (SDA), ácidos eicosapentanoicos (EPA), ácidos docosapentaenoico (DPA) y ácidos eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 7 % al 20 % donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %.

En una realización, el lípido extraído tiene una o más o todas las siguientes características

- i) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 15 %,
- ii) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 30 %, entre el 3 % y el 30 %, entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 30 %, entre el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 % o es de aproximadamente el 30 %.
- iii) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 35 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 % o entre aproximadamente el 4 % y el 17 %,
- iv) el nivel de ácido α-linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 40 %, entre el 7 % y el 40 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 16 % o entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %.
- v) el nivel de ácido γ-linolénico (GLA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a aproximadamente el 0,5 %, entre el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, entre el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- vi) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 7 %, inferior a aproximadamente el 6 %, inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 6 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- vii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 6 %, inferior a aproximadamente el 5 %, inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a aproximadamente el 0,5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 6 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 5 %, entre el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- viii) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA, por sus siglas en inglés) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 2 %, inferior a aproximadamente el 1 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 2 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 1 %,
- ix) el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- x) el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 8 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- xi) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, entre aproximadamente el 8 % y el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y el 20 %, entre el 11 % y el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 16 %, o entre aproximadamente el 14 % y el 20 %,
- xii) el lípido comprende ácido ω6-docosapentaenoico (22:5^{Δ4,7,10,13,16}) en su contenido de ácido graso,
- xiii) el lípido carece esencialmente de ácido ω6-docosapentaenoico (22:5^{Δ4,7,10,13,16}) en su contenido de ácido graso,
- xiv) el lípido carece esencialmente de SDA, EPA y ETA en su contenido de ácidos grasos,
- xv) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 25 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 60 %, o entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 %,

- xvi) el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 35 %, entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 25 %, o entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 22 %,
- 5 xvii) el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 20 % y el 75 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 75 %, o entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 75 %,
- 10 xviii) el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 6 % y el 20 %, inferior al 20 %, inferior a aproximadamente el 16 %, inferior a aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 16 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 10 %, o entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 10 %,
- 15 xix) el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 10 %, inferior a aproximadamente el 8 %, inferior a aproximadamente el 6 %, inferior a aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre el 1 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 8 %, o entre aproximadamente el 0,5 % y el 4 %,
- 20 xx) el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 36 % y aproximadamente el 65 %, entre el 40 % y el 60 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 % o aproximadamente el 40 %,
- 25 xxi) el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 9 % y el 33 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 12 % y aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 17 % o aproximadamente el 20 %,
- 30 xxii) la relación de ácidos grasos $\omega 6$ totales:ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, inferior a aproximadamente 0,50, inferior a aproximadamente 0,40, inferior a aproximadamente 0,30, inferior a aproximadamente 0,20, inferior a aproximadamente 0,15, aproximadamente el 1,0, aproximadamente 0,1 o aproximadamente 0,2,
- 35 xxiii) la relación de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos:ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, inferior a aproximadamente 0,50, inferior a aproximadamente 0,40, inferior a aproximadamente 0,30, inferior a aproximadamente 0,20, inferior a aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2 o aproximadamente 1,0,
- 40 xxiv) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a LA por $\Delta 12$ -desaturasa de al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 98 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 90 %,
- 45 xxv) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a SDA mediante $\Delta 6$ -desaturasa de al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 70 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 60 %, o entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 70 %,
- 50 xxvi) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA mediante $\Delta 6$ -elongasa de al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 95 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 88 %, o entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 85 %,
- 55 xxvii) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ETA a EPA mediante $\Delta 5$ -desaturasa de al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 99 %, o entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 98 %,
- 60 xxviii) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de EPA a DPA mediante $\Delta 5$ -elongasa de al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 95 %,
- 65 xxix) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de DPA a DHA mediante $\Delta 4$ -desaturasa de al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 93 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 95 %,
- xxx) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de al menos el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 25 %,
- xxxi) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de LA a DHA de al menos el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %,

- xxxii) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a DHA de al menos el 17 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 24 %, entre aproximadamente el 17 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 24 % y aproximadamente el 35 %,
- 5 xxxiii) el total de ácidos grasos en el lípido extraído tiene menos que el 1 % de C20:1,
- xxxiv) el contenido de triacilglicerol (TAG, por sus siglas en inglés) del lípido es al menos el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos el 95 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 99 %, o entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 99 %,
- 10 xxxv) el lípido comprende diacilglicerol (DAG), por sus siglas en inglés),
- xxxvi) el lípido comprende menos del 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 1 %, o entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 5 %, ácidos grasos libres (no-esterificados) y/o fosfolípido, o inferior al 0,5 % de ácidos grasos libres (no-esterificados) y/o fosfolípido,
- xxxviii) al menos el 70 %, o al menos el 80 %, del DHA esterificado en forma de TAG está en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG,
- 15 xxxviii) la especie de TAG que contiene DHA de manera más abundante en el lípido es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12), y
- xxxix) el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18).

20 En otra realización, el lípido extraído está en la forma de un aceite, donde al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o entre aproximadamente el 95 % y aproximadamente el 98 %, en peso del aceite es el lípido.

En un aspecto, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido total de ácido graso del lípido o aceite, el nivel de DHA es de entre aproximadamente el 7 % y el 20 %, el nivel de ácido palmítico es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %, el nivel de ácido mirístico es inferior a aproximadamente el 6 %, el nivel de ácido oleico es de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 30 %, el nivel de LA es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, ALA está presente, GLA está presente, el nivel de SDA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, el nivel de ETA es inferior a aproximadamente el 4 %, el nivel de EPA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 10 %, el nivel de DPA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 8 %, el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 25 %, el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, el nivel de ácidos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 75 %, la relación de ácidos grasos ω 6 totales:ácidos grasos ω 3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 3,0, la relación de ácidos grasos ω 6 nuevos: ácidos grasos ω 3 nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0, preferentemente inferior a aproximadamente 0,50, la composición de ácidos grasos del lípido está basado en: una eficacia de conversión de ácido oleico a LA mediante Δ 12-desaturasa de al menos aproximadamente el 60 %, una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA mediante Δ 6-elongasa de al menos aproximadamente el 60 %, una eficacia de conversión de EPA a DPA mediante Δ 5-elongasa de entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, una eficacia de conversión de DPA a DHA mediante Δ 4-desaturasa de entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de al menos aproximadamente el 10 %, y el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es al menos aproximadamente el 70 %, y opcionalmente el lípido carece esencialmente de colesterol y/o el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18).

En otro aspecto, el aceite o lípido, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido total de ácidos grasos, el nivel de DHA es de entre aproximadamente el 7 % y el 20 %, el nivel de ácido palmítico es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %, el nivel de ácido mirístico es inferior a aproximadamente el 2 %, el nivel de ácido oleico es de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 30 %, el nivel de LA es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, el nivel de ALA es de entre aproximadamente el 7 % y aproximadamente el 40 %, el nivel de GLA es inferior a aproximadamente el 4 %, el nivel de SDA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, el nivel de ETA es inferior a aproximadamente el 4 %, el nivel de ETrA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, el nivel de EPA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 10 %, el nivel de DPA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 8 %, el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 25 %, el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 75 %, el nivel de ácidos grasos ω 6 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 10 %, el nivel de ácidos grasos ω 3 totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 36 % y aproximadamente el 75 %, el nivel de ácidos grasos ω 3 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 9 % y aproximadamente el 33 %, la relación de ácidos grasos ω 6 totales: ácidos grasos ω 3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre

aproximadamente 0,05 y aproximadamente 3,0, la relación de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos: ácidos grasos $\omega 3$ nuevos totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0, la composición de ácidos grasos del lípido está basado en: una eficacia de conversión de ácido oleico a LA mediante $\Delta 12$ -desaturasa de al menos aproximadamente el 60 %, una eficacia de conversión de SDA a ácido ETA mediante $\Delta 6$ -elongasa de al menos aproximadamente el 60 %, una eficacia de conversión de ETA a EPA mediante $\Delta 5$ -desaturasa de al menos aproximadamente el 60 %, una eficacia de conversión de EPA a DPA mediante $\Delta 5$ -elongasa de entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, una eficacia de conversión de DPA a DHA mediante $\Delta 4$ -desaturasa de entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de al menos aproximadamente el 10 %, una eficacia de conversión de LA a DHA de al menos aproximadamente el 15 %, una eficacia de conversión de ALA a DHA de al menos aproximadamente el 17 %, y el contenido total de ácidos grasos en el lípido extraído tiene menos que el 1 % C20:1, el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es al menos aproximadamente el 70 %, el lípido carece esencialmente de colesterol y el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18). Preferentemente, el lípido o aceite es aceite de colza y/o no ha sido tratado con un proceso de transesterificación después de que se extrajo de la planta o parte de la planta. En un aspecto particular, el lípido o aceite de colza se puede tratar posteriormente para convertir los ácidos grasos en el aceite en ésteres de alquilo tales como ésteres de etilo o metilo. Se pueden aplicar tratamientos adicionales para enriquecer el lípido o aceite para el DHA.

En un aspecto, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido total de ácidos grasos del lípido, el nivel de DHA es de entre aproximadamente el 7 % y el 20 %, el nivel de ácido palmítico es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %, el nivel de ácido mirístico es inferior a aproximadamente el 2 %, el nivel de ácido oleico es de entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 60 %, preferentemente entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 %, el nivel de LA es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %, el nivel de ALA es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %, el nivel de GLA es inferior a aproximadamente el 3 %, el nivel de SDA es inferior a aproximadamente el 3 %, el nivel de ETA es inferior a aproximadamente el 4 %, el nivel de ETrA inferior a aproximadamente el 2 %, el nivel de EPA es inferior a aproximadamente el 4 %, el nivel de DPA es inferior a aproximadamente el 4 %, el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 25 %, el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácido graso de los lípidos extraídos es de entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 60 %, o entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 60 %, el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 75 %, el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 10 %, el nivel de total ácidos grasos $\omega 3$ en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 9 % y aproximadamente el 20 %, la relación de ácidos grasos $\omega 6$ totales:ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 0,05 y aproximadamente el 3,0, preferentemente inferior a aproximadamente el 0,50, la relación de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos:ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido total de ácido graso del lípido extraído es de entre aproximadamente el 0,03 y aproximadamente el 3,0, el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es al menos aproximadamente el 70 %, el lípido carece esencialmente de colesterol, y el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18). Preferentemente, el lípido o aceite esencialmente carece de SDA, EPA y ETA y/o es aceite de colza y/o no ha sido tratado con un proceso de transesterificación después de que se extrajo de la planta o parte de la planta. En un aspecto particular, el lípido o aceite de colza se puede tratar posteriormente para convertir los ácidos grasos en el aceite en ésteres de alquilo tales como ésteres de etilo o metilo. Se pueden aplicar tratamientos adicionales para enriquecer el lípido o aceite para el DHA.

En un aspecto adicional, el lípido o aceite, preferentemente un aceite de semilla, tiene las siguientes características: en el contenido total de ácido graso de lípido o aceite, el nivel de DHA es de entre aproximadamente el 7 % y el 20 %, el nivel de ácido palmítico es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %, el nivel de ácido mirístico es inferior a aproximadamente el 6 %, el nivel de ácido oleico es de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 30 %, el nivel de LA es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, ALA está presente, GLA está presente, el nivel de SDA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, el nivel de ETA es inferior a aproximadamente el 6 %, el nivel de EPA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 10 %, el nivel de DPA es de entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 8 %.

En una realización adicional, el lípido extraído comprende adicionalmente uno o más esteroides, preferentemente esteroides vegetales.

En otra realización, el lípido extraído está en la forma de un aceite y comprende menos de 10 mg de esteroides/g de aceite, menos de 7 mg de esteroides/g de aceite, entre 1,5 mg y 10 mg de esteroides/g de aceite, o entre 1,5 mg y 7 mg de esteroides/g de aceite.

Los ejemplos de esteroides que pueden estar en el lípido extraído incluyen, pero sin limitación, uno o más o todos de campesterol/24-metilcolesterol, $\Delta 5$ -estigmasterol, eburicol, β -sitosterol/24-etilcolesterol, $\Delta 5$ -avenasterol/isofucosterol, $\Delta 7$ -estigmasterol/estigmast-7-en-3 β -ol, y $\Delta 7$ -avenasterol.

En una realización, la especie de planta es una enumerada en la Tabla 26, tal como colza, y el nivel de esteroides son aproximadamente los mismos que están enumerados en la Tabla 26 para esa especie vegetal particular.

- 5 En una realización, el lípido extraído comprende menos de aproximadamente 0,5 mg de colesterol/g de aceite, menos de aproximadamente 0,25 mg de colesterol/g de aceite, entre aproximadamente 0 mg y aproximadamente 0,5 mg de colesterol/g de aceite, o entre aproximadamente 0 mg y aproximadamente 0,25 mg de colesterol/g de aceite, o carece esencialmente de colesterol.
- 10 En una realización adicional, el lípido es un aceite, preferentemente aceite de una semilla de aceite. Los ejemplos de dichos aceites incluyen, pero sin limitación, aceite de *Brassica sp.* tal como aceite de colza, aceite de *Gossypium hirsutum*, aceite de *Linum usitatissimum*, aceite de *Helianthus sp.*, aceite de *Carthamus tinctorius*, aceite de *Glycine max*, aceite de *Zea mays*, aceite de *Arabidopsis thaliana*, aceite de *Sorghum bicolor*, aceite de *Sorghum vulgare*, aceite de *Avena sativa*, aceite de *Trifolium sp.*, aceite de *Elaeis guineensis*, aceite de *Nicotiana benthamiana*, aceite de *Hordeum vulgare*, aceite de *Lupinus angustifolius*, aceite de *Oryza sativa*, aceite de *Oryza glaberrima*, aceite de *Camelina sativa*, aceite de *Crambe abyssinica*, aceite de *Miscanthus x giganteus*, o aceite de *Miscanthus sinensis*.

También se describe el lípido vegetal extraído, preferentemente extraído de aceite de semilla de colza que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, los ácidos grasos que comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos $\omega 6$ que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos $\omega 3$ que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el lípido tiene las siguientes características en el contenido total de ácidos grasos del lípido:

- 25 i) el nivel de DHA es de aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 % o aproximadamente el 7 %,
 ii) el nivel de ácido palmítico es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %,
 iii) el nivel de ácido mirístico es inferior a aproximadamente el 2 %,
 iv) el nivel de ácido oleico es de entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 60 %, preferentemente
 30 aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 %,
 v) el nivel de LA es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %,
 vi) el nivel de ALA es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %,
 vii) el nivel de GLA es inferior a aproximadamente el 4 %,
 viii) el nivel de SDA es inferior a aproximadamente el 6 %, o inferior a aproximadamente el 4 %,
 35 ix) el nivel de ETA es inferior a aproximadamente el 6 %, o inferior a aproximadamente el 4 %,
 x) el nivel de ETrA es inferior a aproximadamente el 1 %,
 xi) el nivel de EPA es inferior a aproximadamente el 10 % y/o el nivel de EPA es 0,5-2,0 veces el nivel de DHA,
 xii) el nivel de DPA es inferior a aproximadamente el 4 %,
 xiii) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácidos grasos de lípido extraído es de
 40 entre aproximadamente el 4 % y el 25 %,
 xiv) el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido de ácidos grasos de lípido extraído es de entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 70 %,
 xv) el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 75 %, o preferentemente entre aproximadamente el
 45 15 % y aproximadamente el 30 %,
 xvi) el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 10 %,
 xvii) el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 10 % y el 20 %,
 50 xviii) el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 20 %,
 xix) la relación de ácidos grasos $\omega 6$ totales: ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 3,0, preferentemente menos que aproximadamente 0,50,
 55 xx) la relación de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos: ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0,
 xxi) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es al menos aproximadamente el 70 %, y
 xxii) el lípido carece esencialmente de colesterol. En un aspecto, el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18). Más preferentemente, el lípido carece esencialmente de SDA y ETA y/o no ha sido tratado con un proceso de transesterificación después de que se extrajo de la planta o parte de la planta.
 60

En otro aspecto, se describe lípido vegetal extraído, donde el lípido comprende ácidos grasos en forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos $\omega 6$ que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos $\omega 3$ que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde (i) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de

entre el 7 % y el 20 %, (ii) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, (iii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 6 %, (iv) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 1 % y el 30 % o entre el 30 % y el 60 %, (v) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 4 % y el 35 %, (vi) el nivel de ácido α -linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 40 %, (vii) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, (viii) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 25 %, (ix) la relación de ácidos grasos ω 6 totales:ácidos grasos ω 3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0 o entre 0,1 y 1, (x) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos el 70 %, y (xi) al menos el 70 % del DHA esterificado en forma de TAG se encuentra en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG. En un aspecto, una o más o todas de las siguientes características

- i) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 15 %,
- ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %,
- iii) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 30 %, entre el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 % o es de aproximadamente el 30 %.
- iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %, o entre aproximadamente el 4 % y el 17 %,
- v) el nivel de ácido α -linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 7 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 4 % y el 16 %,
- vi) el nivel de ácido γ -linolénico (GLA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a aproximadamente el 0,5 %, entre el 0,05 % y el 7 %, entre el 0,05 % y el 4 %, o de entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- vii) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- viii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 4 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a aproximadamente el 0,5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- ix) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 2 %, inferior a aproximadamente el 1 %, entre el 0,05 % y el 4 %, entre el 0,05 % y el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 1 %,
- x) el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, entre el 0,05 % y el 10 %, entre el 0,05 % y 5 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- xi) el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, entre el 0,05 % y el 8 %, entre el 0,05 % y 5 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- xii) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, entre aproximadamente el 8 % y el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y el 20 %, entre aproximadamente el 11 % y el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 16 %, o entre aproximadamente el 14 % y el 20 %,
- xiii) el lípido comprende ácido ω 6-docosapentaenoico (22:5 Δ 4,7,10,13,16) en su contenido de ácido graso,
- xiv) el lípido carece esencialmente de ácido ω 6-docosapentaenoico (22:5 Δ 4,7,10,13,16) en su contenido de ácido graso,
- xv) el lípido carece esencialmente de SDA, EPA y ETA en su contenido de ácidos grasos,
- xvi) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %, o entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 20 %,
- xvii) el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 25 %, o entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 22 %.
- xviii) el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 75 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 75 %, o entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 75 %.
- xix) el nivel de ácidos grasos ω 6 totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre

- aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 6 % y el 20 %, inferior al 20 %, inferior a aproximadamente el 16 %, inferior a aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 16 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 10 %, o entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 10 %,
- 5 xx) el nivel de ácidos grasos ω 6 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 10 %, inferior a aproximadamente el 8 %, inferior a aproximadamente el 6 %, inferior a aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre el 1 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 8 %, o entre aproximadamente el 0,5 % y el 4 %,
- 10 xxi) el nivel de ácidos grasos ω 3 totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 36 % y aproximadamente el 65 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre 10 % y aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 % o aproximadamente el 40 %,
- 15 xxii) el nivel de ácidos grasos ω 3 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 9 % y aproximadamente el 33 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 12 % y aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 17 % o aproximadamente el 20 %,
- 20 xxiii) la relación de ácidos grasos ω 6 totales:ácidos grasos ω 3 totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, inferior a aproximadamente 0,50, inferior a aproximadamente 0,40, inferior a aproximadamente 0,30, inferior a aproximadamente 0,20, inferior a aproximadamente 0,15, aproximadamente 1,0, aproximadamente 0,1 o aproximadamente 0,2,
- 25 xxiv) la relación de ácidos grasos ω 6 nuevos:ácidos grasos ω 3 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3,0, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, inferior a aproximadamente 0,50, inferior a aproximadamente 0,40, inferior a aproximadamente 0,30, inferior a aproximadamente 0,20, inferior a aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2 o aproximadamente 1,0,
- 30 xxv) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 25 %,
- 35 xxvi) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de LA a DHA de al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %,
- 40 xxvii) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a DHA de al menos aproximadamente el 17 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 24 %, entre aproximadamente el 17 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 24 % y aproximadamente el 35 %,
- 45 xxviii) el total de ácidos grasos en el lípido extraído tiene menos del 1 % de C20:1,
- 50 xxix) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos el 95 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 99 %, o entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 99 %,
- 55 xxx) el lípido comprende diacilglicerol (DAG),
- 60 xxxi) el lípido comprende menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 1 %, o entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 5 %, ácidos grasos libres (no-esterificados) y/o fosfolípido, o carece esencialmente de estos,
- xxxii) al menos el 80 %, del DHA esterificado en forma de TAG está en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG,
- xxxiii) la especie de TAG que contiene DHA de manera más abundante en el lípido es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12), y
- xxxiv) el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18).

Específicamente, con respecto a el aspecto anterior, en un aspecto

- 55 i) el lípido se encuentra en forma de un aceite, donde el aceite comprende uno o más esteroides tal como uno o más o todos de campesterol, Δ 5-estigmasterol, eburicol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, Δ 7-estigmasterol y Δ 7-avenasterol, y opcionalmente el aceite comprende menos que 10 mg de esteroides/g de aceite y/o el aceite carece esencialmente de colesterol, y/o
- 60 ii) el lípido se encuentra en forma de un aceite de una semilla oleaginosa tal como una oleaginosa de Brassica sp o semilla de colza.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir lípidos vegetales extraídos, que comprende las etapas de

- 65 i) obtener una parte de una planta que comprende lípidos que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω 6 que comprenden

ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω 3 que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es del 7 % al 20 %, y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %, y

ii) extraer de lípido de la parte de la planta,

donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es del 7 % al 20 %, y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %.

En una realización preferida, el lípido extraído tiene una o más de las características definidas anteriormente.

En una realización, la parte de la planta es una semilla, preferentemente una semilla de aceite. Los ejemplos de dichas semillas incluyen, pero sin limitación, semillas de *Brassica sp.*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaeis guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, o *Crambe abyssinica*, preferentemente una *Brassica napus*, *B juncea* o *C. sativa*.

En otra realización, la semilla comprende al menos aproximadamente 18 mg, al menos aproximadamente 22 mg, al menos aproximadamente 26 mg, entre aproximadamente 18 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 22 mg y aproximadamente 70 mg, o entre aproximadamente 24 mg y aproximadamente 50 mg, de DHA por gramo de semilla.

En una realización adicional, la parte de la planta comprende polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;

- i) una ω 3-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,
- ii) una Δ 15-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,
- iii) una Δ 12-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,
- iv) una Δ 12-desaturasa, a ω 3-desaturasa o una Δ 15-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, a Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,
- v) una ω 3-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,
- vi) una Δ 15-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,
- vii) una Δ 12-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa, o
- viii) una Δ 12-desaturasa, una ω 3-desaturasa o una Δ 15-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,

y donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de la planta.

En otra realización adicional, la parte de la planta tiene una o más o todas las siguientes características

- i) la Δ 12-desaturasa convierte ácido oleico en ácido linoleico en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 98 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 90 %,
- ii) la ω 3-desaturasa convierte ácidos grasos en ácidos grasos ω 3 en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 65 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, entre aproximadamente el 65 % y aproximadamente el 95 %, entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 95 %,
- iii) la Δ 6-desaturasa convierte ALA en SDA en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 70 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 60 %, o entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 70 %,
- iv) la Δ 6-desaturasa convierte ácido linoleico en ácido γ -linolénico en una o más células de la planta con una eficacia inferior al 5 %, inferior a aproximadamente el 2,5 %, inferior a aproximadamente el 1 %, entre

- aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 2,5 %, o entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 1 %,
- v) la $\Delta 6$ -elongasa convierte SDA en ETA en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 95 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 88 %, o entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 85 %,
- 5 vi) la $\Delta 5$ -desaturasa convierte ETA en EPA en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 99 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 99 %, o entre aproximadamente el 75 % y aproximadamente el 98 %,
- 10 vii) la $\Delta 5$ -elongasa convierte EPA en DPA en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 95 %,
- 15 viii) la $\Delta 4$ -desaturasa convierte DPA en DHA en una o más células de la planta con una eficacia de al menos el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 93 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 95 %, entre aproximadamente el 80 % y aproximadamente el 95 %, o entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 95 %,
- 20 ix) la eficacia de conversión del ácido oleico en DHA en una o más células de la parte de la planta es de al menos el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 25 %,
- x) la eficacia de conversión de LA en DHA en una o más células de la parte de la planta es de al menos el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %,
- 25 xi) la eficacia de conversión de ALA en DHA en una o más células de la parte de la planta es de al menos el 17 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 24 %, entre aproximadamente el 17 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 24 % y aproximadamente el 35 %,
- 30 xii) una o más células de la parte de la planta comprende al menos el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 22,5 % y aproximadamente el 27,5 %, más de ácidos grasos $\omega 3$ que las células correspondientes con deficiencia de polinucleótidos exógenos,
- 35 xiii) la $\Delta 6$ -desaturasa preferentemente desatura el ácido α -linolénico (ALA) relacionado al ácido linoleico (LA),
- xiv) la $\Delta 6$ -elongasa tiene, además, actividad de $\Delta 9$ -elongasa,
- xv) la $\Delta 12$ -desaturasa tiene, además, actividad de $\Delta 15$ -desaturasa,
- xvi) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene, además, actividad de $\Delta 8$ -desaturasa,
- xvii) la $\Delta 8$ -desaturasa tiene, además, actividad de $\Delta 6$ -desaturasa o no tiene actividad de $\Delta 6$ -desaturasa,
- 40 xviii) la $\Delta 15$ -desaturasa tiene, además, actividad de $\omega 3$ -desaturasa en GLA,
- xix) la $\omega 3$ -desaturasa tiene, además, actividad de $\Delta 15$ -desaturasa en LA,
- xx) la $\omega 3$ -desaturasa desatura ambos LA y/o GLA,
- xxi) la $\omega 3$ -desaturasa preferentemente desatura GLA en comparación con LA,
- 45 xxii) el nivel de DHA en la parte de la planta se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico en DHA en la parte de la planta de al menos el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %,
- 50 xxiii) el nivel de DHA en la parte de la planta se basa en una eficacia de conversión de LA en DHA en la parte de la planta de al menos el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 22 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, o entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 30 %,
- 55 xxiv) el nivel de DHA en la parte de la planta se basa en una eficacia de conversión de ALA en DHA en la parte de la planta de al menos el 17 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 24 %, entre aproximadamente el 17 % y aproximadamente el 65 %, entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 24 % y aproximadamente el 35 %,
- xxx) una o más o todas las desaturasas tienen mayor actividad en un sustrato de acil-CoA que un sustrato de acil-PC correspondiente,
- 60 xxxi) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene mayor actividad de $\Delta 6$ -desaturasa en ALA que LA como sustrato de ácido graso,
- xxxii) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene mayor actividad de $\Delta 6$ -desaturasa en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA unida a la posición *sn-2* de PC como sustrato de ácido graso,
- 65 xxxiii) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene al menos una actividad de $\Delta 6$ -desaturasa 2 veces mayor, al menos una actividad 3 veces mayor, al menos una actividad 4 veces mayor, o al menos actividad 5 veces mayor, en ALA como un sustrato en comparación con LA,
- xxxiv) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene mayor actividad en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA ligada a la posición *sn-2* de PC como sustrato de ácido graso,
- xxxv) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene al menos una actividad de $\Delta 6$ -desaturasa 5 veces mayor o al menos una actividad

10 veces mayor, en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA ligada a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,
 xxxvi) la desaturasa es una desaturasa del extremo frontal,
 xxxvii) la $\Delta 6$ -desaturasa no tiene actividad de $\Delta 5$ -desaturasa detectable en ETA.

5

En una realización adicional más, la parte de la planta tiene una o más o todas las siguientes características

10 i) la $\Delta 12$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:10, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:10,

ii) la $\omega 3$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:12, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:12,

15 iii) la $\Delta 6$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:16, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:16,

iv) la $\Delta 6$ -elongasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:25, un fragmento biológicamente activo de estos, tal como, SEQ ID NO:26 o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:25 y/o la SEQ ID NO:26,

20 v) la $\Delta 5$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:30, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:30,

vi) la $\Delta 5$ -elongasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:37, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:37,

25 vii) la $\Delta 4$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:41, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:41,

30 En una realización, la parte de la planta comprende adicionalmente un polinucleótido exógeno que codifica una diacilglicerol aciltransferasa (DGAT, por sus siglas en inglés), monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT, por sus siglas en inglés), glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT, por sus siglas en inglés), 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT, por sus siglas en inglés) preferentemente un LPAAT que puede usar un sustrato de acil-CoA graso poliinsaturado C22, acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT, por sus siglas en inglés), fosfolipasa A2 (PLA2), fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés), fosfolipasa D (PLD, por sus siglas en inglés), CDP-colina diacilglicerol, colina fosfotransferasa (CPT, por sus siglas en inglés), fosfatidilcolina diacilglicerol aciltransferasa (PDAT, por sus siglas en inglés), fosfatidilcolina:diacilglicerol colina fosfotransferasa (PDCT, por sus siglas en inglés), acil-CoA sintasa (ACS, por sus siglas en inglés), o una combinación de dos o más de estos.

40 En otra realización, la parte de la planta comprende adicionalmente una mutación introducida o un polinucleótido exógeno que regula por disminución la producción y/o actividad de una enzima endógena en una célula de la parte de la planta seleccionada entre FAE1, DGAT, MGAT, GPAT, LPAAT, LPCAT, PLA2, PLC, PLD, CPT, PDAT, una tioesterasa tal como FATB, o una $\Delta 12$ -desaturasa, o una combinación de uno o más de estos.

45 En una realización adicional, al menos uno o todos los promotores son promotores específicos de semillas. En una realización, al menos uno, o todos los promotores se obtuvieron de biosíntesis de aceite o genes de acumulación tales como la oleosina, o de genes de proteína de almacenamiento, tales como la conlininaa.

50 En otra realización, el o los promotores que dirigen la expresión de los polinucleótidos exógenos que codifican la $\Delta 4$ -desaturasa y la $\Delta 5$ -elongasa inician la expresión de los polinucleótidos en la semilla de la parte de la planta en desarrollo antes, o alcanzan el pico de expresión antes que el o los promotores que dirigen la expresión de los polinucleótidos exógenos que codifican la $\Delta 12$ -desaturasa y la $\omega 3$ -desaturasa.

55 En otra realización, los polinucleótidos exógenos se enlazan covalentemente en una molécula de ADN, preferentemente una molécula de ADN-T, integrada al genoma de las células de la parte de la planta y preferentemente donde el número de dichas moléculas de ADN integradas al genoma de las células de la parte de la planta no es más que uno, dos o tres, o es dos o tres.

60 En otra realización más, la planta comprende al menos dos polinucleótidos exógenos diferentes que codifican cada uno una $\Delta 6$ -desaturasa que tiene las mismas u otras secuencias de aminoácidos.

65 En una realización adicional, el contenido total de aceite de la parte de la planta que comprende los polinucleótidos exógenos es de al menos el 40 %, o al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 %, o al menos aproximadamente el 70 %, o entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 80 % del contenido total de aceite de una parte de la planta correspondiente con deficiencia de polinucleótidos exógenos. En estas realizaciones, el contenido máximo de aceite puede ser de aproximadamente el 100 % del contenido de aceite de

una parte de planta de tipo silvestre correspondiente.

En otra realización, el lípido está en forma de aceite, preferentemente un aceite de semilla de una oleaginosa, y donde al menos el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o entre
5 aproximadamente el 95 % y aproximadamente el 98 %, en peso del lípido es triacilglicerol.

En una realización adicional, el proceso comprende adicionalmente tratar el lípido para aumentar el nivel de DHA como un porcentaje del contenido total de ácido graso. Por ejemplo, el tratamiento es transesterificación. Por ejemplo, el lípido tal como aceite de colza se puede tratar para convertir los ácidos grasos en el aceite en ésteres de
10 alquilo como metilo o ésteres de etilo, que luego se pueden fraccionar para enriquecer el lípido o aceite para el DHA.

Además, se describe un proceso para producir un lípido vegetal extraído que comprende las siguientes etapas:

15 i) obtener una parte de una planta, preferentemente semilla de colza, que comprende lípidos que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos $\omega 6$ que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos $\omega 3$ que comprenden ácido α linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es de aproximadamente el 3 %
20 aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 % o aproximadamente el 7 %, y
ii) la extracción de lípido de la parte de la planta,

donde el lípido extraído tiene las siguientes características en el contenido total de ácidos grasos del lípido;

25 i) el nivel de DHA es de aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 % o aproximadamente el 7 %,
ii) el nivel de ácido palmítico es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %,
iii) el nivel de ácido mirístico es inferior a aproximadamente el 2 %,
iv) el nivel de ácido oleico es de entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 60 %, preferentemente
30 aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 %,
v) el nivel de LA es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %,
vi) el nivel de ALA es de entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 16 %,
vii) el nivel de GLA es inferior a aproximadamente el 4 %,
viii) el nivel de SDA es inferior a aproximadamente el 6 %, o inferior a aproximadamente el 4 %,
35 ix) el nivel de ETA es inferior a aproximadamente el 6 %, o inferior a aproximadamente el 4 %,
x) el nivel de ETrA es inferior a aproximadamente el 1 %,
xi) el nivel de EPA es inferior a aproximadamente el 10 % y/o el nivel de EPA es 0,5-2,0 veces el nivel de DHA,
xii) el nivel de DPA es inferior a aproximadamente el 4 %,
xiii) el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido de ácidos grasos de lípido extraído es de entre
40 aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 25 %,
xiv) el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos de lípido extraído es de entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 70 %,
xv) el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 75 %, o preferentemente entre aproximadamente el
45 15 % y aproximadamente el 30 %,
xvi) el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 10 %,
xvii) el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %,
50 xviii) el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 20 %,
xix) la relación de ácidos grasos $\omega 6$ totales: ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 3,0, preferentemente menos que aproximadamente 0,50,
55 xx) la relación de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos: ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 3,0,
xxi) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es al menos aproximadamente el 70 %, y
xxii) el lípido carece esencialmente de colesterol. En un aspecto, el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18). Más preferentemente, el lípido carece esencialmente de SDA y ETA y/o no ha sido tratado con un proceso de transesterificación después de que se extrajo de la planta o parte de la planta.
60

También se describe un proceso para producir un lípido vegetal extraído que comprende las siguientes etapas:

65 i) obtener una parte de planta que comprende un lípido, donde el lípido comprende ácidos grasos en forma esterificada, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos $\omega 6$ que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos $\omega 3$ que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido

docosahexaenoico (DHA), y uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde (i) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 7 % y el 20 %, (ii) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, (iii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 6 %, (iv) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 1 % y el 30 % o entre el 30 % y el 60 %, (v) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 35 %, (vi) el nivel de ácido α -linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 40 %, (vii) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, (viii) el nivel total de ácidos grasos saturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 25 %, (ix) la relación del total de ácidos grasos ω 6: total de ácidos grasos ω 3 en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0 o entre 0,1 y 1, (x) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos el 70 %, y (xi) al menos el 70 % del DHA esterificado en forma de TAG se encuentra en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG.

%, y
 ii) la extracción de lípido de la parte de la planta,

donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble es de aproximadamente el 7 % al 20 %.

También se describe un lípido, o aceite que comprende el lípido, producido usando un proceso de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para producir ésteres de etilo de ácidos grasos poliinsaturados: el proceso comprende trasesterificar los triacilgliceroles en el lípido vegetal extraído, donde el lípido vegetal extraído comprende ácidos grasos en una forma esterificada, los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω 6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω 3 que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente del 7 % al 20 %, para producir de esta manera ésteres de etilo, y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %, para producir de esta manera ésteres de etilo.

En un aspecto preferido, el lípido extraído tiene una o más de las características definidas anteriormente.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un proceso para producir ésteres de etilo de ácidos grasos poliinsaturados, donde el proceso comprende transesterificar los triacilgliceroles en el lípido vegetal extraído, donde el lípido vegetal extraído comprende ácidos grasos esterificados en forma de triacilgliceroles, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω 6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω 3 que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), donde (i) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 % o entre el 7 % y el 20 %, (ii) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraídos de entre el 2 % y el 16 %, (iii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 6 %, (iv) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 1 % y el 30 % o entre el 30 % y el 60 %, (v) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 35 %, (vi) el nivel de ácido α -linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 40 %, (vii) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, (viii) el nivel total de ácidos grasos saturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 25 %, (ix) la relación del total de ácidos grasos ω 6: total de ácidos grasos ω 3 en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0 o entre 0,1 y 1, (x) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos el 70 %, y (xi) al menos el 70 % del DHA esterificado en forma de TAG se encuentra en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG, para producir de esta manera ésteres de etilo. En un aspecto, el lípido vegetal extraído tiene una o más o todas las siguientes características:

- i) el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 15 %,
- ii) el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %,
- iii) el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 30 %, entre el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 60 % o es de aproximadamente el 30 %.
- iv) el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %, o entre aproximadamente el 4 % y el 17 %,
- v) el nivel de ácido α -linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre

- aproximadamente el 7 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 4 % y el 16 %,
- vi) el nivel de ácido γ -linolénico (GLA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a aproximadamente el 0,5 %, entre el 0,05 % y el 7 %, entre el 0,05 % y el 4 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- vii) el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 7 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- viii) el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 4 %, inferior a aproximadamente el 1 %, inferior a aproximadamente el 0,5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre aproximadamente el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- ix) el nivel de ácido eicosatrienoico (ETrA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 2 %, inferior a aproximadamente el 1 %, entre el 0,05 % y el 4 %, entre el 0,05 % y el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 1 %,
- x) el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, entre el 0,05 % y el 10 %, entre el 0,05 % y 5 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- xi) el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %, inferior a aproximadamente el 3 %, inferior a aproximadamente el 2 %, entre el 0,05 % y el 8 %, entre el 0,05 % y 5 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 3 %, o entre el 0,05 % y aproximadamente el 2 %,
- xii) el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, entre aproximadamente el 8 % y el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y el 20 %, entre aproximadamente el 11 % y el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 16 %, o entre aproximadamente el 14 % y el 20 %,
- xiii) el lípido comprende ácido ω 6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácido graso,
- xiv) el lípido es esencialmente libre de ácido ω 6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$) en su contenido de ácido graso,
- xv) el lípido carece esencialmente de SDA, EPA y ETA en su contenido de ácidos grasos,
- xvi) el nivel total de ácidos grasos saturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 %, o entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 20 %,
- xvii) el nivel total de ácidos grasos monoinsaturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 25 %, o entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 22 %,
- xviii) el nivel total de ácidos grasos poliinsaturados en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 75 %, entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 75 %, o entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 75 %,
- xix) el nivel total de ácidos grasos ω 6 en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 6 % y el 20 %, inferior al 20 %, inferior a aproximadamente el 16 %, inferior a aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 16 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 10 %, o entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 10 %,
- xx) el nivel de ácidos grasos ω 6 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior a aproximadamente el 10 % inferior a aproximadamente el 8 %, inferior a aproximadamente el 6 %, inferior al 4 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 8 %, o entre aproximadamente el 0,5 % y el 4 %,
- xxi) el nivel total de ácidos grasos ω 3 en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 36 % y aproximadamente el 65 %, entre el 40 % y aproximadamente el 60 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 % o aproximadamente el 40 %,
- xxii) el nivel de ácidos grasos ω 3 nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 9 % y aproximadamente el 33 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 12 % y aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 17 % o aproximadamente el 20 %,
- xxiii) la relación de total de ácidos grasos ω 6: total de ácidos grasos ω 3 en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, inferior a aproximadamente 0,50, inferior a aproximadamente 0,40, inferior a aproximadamente 0,30, inferior a aproximadamente 0,20, inferior a aproximadamente 0,15, aproximadamente 1,0, aproximadamente 0,1 o aproximadamente 0,2,
- xxiv) la relación de total de ácidos grasos ω 6:total de ácidos grasos ω 3 en el contenido de ácidos grasos del

- lípidos extraídos es de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 3,0, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5, inferior a aproximadamente 0,50, inferior a aproximadamente 0,40, inferior a aproximadamente 0,30, inferior a aproximadamente 0,20, inferior a aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2 o aproximadamente 1,0,
- 5 xxv) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ácido oleico a DHA de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 25 %,
- 10 xxvi) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de LA a DHA de al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, o entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %,
- 15 xxvii) la composición de ácido graso del lípido se basa en una eficacia de conversión de ALA a DHA de al menos aproximadamente el 17 %, al menos aproximadamente el 22 %, al menos aproximadamente el 24 %, entre aproximadamente el 17 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 22 % y aproximadamente el 35 %, o entre aproximadamente el 24 % y aproximadamente el 35 %,
- 20 xxviii) el total de ácidos grasos en el lípido extraído tiene menos del 1 % de C20:1,
- xxix) el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos el 95 %, entre aproximadamente el 70 % y aproximadamente el 99 %, o entre aproximadamente el 90 % y aproximadamente el 99 %,
- 25 xxx) el lípido comprende diacilglicerol (DAG),
- xxxi) el lípido comprende menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 1 %, o entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 5 %, ácidos grasos libres (no-esterificados) y/o fosfolípido, o es esencialmente libre de estos,
- 30 xxxii) al menos el 80 %, del DHA esterificado en forma de TAG está en la posición *sn*-1 o *sn*-3 del TAG,
- 35 xxxiii) la especie de TAG que contiene DHA de manera más abundante en el lípido es DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12), y
- 40 xxxiv) el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18).
- 30 Con respecto al aspecto anterior en particular, en un aspecto, se aplica una o más o todas las siguientes características
- i) el lípido se encuentra en forma de un aceite, donde el aceite comprende uno o más esteroides tal como uno o más o todos de campesterol, Δ 5-estigmasterol, eburicol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, Δ 7-estigmasterol y Δ 7-avenasterol, y opcionalmente el aceite comprende menos que 10 mg de esteroides/g de aceite y/o el aceite carece esencialmente de colesterol,
- 35 ii) el lípido se encuentra en forma de un aceite de una semilla oleaginosa tal como una semilla oleaginosa de Brassica sp o semilla de colza,
- 40 iii) el nivel de DHA en contenido total de ácidos grasos del lípido vegetal extraído es de aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, o es de entre el 7 % y el 20 %.

En un aspecto adicional, la presente solicitud describe una construcción genética quimérica que comprende en orden un primer gen, un segundo gen, un tercer gen, un cuarto gen, un quinto gen y un sexto gen que se enlazan todos covalentemente en una molécula de ADN simple,

45 donde el primer, segundo y tercer gen se unen como un primer conglomerado de genes y el cuarto, quinto y sexto se unen como un segundo conglomerado de genes,

donde cada gen comprende un promotor, una región de codificación y un terminador de transcripción y/o región de poliadenilación de manera que cada promotor se enlaza operativamente a la región de codificación y al terminador de transcripción y/o región de poliadenilación,

50 donde cada promotor es, de manera independiente, idéntico o diferente a los otros promotores de manera que la molécula de ADN comprende tres, cuatro, cinco o seis promotores diferentes,

donde uno o más o todos los promotores son heterólogos con respecto a la región de codificación a la cual se enlaza operativamente,

55 donde la dirección de transcripción del primer gen está lejos del tercer gen y es opuesta a la dirección de transcripción del tercer gen,

donde la dirección de transcripción del cuarto gen está lejos del sexto gen y es opuesta a la dirección de transcripción del sexto gen,

60 donde la dirección de transcripción del segundo gen es la misma que para el primer gen o el tercer gen,

donde la dirección de transcripción del quinto gen es la misma que para el cuarto gen o el sexto gen,

donde el terminador de transcripción y/o región de poliadenilación del segundo gen está separada del promotor del primer o el tercer gen, el que esté más próximo, mediante una primera región separadora de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 3,0 kilobases,

65 donde el primer conglomerado de genes está separado del segundo conglomerado de genes mediante una segunda región separadora de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 10,0 kilobases, y

donde el terminador de transcripción y/o región de poliadenilación del quinto gen está separado del promotor del cuarto o el sexto gen, del que esté más próximo, mediante una tercera región separadora de entre aproximadamente

0,2 y aproximadamente 3,0 kilobases.

5 En un aspecto, la molécula de ADN comprende un séptimo gen que está separado del primer conglomerado de genes o del segundo conglomerado de genes, del que esté más próximo, mediante una región espaciadora de entre aproximadamente el 1,0 y aproximadamente el 10,0 kilobases.

En otro aspecto, la molécula de ADN comprende dos o más terminadores de transcripción y/o regiones de poliadenilación diferentes.

10 En otro aspecto más, al menos una de las regiones espaciadoras comprende una región de unión a la matriz (MAR).

En un aspecto adicional, la molécula de ADN comprende regiones de borde derecho e izquierdo que flanquean a los genes y es una molécula de ADN-T.

15 En otro aspecto, la construcción genética es una célula de *Agrobacterium* o está integrada en el genoma de una célula vegetal.

20 En un aspecto preferido, al menos uno de los genes codifica una desaturasa de ácido graso o una elongasa de ácido graso.

En otro aspecto, la construcción genética comprende genes que codifican un conjunto de enzimas tal como se define en el presente documento, y/o donde uno o más de los genes codifican una enzima tal como se define en el presente documento.

25 En un aspecto adicional, la presente solicitud describe un polinucleótido aislado y/o exógeno que comprende:

i) una secuencia de nucleótidos seleccionada entre una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 o 45, y/o

30 ii) una secuencia de nucleótidos que son idénticos en al menos un 95 % o idénticos en un 99 % a una o más de las secuencias que se establecen en las SEQ ID NO: 1 a 9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 o 45.

En un aspecto particularmente preferido, el polinucleótido aislado y/o exógeno comprende:

i) una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, y/o

35 ii) una secuencia de nucleótidos que son idénticos en al menos un 95 % o idénticos en un 99 % a la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la presente solicitud describe un vector o una construcción genética que comprende el polinucleótido de la invención y/o la construcción genética de la invención.

40 En un aspecto, la secuencia de nucleótidos se selecciona entre cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 o 45, o la secuencia de nucleótidos que es al menos idéntica en un 95 % o idéntica en un 99 % a una o más de las secuencias que se establecen en las SEQ ID NO: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 o 45, se enlaza operativamente a un promotor.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;

50 i) una ω 3-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,

ii) una Δ 15-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,

iii) una Δ 12-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,

55 iv) una Δ 12-desaturasa, una ω 3-desaturasa o una Δ 15-desaturasa, una Δ 6-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa,

v) una ω 3-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,

60 vi) una Δ 15-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,

vii) una Δ 12-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa, o

viii) una Δ 12-desaturasa, una ω 3-desaturasa o una Δ 15-desaturasa, una Δ 8-desaturasa, una Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,

65 y donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la

expresión de dichos polinucleótidos en la célula, y donde la célula comprende un lípido como se define en la presente invención.

En una realización, una o más o todas las desaturasas o elongasas tiene una o más de las características definidas anteriormente.

- 5 En otro aspecto, la presente solicitud describe una célula hospedadora que comprende
- 10 i) un primer polinucleótido exógeno que codifica una $\Delta 12$ -desaturasa que comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:10, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:10,
- 15 ii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica una $\omega 3$ -desaturasa que comprende aminoácidos que tienen la secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:12, un fragmento biológicamente activo de estos, o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a la SEQ ID NO:12,
- 15 donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula.

20 En un aspecto adicional, la presente solicitud describe una célula hospedadora que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención, la construcción genética de la invención, o el vector o construcción genética como se describe en la presente solicitud.

En una realización, la célula está en una planta, en una parte de planta y/o es una célula de semilla vegetal madura.

25 En una realización, la planta o la semilla vegetal es una planta oleaginosa o una semilla oleaginosa, respectivamente.

También se proporciona una planta transgénica que comprende una célula de la invención. Preferentemente, la planta es una planta oleaginosa o *Arabidopsis thaliana*. En una realización, la planta es una planta *Brassica*, preferentemente *B. napus* o *B. juncea*, o una planta diferente de *Arabidopsis thaliana*.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una planta oleaginosa que comprende

- a) un lípido en su semilla, el lípido comprende ácidos grasos en una forma esterificada, y
b) polinucleótidos exógenos que codifican uno o más de los siguientes conjuntos de enzimas:

- 35 i) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\omega 3$ -desaturasa fúngica o una $\Delta 15$ -desaturasa fúngica, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa, o
ii) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\omega 3$ -desaturasa fúngica o una $\Delta 15$ -desaturasa fúngica, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,

40 donde cada polinucleótido se enlaza operativamente a uno o más promotores específicos de las semillas que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en las semillas de la planta en desarrollo, donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos $\omega 6$ que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ -linolénico (GLA), ácidos grasos $\omega 3$ que comprenden ácido α -linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), y donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido es del 7 % al 20 %, y donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %.

50 Los ejemplos de plantas oleaginosas incluyen, pero sin limitación, *Brassica sp.*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaeisis guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, o *Crambe abyssinica*. En una realización, la planta oleaginosa es una planta de colza, *Glycine max*, *Camelina sativa* o *Arabidopsis thaliana*. En una realización
55 alternativa, la planta oleaginosa es diferente de *A. thaliana*.

En una realización, una o más de las desaturasas es capaz de usar un sustrato de acil-CoA. En una realización preferida, una o más de $\Delta 6$ -desaturasa, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 4$ -desaturasa y $\Delta 8$ -desaturasa, si están presentes, son capaces de usar un sustrato de acil-CoA, preferentemente cada una de las i) $\Delta 6$ -desaturasa, $\Delta 5$ -desaturasa y $\Delta 4$ -desaturasa o ii) $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 4$ -desaturasa y $\Delta 8$ -desaturasa es capaz de usar un sustrato de acil-CoA. En una
60 realización, una $\Delta 12$ -desaturasa y/o una $\omega 3$ -desaturasa es capaz de usar un sustrato de acil-CoA. El sustrato de acil-CoA es preferentemente un ALA-CoA, ETA-CoA, DPA-CoA, ETrA-CoA, LA-CoA, GLA-CoA, o ARA-CoA.

En una realización, la semilla madura cosechada de la planta tiene un contenido de DHA de al menos 28 mg por gramo de semilla, preferentemente al menos aproximadamente 32 mg por gramo de semilla, al menos
65 aproximadamente 36 mg por gramo de semilla, al menos aproximadamente 40 mg por gramo de semilla, más

preferentemente al menos aproximadamente 44 mg por gramo de semilla o al menos aproximadamente 48 mg por gramo de semilla. El contenido máximo de DHA puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 100 mg por gramo de semilla, o aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg por gramo de semilla.

5 En un aspecto adicional, la presente invención describe una planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* que es capaz de producir semillas que comprendan DHA, donde la semilla madura cosechada de la planta tiene un contenido de DHA de al menos aproximadamente 28 mg por gramo de semilla, preferentemente al menos aproximadamente 32 mg por gramo de semilla, al menos aproximadamente 36 mg por gramo de semilla, al menos aproximadamente 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente al menos aproximadamente 44 mg por gramo de semilla o al menos aproximadamente 48 mg por gramo de semilla. El contenido máximo de DHA puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 100 mg por gramo de semilla, o aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg por gramo de semilla.

15 En otro aspecto, la presente solicitud describe una célula vegetal de una planta de la invención que comprende los polinucleótidos exógenos.

También se proporciona una parte de planta, preferentemente una semilla, que tiene una o más de las siguientes características:

- 20 i) es de una planta de la invención,
- ii) comprende lípidos tal como se definen en el presente documento,
- iii) se puede usar en un proceso de la invención,
- iv) comprende una construcción genética de la invención, o
- v) comprende un conjunto de polinucleótidos exógenos tal como se definen en el presente documento.

25 En otro aspecto más, la presente solicitud describe una semilla madura cosechada *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* que comprende DHA y un contenido de humedad de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 15 % en peso, donde el contenido de DHA de la semilla es de al menos aproximadamente 28 mg por gramo de semilla, preferentemente al menos aproximadamente 32 mg por gramo de semilla, al menos aproximadamente 36 mg por gramo de semilla, al menos aproximadamente 40 mg por gramo de semilla, más preferentemente al menos aproximadamente 44 mg por gramo de semilla o al menos aproximadamente 48 mg por gramo de semilla. El contenido máximo de DHA puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 100 mg por gramo de semilla, o aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg por gramo de semilla.

35 En una realización, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de planta de la invención, o la semilla de la invención, se puede usar para producir lípido extraído que comprende una o más o todas las características definidas en el presente documento.

40 En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método para producir una célula de la invención, donde el método comprende

- 45 a) introducir en la célula, preferentemente una célula que no es capaz de sintetizar un LC-PUFA, la construcción genética de la invención, el polinucleótido aislado y/o exógeno de la invención, el vector o la construcción genética de la invención, una o más de las combinaciones de polinucleótidos exógenos que se definen en el presente documento,
- b) opcionalmente, expresar los genes o polinucleótido o polinucleótidos en la célula:
- c) opcionalmente, analizar la composición de ácido graso de la célula, y
- d) opcionalmente, seleccionar una célula que exprese los genes o polinucleótido o polinucleótidos.

50 En un aspecto, el lípido en la célula tiene una o más de las características definidas en el presente documento.

En un aspecto, la construcción genética, el polinucleótido exógeno y/o aislado, el vector, la construcción genética o las combinaciones de polinucleótidos exógenos, se integran de manera estable al genoma de la célula.

55 En un aspecto adicional, la célula en una célula vegetal, y el método comprende adicionalmente la etapa de regenerar una planta transformada a partir de la célula de la etapa a).

60 En otro aspecto, los genes y/o polinucleótido o polinucleótidos exógenos se expresan de manera temporal en la célula.

También se describe una célula producida usando un método de la invención.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una semilla, donde el método comprende,

a) cultivar una planta de la invención, o una planta que produce una parte tal como se define en la invención, preferentemente en un campo como parte de una población de al menos 1000 plantas o en un área de al menos 1 hectárea plantada con una densidad de plantación convencional,

b) cosechar semillas de la planta o las plantas, y

5 c) opcionalmente, extraer lípidos de la semilla, preferentemente para producir aceite con un rendimiento total de DHA de al menos 60 kg de DHA/hectárea.

En una realización, la planta, la célula vegetal, la parte de planta o la semilla de la invención tienen una o más de las siguientes características

- 10 i) el aceite es tal como se define en el presente documento,
 ii) la parte de planta o semilla es capaz de usarse en un proceso de la invención,
 iii) los polinucleótidos exógenos están comprendidos en una construcción genética como se describe en el presente documento,
 15 iv) los polinucleótidos exógenos comprenden un polinucleótido exógeno como se describe en el presente documento,
 v) la célula vegetal es una célula de la invención, y
 vi) la semilla se produjo según el método de la invención.

20 En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para producir una o más desaturadas de ácido graso y/o elongadas de ácido graso, o una o más desaturadas de ácido graso y una o más elongadas de ácido graso; el método comprende la expresión en una célula, o por el sistema de expresión libre de la construcción génica, el polinucleótido exógeno y/o aislado, el vector o la construcción genética como se describe en el presente documento, o una o más de las combinaciones de polinucleótidos exógenos que se definen en el presente documento,
 25 preferentemente en una semilla oleaginosa en desarrollo en una planta oleaginosa en el campo.

En un aspecto adicional, la presente solicitud describe un lípido o aceite, producido u obtenido, usando el proceso de la invención, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención o la planta, célula vegetal, parte de planta o semilla de la invención.
 30

En un aspecto, el lípido o aceite se obtiene mediante extracción de aceite de una semilla oleaginosa. Los ejemplos de aceites de semillas oleaginosas incluyen pero sin limitación, aceite de colza (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), aceite de mostaza (*Brassica juncea*), otro aceite Brassica, aceite de girasol (*Helianthus annuus*), aceite de linaza (*Linum usitatissimum*), aceite de soja (*Glycine max*), aceite de cártamo (*Carthamus tinctorius*), aceite de maíz (*Zea mays*), aceite de tabaco (*Nicotiana tabacum*), aceite de cacahuate (*Arachis hypogaea*), aceite de palma, aceite de semilla de algodón (*Gossypium hirsutum*), aceite de coco (*Cocos nucifera*), aceite de aguacate (*Persea americana*), aceite de oliva (*Olea europaea*), aceite de castañas de cajú (*Anacardium occidentale*), aceite de macadamia (*Macadamia intergrifolia*), aceite de almendra (*Prunus amygdalus*) o aceite de semilla de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*).
 35
 40

En un aspecto adicional, la presente solicitud describe un ácido graso, producido u obtenido, usando el proceso de la invención, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención o la planta, célula vegetal, parte de planta o semilla de la invención. Preferentemente, el ácido graso es DHA. El ácido graso puede estar en una mezcla de ácidos grasos que tiene una composición de ácidos grasos tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, el ácido graso no está esterificado.
 45

También se proporciona polvo de semilla obtenido de la semilla de la invención. Los polvos de semilla preferidos incluyen, de modo no necesariamente taxativo, polvo de semilla de *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* o *Glycine max*. En una realización, el polvo de semilla comprende polinucleótido o polinucleótidos exógenos y/o construcciones genéticas tal como se definen en el presente documento.
 50

En otro aspecto, la presente solicitud describe una composición que comprende uno o más de un lípido o aceite de la invención, el ácido graso, la construcción genética, el polinucleótido exógeno y/o aislado, el vector o construcción genética como se describen en el presente documento, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención, la planta, la célula vegetal, la parte de la planta o la semilla de la invención, o el polvo de semilla de la invención. En aspectos, la composición comprende un vehículo adecuado para uso farmacéutico, alimenticio o agrícola, un compuesto de tratamiento de semilla, un fertilizante, otro ingrediente alimenticio o proteína o vitaminas añadidas.
 55
 60

También se describen piensos, cosméticos o químicos que comprenden uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso, la construcción genética, el polinucleótido exógeno y/o aislado, el vector o construcción genética como se describen en el presente documento, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la
 65

invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención, la planta, la célula vegetal, la parte de la planta o la semilla de la invención, o el polvo de semilla de la invención, o la composición como se describe en el presente documento.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un pienso de consumo humano o animal, donde el método comprende mezclar uno o más del lípido o aceite de la invención, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la parte de planta de la invención o la semilla de la invención, con al menos otro ingrediente alimenticio.

10 En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para tratar o prevenir una afección que se beneficiaría de un PUFA, donde el método comprende administrarle a un sujeto uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso, la construcción genética, el polinucleótido exógeno y/o aislado, el vector o construcción genética como se describe en el presente documento, la célula de la invención, la planta transgénico de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención, la planta, la célula vegetal, la parte de la planta o la semilla de la invención, o el polvo de semilla de la invención, la composición, o el pienso como se describe en el presente documento.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona uno o más de los lípidos o aceites de la invención, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la parte de planta de la invención, o el polvo de semilla de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección médica que se beneficiaría de una PUFA, donde dicha afección es la arritmia cardíaca, angioplastia, inflamación, asma, psoriasis, osteoporosis, piedras en el riñón, SIDA, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esquizofrenia, cáncer, síndrome alcohólico fetal, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva, adrenoleucodistrofia, cardiopatía coronaria, hipertensión, diabetes, obesidad, enfermedad de Alzheimer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, reestenosis después de angioplastia, eccema, presión sanguínea alta, agregación de plaquetas, sangrado gastrointestinal, endometriosis, síndrome premenstrual, encefalomiелitis miálgica, fatiga crónica después de infecciones virales o una enfermedad ocular.

30 También se describe el uso de uno o más del lípido o aceite de la invención, el ácido graso, la construcción genética, el polinucleótido exógeno y/o aislado, el vector o construcción genética como se describen en el presente documento, la célula de la invención, la planta transgénica de la invención, la planta oleaginosa de la invención, la planta *Brassica napus*, *B. juncea* o *Camelina sativa* de la invención, la parte de planta de la invención, la semilla de la invención, la planta, la célula vegetal, la parte de la planta o la semilla de la invención, o el polvo de semilla de la invención, la composición o el pienso como se describen en el presente documento para la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir una afección que se beneficiaría de un PUFA. La producción del medicamento puede comprender mezclar el aceite de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de una afección tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender en primer lugar purificar el aceite y/o la transesterificación, y/o fraccionamiento del aceite para aumentar el nivel de DHA. En una realización particular, el método comprende tratar el lípido o aceite, tal como aceite de colza, para convertir los ácidos grasos del aceite en ésteres de alquilo tales como ésteres de etilo o metilo. Se pueden aplicar tratamientos adicionales, tal como fraccionamiento o destilación, para enriquecer el lípido o aceite para el DHA. En un aspecto preferido, el medicamento comprende ésteres de etilo de DHA. En un aspecto más preferido, el nivel de ésteres de etilo de DHA en el medicamento es de entre el 30 % y el 50 %. El medicamento puede comprender adicionalmente ésteres de etilo de EPA, tal como entre el 30 % y el 50 % del contenido total de ácidos grasos en el medicamento. Dichos medicamentos son adecuados para la administración a sujetos humanos o animales para el tratamiento de afecciones médicas como se describe en el presente documento.

50 En otro aspecto, la presente solicitud describe un método para comercializar semillas, que comprende obtener una semilla de la invención y comercializar la semilla obtenida para ganancia pecuniaria.

En un aspecto, la obtención de las semillas comprende cultivar plantas de la invención y/o cosechar las semillas de las plantas.

55 En otro aspecto, la obtención de las semillas comprende adicionalmente colocar las semillas en un recipiente y/o almacenar las semillas.

60 En un aspecto adicional, la obtención de las semillas comprende adicionalmente transportar las semillas a una ubicación diferente.

En otro aspecto más, el método comprende adicionalmente transportar las semillas a una ubicación diferente después de que se comercializan las semillas.

65 En un aspecto adicional, la comercialización se realiza usando medios electrónicos, tal como un ordenador.

En un aspecto adicional más, la presente solicitud describe un proceso para producir contenedores de semillas que comprende:

- 5 a) envolver, colocar en hieleras y/o cosechar las partes sobre el nivel de la tierra de las plantas que comprenden las semillas de la invención,
 b) trillar y/o cribar las partes de las plantas para separar las semillas del resto de las partes de la planta, y
 c) tamizar y/o clasificar la semilla separada en el paso b), y cargar las semillas tamizadas y/o clasificadas en contenedores, para producir de esta forma contenedores de semillas.

10 En un aspecto, donde sea pertinente, el líquido o sólido, preferentemente aceite de semilla de, o útil para, la invención tiene niveles grasos aproximados a los proporcionados en la Tabla en la sección de Ejemplos, tal como la semilla 14 de la Tabla 16.

15 Se entenderá que cualquier realización o aspecto en el presente documento se aplicará, con los cambios que sean necesarios, a cualquier otra realización o aspecto salvo que se indique específicamente lo contrario.

La presente invención no se verá limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento, las cuales son únicamente para propósitos de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes se encuentran claramente dentro del alcance de la invención, tal como se describe en el presente documento.

20 A lo largo de la presente memoria descriptiva, salvo que se indique específicamente lo contrario o el contexto lo disponga de otra manera, debe entenderse que la referencia a un solo paso, composición de materia, grupo de pasos o grupo de composiciones de materia abarque uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de esos pasos, composiciones de materia, grupos de pasos o grupos de composiciones de materia.

La invención se describe en lo sucesivo en el presente documento mediante los siguientes Ejemplos no taxativos y haciendo referencia a las figuras adjuntas.

30 Breve descripción de los dibujos adjuntos

Figura 1. Vías de biosíntesis aeróbica de DHA.

35 **Figura 2.** Mapa de la región de inserción de ADN-T entre los bordes derecho e izquierdo de pJP3416-GA7. RB indica borde derecho; LB, borde izquierdo; TER, terminador de transcripción/región de poliadenilación; PRO, promotor; las regiones de codificación se indican encima de las flechas, los promotores y terminadores debajo de las flechas. Micpu- $\Delta 6D$, $\Delta 6$ -desaturasa de *Micromonas pusilla*; Pyrco- $\Delta 6E$, $\Delta 6$ -elongasa de *Pyramimonas cordata*; Pavsa- $\Delta 5D$, $\Delta 5$ -desaturasa de *Pavlova salina*; Picpa- $\omega 3D$, $\omega 3$ -desaturasa de *Pichia pastoris*; Pavsa- $\Delta 4D$, $\Delta 4$ -desaturasa de *P. salina*; Lackl- $\Delta 12D$, $\Delta 12$ -desaturasa de *Lachancea kluyveri*; Pyrco- $\Delta 5E$, $\Delta 5$ -elongasa de *Pyramimonas cordata*. NOS indica el terminador de transcripción/región de poliadenilación de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, promotor de napina truncado de *Brassica napus*; FAE1, promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana*; Lectina, terminador de transcripción/región de poliadenilación de lectina de *Glycine max*; Cnl1 y Cnl2 indican el promotor o terminador de conlinina1 o conlinina2 de *Linum usitatissimum*. MAR indica la región de unión a la matriz de Rb7 de *Nicotiana tabacum*.

45 **Figura 3.** Mapa de la región de inserción de ADN-T entre los bordes derecho e izquierdo de pJP3404. Las etiquetas son iguales a las de la Figura 2.

50 **Figura 4.** Mapa de la región de inserción entre los bordes derecho e izquierdo de pJP3367. Las etiquetas son iguales a las de la Figura 2.

Figura 5. Los niveles de DHA como un porcentaje del total de ácidos grasos en el lípido de semilla de múltiples semillas transgénicas independientes de *Arabidopsis thaliana* tanto en la generación T2 y T3. Los eventos T2 entre paréntesis se llevaron a T3. Se muestran los eventos tanto de los antecedentes de Columbia como de fad2 mutante *A. thaliana*.

Figura 6. El contenido de aceite (p/p) en comparación con el contenido de DHA, como porcentaje del contenido de ácidos grasos de lípido de las semillas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

60 **Figura 7.** Gel de TI-PCR representativo que muestra la baja expresión del gen de $\Delta 6$ -desaturasa con respecto a otros transgenes en el ADN-T de embriones de *B. napus* transformados usando pJP3416-GA7. Los carriles de la izquierda muestran los productos de TI-PCR: 1, marcadores del tamaño de ADN; carril 2, $\Delta 12$ desaturasa; carril 3, $\omega 3$ -desaturasa; carril 4, $\Delta 6$ -desaturasa (baja expresión); carril 5, $\Delta 6$ -elongasa; carril 6, $\Delta 5$ -desaturasa; carril 7, $\Delta 5$ -elongasa; carril 8, $\Delta 4$ -desaturasa.

65 **Figura 8.** Porcentaje de ALA graficado en comparación con el porcentaje de ácido oleico, cada uno como un porcentaje del total de ácidos grasos en el lípido obtenido de embriones somáticos de *Brassica napus* 35S:LEC2

transgénica.

Figura 9. Análisis de distribución posicional mediante RMN en A) aceite de atún, B) aceite de semilla de *Arabidopsis* de DHA transgénico. Los picos etiquetados con 'DHA-alfa' representan la cantidad de DHA presente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de TAG (sin preferencia posicional esto equivaldría al 66 % de DHA total) mientras los picos etiquetados con 'DHA-beta' representan la cantidad de DHA presente en la posición *sn*-2 de TAG (sin preferencia posicional esto equivaldría al 33 % de DHA).

Figura 10. Análisis de CL-EM de las especies principales de triacilglicerol que contienen DHA en semillas transgénicas de *A. thaliana* en desarrollo (grises) y maduras (negras). El número que sigue a DHA indica el número total de átomos de carbono el número total de enlaces dobles en los otros dos ácidos grasos. Por tanto, DHA/34:1 también se puede designar TAG 56:7, etc.

Figura 11. Mapa de la región de inserción de ADN-T entre los bordes derecho e izquierdo de pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert. Las etiquetas son iguales a las de la Figura 2; SSU, promotor de la pequeña subunidad de rubisco de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 12. Mapa del vector binario pJP3364 que muestra el I sitio de restricción *NotI* en el cual se clonaron las Δ 12-desaturasas candidatas.

Figura 13. Diagrama de caja generado usando SigmaPlot que muestra el porcentaje de ácidos grasos 20:4 ω 6 (ARA) en lípido de semilla de poblaciones de semillas T2 de *Arabidopsis* transformadas con pFN045-pFN050. El contorno de cada caja más cercano al cero indica el percentil 25, una línea dentro de cada caja marca la mediana, y el contorno de cada caja más alejado del cero indica el percentil 75. Las barras de error mostradas encima y debajo de cada caja indican los percentiles 90 y 10.

Figura 14. Nivel promedio de ARA como un porcentaje del total de ácidos grasos en el lípido de semilla de la semilla T2 de *Arabidopsis* transformada con pFN045-pFN050.

Figura 15. Diagrama de caja que muestra el porcentaje de ácidos grasos 20:2 ω 6 (EDA) en lípido de semilla de poblaciones de semillas T2 de *Arabidopsis* transformadas con pFN045-pFN050. El diagrama de caja representa los valores tal como se describen en la Figura 13.

Figura 16. Diagrama de caja que muestra el porcentaje ARA en lípido de semilla de poblaciones de semillas T4 de *Arabidopsis* transformadas con pFN045-pFN050. El diagrama de caja representa los valores tal como se describen en la Figura 13.

Figura 17. Nivel promedio de ARA como un porcentaje del total de ácidos grasos en el lípido de semilla de las poblaciones de semillas T4 de *Arabidopsis* transformada con pFN045-pFN050.

Figura 18. Diagrama de caja que muestra el porcentaje EDA en lípido de semilla de poblaciones de semillas T4 de *Arabidopsis* transformadas con pFN045-pFN050. El diagrama de caja representa los valores tal como se describen en la Figura 13.

Figura 19. (A) Estructura de fitoesterol básica con numeración de anillo y cadena lateral. (B) Estructuras químicas de algunos de los fitoesteroles.

Figura 20. Árbol filogenético de LPAAT conocidos.

Figura 21. Las varias enzimas de intercambio de acilo que transfieren ácidos grasos entre grupos de PC, CoA, y grupos de TAG. Adaptado de Singh et al. (2005).

GUÍA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 – secuencia de nucleótidos pJP3416-GA7.
 SEQ ID NO: 2 – secuencia de nucleótidos pGA7- mod_B.
 SEQ ID NO: 3 – secuencia de nucleótidos pGA7- mod_C.
 SEQ ID NO: 4 – secuencia de nucleótidos pGA7- mod_D.
 SEQ ID NO: 5 – secuencia de nucleótidos pGA7- mod_E.
 SEQ ID NO: 6 – secuencia de nucleótidos pGA7- mod_F.
 SEQ ID NO: 7 – secuencia de nucleótidos pGA7- mod_G.
 SEQ ID NO: 8 – secuencia de nucleótidos pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert.
 SEQ ID NO: 9 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 12-desaturasa de *Lachancea kluyveri* en plantas.
 SEQ ID NO: 10 - Δ 12-desaturasa de *Lachancea kluyveri*.
 SEQ ID NO: 11 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la desaturasa de *Pichia*

- pastoris* en plantas.
 SEQ ID NO: 12 - desaturasa ω 3 de *Pichia pastoris*.
 SEQ ID NO: 13 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 6-desaturasa de *Micromonas pusilla*.
 5 SEQ ID NO: 14 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 6-desaturasa de *Micromonas pusilla* en plantas (versión 1).
 SEQ ID NO: 15 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 6-desaturasa de *Micromonas pusilla* en plantas (versión 2).
 SEQ ID NO: 16 - 6-desaturasa de *Micromonas pusilla*.
 SEQ ID NO: 17 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*.
 10 SEQ ID NO: 18 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* en plantas.
 SEQ ID NO: 19 - Δ 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus*.
 SEQ ID NO: 20 - Δ 6-desaturasa de *Ostreococcus tauri*.
 SEQ ID NO: 21 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 6-elongasa de *Pyramimonas cordata*.
 15 SEQ ID NO: 22 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 6-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (truncado en el extremo 3' y que codifica a la elongasa funcional) (versión 1).
 SEQ ID NO: 23 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 6-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (truncado en el extremo 3' y que codifica a la elongasa funcional) (versión 2).
 SEQ ID NO: 24 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 6-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (truncado en el extremo 3' y que codifica a la elongasa funcional) (versión 3).
 20 SEQ ID NO: 25 - Δ 6-elongasa de *Pyramimonas cordata*.
 SEQ ID NO: 26 - Δ 6-elongasa truncada de *Pyramimonas cordata*.
 SEQ ID NO: 27 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 5-desaturasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO: 28 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 5-desaturasa de *Pavlova salina* en plantas (versión 1).
 25 SEQ ID NO: 29 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 5-desaturasa de *Pavlova salina* en plantas (versión 2).
 SEQ ID NO: 30 - Δ 5-desaturasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO: 31 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 5-desaturasa de *Pyramimonas cordata*.
 30 SEQ ID NO: 32 - Δ 5-desaturasa de *Pyramimonas cordata*.
 SEQ ID NO: 33 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 5-elongasa de *Pyramimonas cordata*.
 SEQ ID NO: 34 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la -elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (versión 1).
 SEQ ID NO: 35 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 5-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (versión 2).
 35 SEQ ID NO: 36 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 5-elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (versión 3).
 SEQ ID NO: 37 - Δ 5-elongasa de *Pyramimonas cordata*.
 SEQ ID NO: 38 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 4-desaturasa de *Pavlova salina*.
 40 SEQ ID NO: 39 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 4-desaturasa de *Pavlova salina* en plantas (versión 1).
 SEQ ID NO: 40 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 4-desaturasa de *Pavlova salina* en plantas (versión 2).
 SEQ ID NO: 41 - Δ 4-desaturasa de *Pavlova salina*.
 45 SEQ ID NO: 42 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 9-elongasa de *Isochrysis galbana*.
 SEQ ID NO: 43 - Δ 9-elongasa de *Isochrysis galbana*.
 SEQ ID NO: 44 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 9-elongasa de *Emiliana huxleyi* CCMP1516.
 SEQ ID NO: 45 - Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la Δ 9-elongasa de *Emiliana huxleyi* en plantas.
 50 SEQ ID NO: 46 - Δ 9-elongasa de *Emiliana huxleyi* CCMP1516.
 SEQ ID NO: 47 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 9-elongasa de *Pavlova pinguis*.
 SEQ ID NO: 48 - Δ 9-elongasa de *Pavlova pinguis*.
 SEQ ID NO: 49 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 9-elongasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO: 50 - Δ 9-elongasa de *Pavlova salina*.
 55 SEQ ID NO: 51 - Marco de lectura abierto que codifica la Δ 8-desaturasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO: 52 - Δ 8-desaturasa de *Pavlova salina*.
 SEQ ID NO: 53 - supresor viral P19.
 SEQ ID NO: 54 - supresor viral V2.
 SEQ ID NO: 55 - supresor viral P38.
 60 SEQ ID NO: 56 - supresor viral Pe-P0.
 SEQ ID NO: 57 - supresor viral RPV-P0.
 SEQ ID NO: 58 - Marco de lectura abierto que codifica el supresor viral P19.
 SEQ ID NO: 59 - Marco de lectura abierto que codifica el supresor viral V2.
 SEQ ID NO: 60 - Marco de lectura abierto que codifica el supresor viral P38.
 65 SEQ ID NO: 61 - Marco de lectura abierto que codifica el supresor viral Pe-P0.
 SEQ ID NO: 62 - Marco de lectura abierto que codifica el supresor viral RPV-P0.

- SEQ ID NO: 63 - LPAAT2 de *Arabidopsis thaliana*.
 SEQ ID NO: 64 - LPAAT de *Limnanthes alba*.
 SEQ ID NO: 65 - LPAAT de *Saccharomyces cerevisiae*.
 SEQ ID NO: 66 - LPAAT de *Micromonas pusilla*.
 5 SEQ ID NO: 67 - LPAAT de *Mortierella alpina*.
 SEQ ID NO: 68 - LPAAT de *Brassica napus*.
 SEQ ID NO: 69 - LPAAT de *Brassica napus*.
 SEQ ID NO: 70 - ω 3 desaturasa de *Phytophthora infestans*.
 SEQ ID NO: 71 - ω 3 desaturasa de *Thalassiosira pseudonana*.
 10 SEQ ID NO: 72 - ω 3 desaturasa de *Pythium irregulare*.

Descripción detallada de la invención

Técnicas y definiciones generales

15 Salvo que se indique específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento deben entenderse con el mismo significado que entendería comúnmente un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, síntesis de ácidos grasos, plantas transgénicas, química de proteínas y bioquímica).

20 A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, cultivo celular y técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se describen y explican en la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), F.M. Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha), Ed Harlow y David Lane (editores), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores), *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la fecha).

El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" debe entenderse que significan ya sea "X e Y" o "X o Y" y deberá entenderse que proporcionan respaldo explícito para ambos significados o para cualquier significado.

35 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario, se refiere a +/- el 10 %, más preferentemente +/- el 5 %, más preferentemente +/- el 1 % del valor designado.

40 A lo largo de la presente memoria descriptiva se entenderá la expresión "que comprende", o variaciones, tal como "comprende", implica la inclusión de un elemento, entero o paso, o grupo de elementos, enteros o pasos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o paso, o grupo de elementos, enteros o pasos.

Definiciones seleccionadas

45 Como se usa en el presente documento, las expresiones "lípidos vegetales extraídos" y "lípidos vegetales aislados" se refieren a una composición de lípidos que se ha extraído de, por ejemplo, mediante molido, una planta o parte de esta, tal como la semilla. El lípido extraído puede ser una composición relativamente en bruto obtenida mediante, por ejemplo, el molido de una semilla vegetal, o una composición más purificada donde se ha retirado la mayoría, o acaso la totalidad, de uno o más o cada uno de agua, ácidos nucleicos, proteínas y hidratos de carbono derivados del material vegetal. Los ejemplos de métodos de purificación se describen más adelante. En una realización, el lípido vegetal extraído o aislado comprende al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % (p/p) de lípidos en peso de la composición. EL lípido puede ser líquido o sólido a temperatura ambiente, cuando está líquido se considera aceite. En una realización, el lípido extraído de la invención no se ha mezclado con otro lípido tal como DHA no producido mediante otra fuente (por ejemplo, DHA de aceite de pescado). En una realización, después de la extracción la relación de uno o más o todos de, ácido oleico con respecto a DHA, ácido palmítico con respecto a DHA, ácido linoleico con respecto a DHA, y total de ácidos grasos ω 6: total de ácidos grasos ω 3, no se ha alterado de manera significativa (por ejemplo, alteración no mayor que 10 % o 5 %) cuando se compara con la relación en la semilla o célula intacta. En otra realización, el lípido vegetal extraído no ha sido expuesto a un procedimiento, tal como hidrogenación o fraccionamiento, lo que puede alterar la relación de uno o más o todos de, ácido oleico con respecto a DHA, ácido palmítico con respecto a DHA, ácido linoleico con respecto a DHA, y total de ácidos grasos ω 6: total de ácidos grasos ω 3, cuando se compara con la relación en la semilla o célula intacta. Cuando el lípido vegetal extraído de la invención está comprendido en un aceite, el aceite puede comprender adicionalmente moléculas que no son ácidos grasos tal como esteroides.

65 Como se usa en el presente documento, las expresiones "lípidos vegetales extraídos" y "lípidos vegetales aislados" se refieren a una sustancia o composición que comprende el lípido vegetal extraído o lípido vegetal aislado y que es

líquida a temperatura ambiente. El aceite se obtiene de una planta o parte de esta, tal como una semilla. El aceite extraído o aislado puede ser una composición relativamente en bruto obtenida mediante, por ejemplo, el molido de una semilla vegetal, o una composición más purificada donde se ha retirado la mayoría, o acaso la totalidad, de uno o más o cada uno de agua, ácidos nucleicos, proteínas y hidratos de carbono derivados del material vegetal. La composición puede comprender otros componentes que pueden ser lípidos o no lípidos. En una realización, la composición de aceite comprende al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % (p/p) del lípido vegetal extraído. En una realización, el aceite extraído de la invención no se ha mezclado con otro aceite tal como DHA no producido mediante otra fuente (por ejemplo, DHA de aceite de pescado). En una realización, después de la extracción la relación de uno o más o todos de, ácido oleico con respecto a DHA, ácido palmítico con respecto a DHA, ácido linoleico con respecto a DHA, y total de ácidos grasos $\omega 6$: total de ácidos grasos $\omega 3$, no se ha alterado de manera significativa (por ejemplo, alteración no mayor que el 10 % o el 5 %) cuando se compara con la relación en la semilla o célula intacta. En otra realización, el aceite vegetal extraído no ha sido expuesto a un procedimiento, tal como hidrogenación o fraccionamiento, lo que puede alterar la relación de uno o más o todos de, ácido oleico con respecto a DHA, ácido palmítico con respecto a DHA, ácido linoleico con respecto a DHA, y total de ácidos grasos $\omega 6$: total de ácidos grasos $\omega 3$, cuando se compara con la relación en la semilla o célula intacta. El aceite vegetal extraído de la invención puede comprender moléculas que no son ácidos grasos tales como esteroides.

Como se usa en el presente documento, un "aceite" es una composición que comprende predominantemente lípidos y que es líquida a temperatura ambiente. Por ejemplo, el aceite de la invención preferentemente comprende al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 % o al menos el 90 % de lípido en peso. Normalmente, un aceite purificado comprende al menos el 90 % de triacilglicerol (TAG) en peso del lípido en el aceite. Pueden estar presentes componentes menores de un aceite tales como diacilglicerol (DAG), ácidos grasos libres (FFA), fosfolípidos y esteroides tal como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido graso" se refiere a un ácido carboxílico (o ácido orgánico), a menudo con una larga cola alifática, ya sea saturada o insaturada. Normalmente, los ácidos grasos tienen una cadena unidad de carbono-carbono de al menos 8 átomos de carbono de longitud, más preferentemente al menos 12 carbonos de longitud. La mayoría de los ácidos grasos de origen natural tienen un número par de átomos de carbono porque su biosíntesis implica al acetato que tiene dos átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden estar en un estado libre (no esterificados) o en forma esterificada tal como parte de un triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA (tio-éster) unido u otra forma unida. El ácido graso se puede esterificar como un fosfolípido tal como una forma de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol.

Los "ácidos grasos saturados" no contienen ningún enlace doble u otro grupo funcional a lo largo de la cadena. El término "saturado" se refiere a hidrógeno, ya que todos los carbonos (aparte del grupo [-COOH] del ácido carboxílico) contienen tantos hidrógenos como sea posible. En otras palabras, el extremo omega (ω) contiene 3 hidrógenos (CH₃-) y cada carbono dentro de la cadena contiene 2 hidrógenos (-CH₂-).

Los "ácidos grasos insaturados" tienen forma similar a los ácidos grasos saturados, excepto que existen uno o más grupos funcionales alqueno a lo largo de la cadena, donde cada alqueno sustituye a una parte de "-CH₂-CH₂-" de enlace simple con una parte "-CH=CH-" de enlace doble (es decir, un carbono unido mediante enlace doble a otro carbono). Los dos átomos de carbono siguientes en la cadena se unen a cualquiera de los lados del enlace doble pueden presentarse en una configuración cis o trans.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido graso monoinsaturado" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 12 átomos de carbono en su cadena de carbono y solo un grupo alqueno (enlace doble carbono-carbono) en la cadena. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido graso poliinsaturado" o "PUFA" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 12 átomos de carbono en su cadena de carbono y al menos dos grupos alqueno (enlaces dobles carbono-carbono).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" y "LC-PUFA" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 20 átomos de carbono en su cadena de carbono y al menos dos enlaces dobles carbono-carbono y, por lo tanto, incluyen a los VLC-PUFA. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga" y "VLC-PUFA" se refiere a un ácido graso que comprende al menos 22 átomos de carbono en su cadena de carbono y al menos tres enlaces dobles carbono-carbono. Generalmente, el número de átomos de carbono en la cadena de carbono de ácidos grasos se refiere a una cadena de carbono no ramificada. Si la cadena de carbono es ramificada, el número de átomos de carbono excluye a aquellos en los grupos laterales. En una realización, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso $\omega 3$, es decir, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono del extremo metilo del ácido graso. En otra realización, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga es un ácido graso $\omega 6$, es decir, que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el sexto enlace carbono-carbono del extremo metilo del ácido graso. En una realización adicional, el ácido graso poliinsaturado de cadena larga se selecciona entre el grupo que consiste en; ácido araquidónico (ARA, 20:4 Δ 5,8,11,14; $\omega 6$), ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4 Δ 8,11,14,17; $\omega 3$), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 Δ 5,8,11,14,17; $\omega 3$), ácido

docosapentaenoico (DPA, 22:5 Δ 7,10,13,16,19, ω 3), o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 Δ 4,7,10,13,16,19, ω 3). El LC-PUFA también puede ser ácido dihomo- γ -linoleico (DGLA) o ácido eicosatrienoico (ETrA, 20:3 Δ 11,14,17, ω 3). Será fácilmente evidente que el LC-PUFA que se produce de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de cualquiera o todos los anteriores y puede incluir otros LC-PUFA o derivados de cualquiera de estos LC-PUFA. En una realización preferida, los ácidos grasos ω 3 son al menos DHA, preferentemente, DPA y DHA, o EPA, DPA y DHA.

Adicionalmente, tal como se usan en el presente documento las expresiones "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" y "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga" hacen referencia al ácido graso en un estado libre (non esterificado) o en forma esterificada tal como parte de un triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA unido u otra forma unida. El ácido graso se puede esterificar como un fosfolípido tal como una forma de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol. Por tanto, el LC-PUFA puede estar presente como una mezcla de formas en el lípido de una célula o un aceite purificado o lípido extraído de células, tejidos u organismos. En realizaciones preferidas, la invención proporciona un aceite que comprende al menos el 75 % o al menos el 85 % de triacilgliceroles, con el restante presente como otras formas de lípido tales como los mencionados, donde al menos dichos triacilgliceroles comprenden el LC-PUFA. EL aceite se puede purificar o tratar posteriormente de manera adicional, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base fuerte para liberar los ácidos grasos libres, o mediante destilación o similar.

Como se usan en el presente documento, "total de ácidos grasos ω 6", "contenido total de ácido graso ω 6" o similares se refieren a la suma de todos los ácidos grasos ω 6, esterificados y no esterificados, en el lípido, aceite, célula recombinante, parte de la planta o semilla extraídos, según lo determine el contexto, expresada como un porcentaje del contenido total de ácido graso. Estos ácidos grasos ω 6 incluyen (de encontrarse presentes) LA, GLA, DGLA, ARA, EDA y ω 6-DPA y excluyen cualquier ácido graso ω 3 y ácido graso monoinsaturado.

Como se usan en el presente documento, "ácidos grasos ω 6 nuevos", "contenido de ácido graso ω 6 nuevo" o similares se refieren a la suma de todos los ácidos grasos ω 6 con exclusión de LA, esterificados y no esterificados, en el lípido, aceite, célula recombinante, parte de la planta o semilla extraídos, según lo determine el contexto, expresada como un porcentaje del contenido total de ácido graso. Estos nuevos ácidos grasos ω 6 son los ácidos grasos que se producen en las células, plantas, partes de las plantas y semillas de la invención mediante la expresión de las construcciones genéticas (polinucleótidos exógenos) introducidas en las células, e incluyen (de encontrarse presentes) GLA, DGLA, ARA, EDA y ω 6-DPA, pero excluyen LA y cualquier ácido graso ω 3 y ácido graso monoinsaturado. Los ejemplos de contenidos totales de ácido graso ω 6 y contenidos de ácido graso ω 6 nuevo se determinan mediante la conversión a FAME de los ácidos grasos en una muestra y el análisis por CG, como se describe en el Ejemplo 1.

Como se usan en el presente documento, "total de ácidos grasos ω 3", "contenido total de ácido graso ω 3" o similares se refieren a la suma de todos los ácidos grasos ω 3, esterificados y no esterificados, en el lípido, aceite, célula recombinante, parte de la planta o semilla extraídos, según lo determine el contexto, expresada como un porcentaje del contenido total de ácido graso. Estos ácidos grasos ω 3 incluyen (de encontrarse presentes) ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA y excluyen cualquier ácido graso ω 6 y ácido graso monoinsaturado.

Como se usan en el presente documento, "ácidos grasos ω 3 nuevos", "contenido de ácido graso ω 3 nuevo" o similares se refieren a la suma de todos los ácidos grasos ω 3 con exclusión de ALA, esterificados y no esterificados, en el lípido, aceite, célula recombinante, parte de la planta o semilla extraídos, según lo determine el contexto, expresada como un porcentaje del contenido total de ácido graso. Estos ácidos grasos ω 3 nuevos son los ácidos grasos que se producen en las células, plantas, partes de las plantas y semillas de la invención mediante la expresión de las construcciones genéticas (polinucleótidos exógenos) introducidas en las células, e incluyen (de encontrarse presentes) SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA, pero excluyen ALA y cualquier ácido graso ω 6 y ácido graso monoinsaturado. Los ejemplos de contenidos totales de ácido graso ω 3 y contenidos de ácido graso ω 3 nuevo se determinan mediante la conversión a FAME de los ácidos grasos en una muestra y el análisis por CG, como se describe en el Ejemplo 1.

Las proteínas desaturasa, elongasa y aciltransferasa y los genes que las codifican que pueden usarse en la invención son cualquiera de aquellos conocidos en la técnica u homólogos o derivados de estos. En la Tabla 1 se enumeran ejemplos de tamaños de tales genes y proteínas codificadas. Todas las enzimas desaturasas que se ha demostrado que participan en la biosíntesis de LC-PUFA pertenecen al grupo de las denominadas desaturasas "del extremo frontal".

Como se usa en el presente documento, la expresión "desaturasa del extremo frontal" se refiere a una integrante de una clase de enzimas que introducen un enlace doble entre el grupo carboxilo y una parte insaturada preexistente de la cadena de acilo de lípidos, que se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio de extremo N de citocromo b5, junto con un dominio de desaturasa de ácido graso típico que incluye tres cajas de histidina altamente conservadas (Napier et al., 1997).

Se puede analizar la actividad de cualquiera de las elongasas o desaturasas para su uso en la invención mediante la expresión de un gen que codifica la enzima en una célula tal como, por ejemplo, una célula de levadura, una célula

vegetal o preferentemente en embriones somáticos o plantas transgénicas y la determinación de si la célula, el embrión o la planta posee una capacidad incrementada para producir LC-PUFA en comparación con una célula, un embrión o una planta comparables en los que la enzima no se expresa.

5 En una realización, una o más de las desaturasas y/o elongasas para su uso en la invención pueden purificarse a partir de una microalga, es decir, son idénticas en cuanto a la secuencia de aminoácido con respecto a un polipéptido que puede purificarse a partir de una microalga.

10 Mientras que determinadas enzimas son descritas específicamente como "bifuncionales" en el presente documento, la ausencia de dicho término no implica necesariamente que una enzima en particular no posea una actividad distinta a aquella definida específicamente.

Desaturasas

15 Como se usa en el presente documento, el término "desaturasa" se refiere a una enzima capaz de introducir un enlace doble carbono-carbono en un grupo acilo de un sustrato de ácido graso que normalmente se encuentra en forma esterificada, tal como ésteres de acil-CoA. El grupo acilo puede esterificarse para formar un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés), o una proteína transportadora de acilo (ACP, por sus siglas en inglés) o, en una realización preferida, CoA. De acuerdo con lo anterior, las desaturasas pueden categorizarse
20 generalmente en tres grupos. En una realización, la desaturasa es una desaturasa del extremo frontal.

Como se usa en el presente documento, una "Δ4-desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 4.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. La "Δ4-desaturasa" es capaz por lo menos de convertir DPA en DHA. La
25 etapa de desaturación para producir DHA a partir de DPA se cataliza mediante una Δ4-desaturasa en organismos no mamíferos, y un gen que codifica esta enzima se ha aislado de la especie protista de agua dulce *Euglena gracilis* y la especie marina *Thraustochytrium* sp. (Qui et al., 2001; Meyer et al., 2003). En una realización, la Δ4-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:41 o una *Thraustochytrium*
30 sp. Δ4-desaturasa o un fragmento biológicamente activo de esta, o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 80 % a la SEQ ID NO:41.

Tabla 1. Genes clonados que participan de la biosíntesis de LC-PUFA

Enzima	Tipo de organismo	Especie	N.º de muestreo	Tamaño de la proteína (aminoácidos)	Referencias
Δ4-desaturasa	Protista	<i>Euglena gracilis</i>	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	Algas	<i>Pavlova lutheri</i>	AY332747	445	Tonon et al., 2003
		<i>Isochrysis galbana</i>	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15136	447	Zhou et al., 2007
	Traustocitrid o	<i>Thraustochytrium aureum</i>	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	N/A
		<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC21685	AAM09688	519	Qiu et al. 2001
Δ5-desaturasa	Mamífero	<i>Homo sapiens</i>	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	Nematodo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AF11440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts and Browse, 1999b
	Hongos	<i>Mortierella alpina</i>	AF067654	446	Michaelson et al., 1998a; Knutzon et al., 1998
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419297	456	Hong et al., 2002a
		<i>Dictyostelium discoideum</i>	AB022097	467	Saito et al., 2000
			<i>Saprolegnia diclina</i>		470
	Diatomea	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	AY082392	469	Domergue et al., 2002

ES 2 636 487 T3

	Algas	<i>Thraustochytrium sp</i>	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		<i>Thraustochytrium aureum</i>		439	WO02081668
		<i>Isochrysis galbana</i>		442	WO02081668
	Musgo	<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004
$\Delta 6$ -desaturasa	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	Nematodo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z70271	443	Napier et al., 1998
	Plantas	<i>Borago officinalis</i>	U79010	448	Sayanova et al., 1997
		<i>Echium</i>	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		<i>Primula vialii</i>	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		<i>Anemone leveillei</i>	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	Musgos	<i>Ceratodon purpureus</i>	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
		<i>Physcomitrella patens</i>	CAA11033	525	Gerke et al., 1998
	Hongos	<i>Mortierella alpina</i>	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakura-dani et al., 1999
		<i>Pythium irregulare</i>	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		<i>Mucor circinelloides</i>	AB052086	467	NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)*
		<i>Rhizopus sp.</i>	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		<i>Saprolegnia diclina</i>		453	WO02081668
	Diatomea	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	Bacteria	<i>Synechocystis</i>	L11421	359	Reddy et al., 1993
	Alga	<i>Thraustochytrium aureum</i>		456	WO02081668
$\Delta 5/\Delta 6$ -desaturasa bifuncional	Pescado	<i>Danio rerio</i>	AF309556	444	Hastings et al., 2001
C20 $\Delta 8$ -desaturasa	Alga	<i>Euglena gracilis</i>	AF139720	419	Wallis y Browse, 1999
	Planta	<i>Borago officinalis</i>	AAG43277	446	Sperling et al., 2001
$\Delta 6$ -elongasa	Nematodo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	Musgos	<i>Physcomitrella patens</i>	AF428243	290	Zank et al., 2002
		<i>Marchantia polymorpha</i>	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	Hongo	<i>Mortierella alpina</i>	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	Algas	<i>Pavlova lutheri</i> **		501	WO 03078639
		<i>Thraustochytrium</i>	AX951565	271	WO 03093482
		<i>Thraustochytrium sp</i> **	AX214454	271	WO 0159128
PUFA-elongasa	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		<i>Rattus norvegicus</i>	AB071985	299	Inagaki et al., 2002

		<i>Rattus norvegicus</i> **	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		<i>Mus musculus</i>	AF170907	279	Tvrđik et al., 2000
		<i>Mus musculus</i>	AF170908	292	Tvrđik et al., 2000
	Peces	<i>Danio rerio</i>	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		<i>Danio rerio</i> **	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	Gusano	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z68749	309	Abbott et al., 1998 Beaudoin et al., 2000
	Algas	<i>Thraustochytrium aureum</i> **	AX464802	272	WO 0208401-A2
		<i>Pavlova lutheri</i> **		320	WO 03078639
$\Delta 9$ -elongasa	Algas	<i>Isochrysis galbana</i>	AF390174	263	Qi et al., 2002
		<i>Euglena gracilis</i>		258	WO 08/128241
$\Delta 5$ -elongasa	Algas	<i>Ostreococcus tauri</i>	AAV67798	300	Meyer et al., 2004
		<i>Pyramimonas cordata</i>		268	WO 2010/057246
		<i>Pavlova sp. CCMP459</i>	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		<i>Pavlova salina</i>	AAV15135	302	Robert et al., 2009
	Diatomea	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	Pez	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CAM55862	295	WO 06/008099
	Musgo	<i>Marchantia polymorpha</i>	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006
* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ** Función no probada/no demostrada					

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 5$ -desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 5.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. Se enumeran ejemplos de $\Delta 5$ -desaturasas en Ruiz-López et al. (2012) y Petrie et al. (2010a) y en la Tabla 1 del presente documento. En una realización, la $\Delta 5$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:30, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 80 % a la SEQ ID NO:30. En otra realización, la $\Delta 5$ -desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:32, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 53 % a la SEQ ID NO:32. En otra realización, la $\Delta 5$ -desaturasa proviene de *Thraustochytrium sp* o *Emiliania huxleyi*.

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 6$ -desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 6.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. Se enumeran ejemplos de $\Delta 6$ -desaturasas en Ruiz-López et al. (2012) y Petrie et al. (2010a) y en la Tabla 1 del presente documento. Las $\Delta 6$ -desaturasas preferidas provienen de *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* o *Ostreococcus tauri*.

En una realización, la $\Delta 6$ -desaturasa se caracteriza también por tener al menos dos, preferentemente las tres y preferentemente en una célula vegetal, de las siguientes: i) mayor actividad de $\Delta 6$ -desaturasa en ácido α -linolénico (ALA, 18:3 $\Delta 9,12,15$, $\omega 3$) que ácido linoleico (LA, 18:2 $\Delta 9,12$, $\omega 6$) como sustrato de ácido graso; ii) mayor actividad de $\Delta 6$ -desaturasa en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA ligado a la posición *sn-2* de PC como sustrato de ácido graso; y iii) actividad de $\Delta 6$ -desaturasa en ETrA. Se proporcionan ejemplos de dichas $\Delta 6$ -desaturasas en la Tabla 2.

En una realización, la desaturasa tiene mayor actividad en un sustrato de $\omega 3$ que el correspondiente sustrato de $\omega 6$ y tiene actividad en ALA para producir ácido octadecatetraenoico (ácido estearidónico, SDA (por sus siglas en inglés), 18:4 $\Delta 6,9,12,15$, $\omega 3$) con una eficacia de al menos el 30 %, más preferentemente de al menos el 40 % o más preferentemente de al menos el 50 % cuando se expresa a partir de un polinucleótido exógeno en una célula recombinante tal como una célula vegetal, o de al menos el 35 % cuando se expresa en una célula de levadura. En una realización, la $\Delta 6$ -desaturasa tiene mayor actividad, por ejemplo, al menos una actividad de $\Delta 6$ -desaturasa aproximadamente 2 veces mayor, en ALA que LA como sustrato de ácido graso. En otra realización, la $\Delta 6$ -desaturasa tiene mayor actividad, por ejemplo, al menos una actividad de $\Delta 6$ -desaturasa aproximadamente 5 veces mayor o al menos actividad 10 veces mayor, en ALA-CoA como sustrato de ácido graso que en ALA ligado a la posición *sn-2* de PC como sustrato de ácido graso. En una realización adicional, la $\Delta 6$ -desaturasa tiene actividad tanto en sustratos de ácido graso ALA-CoA como en ALA ligado a la posición *sn-2* de PC.

Tabla 2. Desaturasas que demostraron tener actividad en un sustrato de acil-CoA

Enzima	Tipo de organismo	Especie	N.º de muestreo	Tamaño de la proteína (amino-ácidos)	Referencias
Δ6-desaturasa	Algas	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30479	449	Hoffmann et al., 2008
		<i>Ostreococcus tauri</i>	AAW70159	456	Domergue et al., 2005
		<i>Micromonas pusilla</i>	EEH58637		Petrie et al., 2010a (SEQ ID NO: 13)
Δ5-desaturasa	Alga	<i>Mantoniella squamata</i>	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	Planta	<i>Anemone leveillei</i>	N/A		Sayanova et al., 2007
ω3-desaturasa	Hongo	<i>Pythium aphanidermatum</i>	FW362186.1	359	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Hongo (oomiceto)	<i>Phytophthora sojae</i>	FW362214.1	363	Xue et al., 2012; WO2008/054565
	Hongo (oomiceto)	<i>Phytophthora ramorum</i>	FW362213.1	361	Xue et al., 2012; WO2008/054565

En una realización, la Δ6-desaturasa no tiene actividad de Δ5-desaturasa detectable en ETA. En otra realización, la Δ6-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:20, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 77 % a la SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:20. En otra realización, la Δ6-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:20, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 67 % a una o ambas de la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:20. La Δ6-desaturasa también puede tener actividad de Δ8-desaturasa.

Como se usa en el presente documento, una "Δ8-desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 8.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. La Δ8-desaturasa es capaz por lo menos de convertir ETrA en ETA. Se enumeran ejemplos de Δ8-desaturasas en la Tabla 1. En una realización, la Δ8-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:52, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 80 % a la SEQ ID NO:52.

Como se usa en el presente documento, una "ω3-desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 3.º enlace carbono-carbono desde el extremo metilo de un sustrato de ácido graso. Por tanto, una ω3-desaturasa puede convertir LA en ALA y GLA en SDA (todos ácidos grasos C18) o DGLA en ETA y/o ARA en EPA (ácidos grasos C20). Algunas ω3-desaturasas (grupo I) tienen actividad únicamente en sustratos C18, tales como ω3-desaturasas vegetales y cianobacterianas. Dichas ω3-desaturasas también son Δ15-desaturasas. Otras ω3-desaturasas tienen actividad en sustratos C20 sin actividad (grupo II) o algo de actividad (grupo III) en sustratos C18. Dichas ω3-desaturasas también son Δ17-desaturasas. Las ω3-desaturasas preferidas pertenecen al tipo del grupo III que convierte LA en ALA, GLA en SDA, DGLA en ETA y ARA en EPA, tal como la ω3-desaturasa de *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 12). Los ejemplos de ω3-desaturasas

incluyen aquellos descritos por Pereira et al. (2004a) (ω 3-desaturasa de *Saprolegnia diclina*, grupo II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) y Spychalla et al. (1997) (ω 3-desaturasa de *C. elegans*, grupo III). En una realización preferida, la ω 3-desaturasa es una ω 3-desaturasa fúngica. Como se usa en el presente documento, una " ω 3-desaturasa fúngica" se refiere a una ω 3-desaturasa proveniente de una fuente fúngica, lo cual incluye los oomicetos, o una variante de esta cuya secuencia de aminoácido es idéntica al menos en un 95 % a la primera. Se han aislado genes que codifican numerosas ω 3-desaturasas de fuentes fúngicas tales como, por ejemplo, *Phytophthora infestans* (Muestreo n.º CAJ30870, documento WO2005083053; SEQ ID NO: 70), *Saprolegnia diclina* (Muestreo n.º AAR20444, Pereira et al., 2004a y patente estadounidense n.º 7211656), *Pythium irregulare* (documento WO2008022963, Grupo II; SEQ ID NO: 72), *Mortierella alpina* (Sakuradani et al., 2005; Muestreo n.º BAD91495; documento WO2006019192), *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al., 2004; Muestreo n.º XP_002291057; documento WO2005012316, SEQ ID NO: 71), *Lachancea kluyveri* (también conocida como *Saccharomyces kluyveri*; Oura et al., 2004; Muestreo n.º AB118663). Xue et al. (2012) describe ω 3-desaturasas provenientes de los oomicetos *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae* y *Phytophthora ramorum*, que fueron capaces de convertir eficazmente sustratos de ácido graso ω 6 en los correspondientes ácidos grasos ω 3, con preferencia por sustratos C20, es decir, tuvieron una actividad más fuerte de Δ 17-desaturasa que de Δ 15-desaturasa. Estas enzimas carecieron de actividad de Δ 12-desaturasa, pero pudieron emplear ácidos grasos como sustratos tanto en acil-CoA como en la fracción de fosfolípidos.

En una realización más preferida, la ω 3-desaturasa fúngica es la ω 3-desaturasa/ Δ 15-desaturasa de *Pichia pastoris*, también conocida como *Komagataella pastoris* (Zhang et al., 2008; Muestreo n.º EF116884; SEQ ID NO: 12) o un polipéptido que es idéntico al menos en un 95 % a esta.

En una realización, la ω 3-desaturasa es capaz por lo menos de convertir uno de los siguientes: ARA en EPA, DGLA en ETA o GLA en SDA, o tanto ARA en EPA como DGLA en ETA, o tanto ARA en EPA como GLA en SDA, o las tres anteriores.

En una realización, la ω 3-desaturasa tiene actividad de Δ 17-desaturasa en un ácido graso C20 que tiene al menos tres enlaces dobles carbono-carbono, preferentemente ARA. En otra realización, la ω 3-desaturasa tiene actividad de Δ 15-desaturasa en un ácido graso C18 que tiene al menos tres enlaces dobles carbono-carbono, preferentemente GLA. Preferentemente se encuentran presentes ambas actividades.

Como se usa en el presente documento, una " Δ 12-desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 12.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. Normalmente, las Δ 12-desaturasas convierten o bien oleoil-fosfatidilcolina u oleoil-CoA en linoleoil-fosfatidilcolina (18:1-PC) o linoleoil-CoA (18:1-CoA), respectivamente. La subclase que usa el sustrato enlazado a PC se conoce como Δ 12-desaturasa dependiente de fosfolípidos, la segunda subclase se conoce como Δ 12-desaturasa dependiente de acil-CoA. Las Δ 12-desaturasas vegetales y fúngicas generalmente pertenecen a la primera subclase, mientras que las Δ 12-desaturasas animales, tal como las Δ 12-desaturasas codificadas por genes clonados de insectos por Zhou et al. (2008), pertenecen a la segunda subclase. Muchas otras secuencias de Δ 12-desaturasa pueden identificarse fácilmente a través de la búsqueda en bases de datos de secuencias.

Como se usa en el presente documento, una " Δ 15-desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 15.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. Numerosos genes que codifican Δ 15-desaturasas se han clonado de especies de plantas y hongos. Por ejemplo, en el documento US5952544 se describen ácidos nucleicos que codifican Δ 15-desaturasas vegetales (FAD3). Estas enzimas comprenden motivos de aminoácido que eran característicos de Δ 15-desaturasas vegetales. En el documento WO200114538 se describe un gen que codifica FAD3 de soja. Muchas otras secuencias de Δ 15-desaturasa pueden identificarse fácilmente a través de la búsqueda en bases de datos de secuencias.

Como se usa en el presente documento, una " Δ 17-desaturasa" se refiere a una proteína que realiza una reacción desaturasa que introduce un enlace doble carbono-carbono en el 17.º enlace carbono-carbono desde el extremo carboxilo de un sustrato de ácido graso. A una Δ 17-desaturasa también se la considera una ω 3-desaturasa si actúa en un sustrato C20 para introducir una desaturación en el enlace de ω 3.

En una realización preferida, la Δ 12-desaturasa y/o Δ 15-desaturasa es una Δ 12-desaturasa fúngica o una Δ 15-desaturasa fúngica. Como se usa en el presente documento, una " Δ 12-desaturasa fúngica" o una " Δ 15-desaturasa fúngica" se refiere a una Δ 12-desaturasa o Δ 15-desaturasa proveniente de una fuente fúngica, lo cual incluye los oomicetos, o una variante de esta cuya secuencia de aminoácido es idéntica al menos en un 95 % a la primera. Se han aislado genes que codifican numerosas desaturasas de fuentes fúngicas. En el documento US 7211656 se describe una Δ 12 desaturasa proveniente de *Saprolegnia diclina*. En el documento WO2009016202 se describen desaturasas fúngicas provenientes de *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Naegleria gruberi*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Trichoderma reisi*, *Physcomitrella patens*, *Postia placenta*, *Selaginella moellendorffii* y *Microdochium nivale*. En el documento WO2005/012316 se describe una

Δ 12-desaturasa proveniente de *Thalassiosira pseudonana* y otros hongos. En el documento WO2003/099216 se describen genes que codifican Δ 12-desaturasas y Δ 15-desaturasas fúngicas aisladas de *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* y *Mortierella alpina*. En el documento WO2007133425 se describen Δ 15 desaturasas fúngicas aisladas de: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* y *Magnaporthe grisea*. Una Δ 12 desaturasa preferida proviene de *Phytophthora sojae* (Ruiz-López et al., 2012).

Una subclase distintiva de Δ 12-desaturasas fúngicas y de Δ 15-desaturasas fúngicas son las Δ 12/ Δ 15-desaturasas fúngicas bifuncionales. Los genes que las codifican han sido clonados a partir de *Fusarium moniliforme* (Muestreo n.º DQ272516, Damude et al., 2006), *Acanthamoeba castellanii* (Muestreo n.º EF017656, Sayanova et al., 2006), *Perkinsus marinus* (documento WO2007042510), *Claviceps purpurea* (Muestreo n.º EF536898, Meesapyodsuk et al., 2007) y *Coprinus cinereus* (Muestreo n.º AF269266, Zhang et al., 2007).

En otra realización, la ω 3-desaturasa tiene al menos algo de actividad, preferentemente una actividad mayor, en un sustrato de acil-CoA que un sustrato de acil-PC correspondiente. Como se usa en el presente documento, "sustrato de acil-PC correspondiente" se refiere al ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC) en donde el ácido graso es el mismo ácido graso que en el sustrato de acil-CoA. Por ejemplo, el sustrato de acil-CoA puede ser ARA-CoA y el sustrato de acil-PC correspondiente es ARA-PC en *sn*-2. En una realización, la actividad es al menos dos veces mayor. Preferentemente, la ω 3-desaturasa tiene al menos algo de actividad tanto en el sustrato de acil-CoA como en su sustrato de acil-PC correspondiente, y tiene actividad tanto en el sustrato C18 como en el C20. Se conocen ejemplos de dichas ω 3-desaturasas entre las desaturasas fúngicas clonadas enumeradas anteriormente.

En una realización adicional, la ω 3-desaturasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:12, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 60 % a la SEQ ID NO:12, preferentemente idéntica al menos en un 90 % o al menos en un 95 % a la SEQ ID NO:12.

En otra realización adicional más, una desaturasa para su uso en la presente invención tiene mayor actividad en un sustrato de acil-CoA que en un sustrato de acil-PC correspondiente. En otra realización, una desaturasa para su uso en la presente invención tiene mayor actividad en un sustrato de acil-PC que un sustrato de acil-CoA correspondiente, pero tiene algo de actividad en ambos sustratos. Como se ha esbozado anteriormente, un "sustrato de acil-PC correspondiente" se refiere al ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 de fosfatidilcolina (PC) en donde el ácido graso es el mismo ácido graso que en el sustrato de acil-CoA. En una realización, la actividad es al menos dos veces mayor. En una realización, la desaturasa es una Δ 5 o Δ 6-desaturasa, o una ω 3-desaturasa, de las cuales se proporcionan ejemplos no taxativos en la Tabla 2. Para analizar en qué sustrato actúa una desaturasa, a saber un sustrato de acil-CoA o de acil-PC, se pueden realizar ensayos en células de levadura tal como se describe en Domergue et al. (2003) y (2005). La capacidad del sustrato de acil-CoA para una desaturasa también puede deducirse cuando una elongasa, expresada en conjunto con la desaturasa, tiene una eficacia de conversión enzimática en células vegetales de al menos aproximadamente el 90 % en donde la elongasa cataliza la elongación del producto de la desaturasa. De este modo, la Δ 5-desaturasa y las Δ 4-desaturasas expresadas a partir de la construcción GA7 (Ejemplos 2 y 3) y variaciones de los mismos (Ejemplo 5) son capaces de desaturar sus respectivos sustratos de acil-CoA, ETA-CoA y DPA-CoA.

45 *Elongasas*

La evidencia bioquímica sugiere que la elongación del ácido graso consiste de 4 etapas: condensación, reducción, deshidratación y una segunda reducción. En el contexto de la presente invención, una "elongasa" se refiere a un polipéptido que cataliza la etapa de condensación en presencia de otros miembros del complejo de elongación, en condiciones fisiológicas adecuadas. Se ha demostrado que la expresión heteróloga u homóloga en una célula de únicamente el componente condensador ("elongasa") del complejo de proteína de elongación es necesaria para la elongación de la cadena de acilo respectiva. De este modo, la elongasa introducida es capaz de reclutar con éxito las actividades de reducción y deshidratación del hospedador transgénico para realizar elongaciones de acilo satisfactorias. Se considera que la especificidad de la reacción de elongación con respecto a la longitud de la cadena y al grado de saturación de los sustratos de ácido graso reside en el componente condensador. Asimismo se considera que este componente limita la velocidad en la reacción de elongación.

Como se usa en el presente documento, una " Δ 5-elongasa" es capaz por lo menos de convertir EPA en DPA. Los ejemplos de Δ 5-elongasas incluyen los desvelados en el documento WO2005/103253. En una realización, la Δ 5-elongasa tiene actividad en EPA para producir DPA con una eficacia de al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 65 %, más preferentemente al menos el 70 % o más preferentemente al menos el 80 % o el 90 %. En una realización adicional, la Δ 5-elongasa comprende una secuencia de aminoácido que se proporciona en la SEQ ID NO:37, un fragmento biológicamente activo de esta o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 47 % a la SEQ ID NO:37. En una realización adicional, la Δ 6-elongasa proviene de *Ostreococcus tauri* o *Ostreococcus lucimarinus* (documento US2010/088776).

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 6$ -elongasa" es capaz por lo menos de convertir SDA en ETA. Entre los ejemplos de $\Delta 6$ -elongasas se encuentran aquellos descritos en la Tabla 1. En una realización, la elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:25, un fragmento biológicamente activo de estos (tal como el fragmento que se proporciona en la SEQ ID NO:26) o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 55 % a la SEQ ID NO:25 y/o la SEQ ID NO:26. En una realización, la $\Delta 6$ -elongasa proviene de *Physcomitrella patens* (Zank et al., 2002; Muestreo n.º AF428243) o *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-López et al., 2012).

Como se usa en el presente documento, una " $\Delta 9$ -elongasa" es capaz por lo menos de convertir ALA en ETrA. Entre los ejemplos de $\Delta 9$ -elongasas se encuentran aquellos descritos en la Tabla 1. En una realización, la $\Delta 9$ -elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:43, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 80 % a la SEQ ID NO:43. En otra realización, la $\Delta 9$ -elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:46, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 81 % a la SEQ ID NO:46. En otra realización, la $\Delta 9$ -elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:48, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 50 % a la SEQ ID NO:48. En otra realización, la $\Delta 9$ -elongasa comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en la SEQ ID NO:50, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 50 % a la SEQ ID NO:50. En una realización adicional, la $\Delta 9$ -elongasa tiene una mayor actividad en un sustrato $\omega 6$ que el sustrato $\omega 3$ correspondiente, o al revés.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tiene mayor actividad en un sustrato $\omega 6$ que el sustrato $\omega 3$ correspondiente" se refiere a la actividad relativa de la enzima en sustratos que difieren en cuanto a la acción de una $\omega 3$ desaturasa. Preferentemente, el sustrato $\omega 6$ es LA y el sustrato $\omega 3$ es ALA.

Una elongasa con actividad de $\Delta 6$ -elongasa y $\Delta 9$ -elongasa es capaz por lo menos de (i) convertir SDA en ETA y (ii) convertir ALA en ETrA, y tiene más actividad de $\Delta 6$ -elongasa que actividad de $\Delta 9$ -elongasa. En una realización, la elongasa tiene una eficacia de conversión en SDA para producir ETA que es de al menos el 50 %, más preferentemente de al menos el 60 % y/o una eficacia de conversión en ALA para producir ETrA que es de al menos el 6 % o más preferentemente de al menos el 9 %. En otra realización, la elongasa tiene 6,5 veces más actividad de $\Delta 6$ -elongasa que actividad de $\Delta 9$ -elongasa. En una realización adicional, la elongasa no tiene actividad detectable de $\Delta 5$ -elongasa.

Otras enzimas

Como se usa en el presente documento, la expresión "1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa" (LPAAT), también denominada "ácido lisofosfatídico-aciltransferasa" o "acilCoA-lisofosfatidato-aciltransferasa", se refiere a una proteína que acila *sn*-1-acil-glicerol-3-fosfato (*sn*-1 G-3-P) en la posición *sn*-2 para formar ácido fosfatídico (PA, por sus siglas en inglés). De este modo, la expresión "actividad de 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa" se refiere a la acilación de (*sn*-1 G-3-P) en la posición *sn*-2 para producir PA (EC 2,3.1.51). Se prefieren aquellas LPAAT que pueden utilizar un acil-CoA C22 poliinsaturado como sustrato para transferir el grupo acilo C22 poliinsaturado a la posición *sn*-2 de LPA, formando PA. Dichas LPAAT se ejemplifican en el Ejemplo 13 y pueden analizarse de la forma que se describe en este. En una realización, una LPAAT útil para la invención comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en cualquiera de las SEQ ID NO: 63 a 69, un fragmento biológicamente activo de éstos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 40 % a una o más de las SEQ ID NO: 63 a 69. En una realización preferida, una LPAAT útil para la invención comprende aminoácidos que tienen una secuencia que se proporciona en cualquiera de las SEQ ID NO: 64, 65 y 67, un fragmento biológicamente activo de estos o una secuencia de aminoácido que es idéntica al menos en un 40 % a una o más de las SEQ ID NO: 64, 65 y 67.

Como se usa en el presente documento, la expresión "diacilglicerol aciltransferasa" (EC 2,3.1.20; DGAT) se refiere a una proteína que transfiere un grupo de acilo graso de acil-CoA a un sustrato de diacilglicerol para producir triacilglicerol. De este modo, la expresión "actividad de diacilglicerol aciltransferasa" se refiere a la transferencia de acil-CoA a diacilglicerol para producir triacilglicerol. Existen tres tipos conocidos de DGAT conocidos como DGAT1, DGAT2 y DGAT3, respectivamente. Los polipéptidos DGAT1 normalmente tienen 10 dominios transmembrana, los DGAT2 normalmente tienen 2 dominios transmembrana, mientras que DGAT3 es normalmente soluble. Entre los ejemplos de polipéptidos DGAT1 se encuentran polipéptidos codificados por genes DGAT1 de *Aspergillus fumigatus* (Muestreo n.º XP_755172), *Arabidopsis thaliana* (CAB44774), *Ricinus communis* (AAR11479), *Vernicia fordii* (ABC94472), *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946), *Euonymus alatus* (AAV31083), *Caenorhabditis elegans* (AAF82410), *Rattus norvegicus* (NP_445889), *Homo sapiens* (NP_036211), así como variantes y/o mutantes de estos. Entre los ejemplos de polipéptidos DGAT2 se encuentran polipéptidos codificados por genes DGAT2 de *Arabidopsis thaliana* (Muestreo n.º NP_566952), *Ricinus communis* (AAY16324), *Vernicia fordii* (ABC94474), *Mortierella ramanniana* (AAK84179), *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5), *Bos taurus* (Q70VD8), *Mus musculus* (AAK84175), *Micromonas* CCMP1545, así como variantes y/o mutantes de estos. Entre los ejemplos de polipéptidos DGAT3 se encuentran polipéptidos codificados por genes DGAT3 de cacahuete (*Arachis hypogaea*, Saha, et al.,

2006), así como variantes y/o mutantes de estos.

Polipéptidos/Péptidos

5 El término "recombinante" en el contexto de un polipéptido se refiere al polipéptido producido por una célula, o en un sistema de expresión carente de células, en una cantidad alterada o a un nivel alterado, en comparación con su estado nativo, si es producido de manera natural. En una realización, la célula es una célula que no produce el polipéptido de manera natural. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un gen no endógeno que provoca que se produzca una cantidad alterada del polipéptido. Un polipéptido recombinante para su uso en la invención incluye polipéptidos en la célula, tejido, órgano u organismo, o sistema de expresión carente de células, en que es producido, es decir, un polipéptido que no ha sido purificado o separado de otros componentes de la célula (recombinante) transgénica en la que es producido, y los polipéptidos producidos en dichas células o sistemas carentes de células que posteriormente son purificados lejos de al menos algunos otros componentes.

15 Los términos "polipéptido" y "proteína" generalmente se emplean de manera intercambiable.

Un polipéptido o clase de polipéptidos puede definirse por el nivel de identidad (% de identidad) de su secuencia de aminoácido con respecto a una secuencia de aminoácido de referencia, o por tener un % de identidad mayor con respecto a una secuencia de aminoácido de referencia que con respecto a otra. Normalmente, el % de identidad de un polipéptido con respecto a una secuencia de aminoácido de referencia se determina mediante análisis de GAP (Needleman y Wunsch, 1970; programa GCG) con parámetros de una penalización de creación de huecos = 5 y una penalización de extensión de huecos = 0,3. La secuencia problema tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos y el análisis de GAP alinea las dos secuencias en una región de al menos 15 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia problema tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos y el análisis de GAP alinea las dos secuencias en una región de al menos 50 aminoácidos. Más preferentemente, la secuencia problema tiene una longitud de al menos 100 aminoácidos y el análisis de GAP alinea las dos secuencias en una región de al menos 100 aminoácidos. Incluso más preferentemente, la secuencia problema tiene una longitud de al menos 250 aminoácidos y el análisis de GAP alinea las dos secuencias en una región de al menos 250 aminoácidos. Aun más preferentemente, el análisis de GAP alinea dos secuencias en la totalidad de su longitud. El polipéptido o la clase de polipéptidos pueden tener la misma actividad enzimática o diferente actividad enzimática que el polipéptido de referencia o carecer de dicha actividad. Preferentemente, el polipéptido tiene una actividad enzimática de al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 75 % o al menos el 90 % de la actividad del polipéptido de referencia.

Como se usa en el presente documento, un fragmento "biológicamente activo" es una porción de un polipéptido definido en el presente documento que mantiene una actividad definida de un polipéptido de referencia de longitud completa, tal como actividad de desaturasa y/o de elongasa o actividad de otra enzima. Los fragmentos biológicamente activos, tal como se emplean en el presente documento, excluyen al polipéptido de longitud completa. Los fragmentos biológicamente activos pueden ser una porción de cualquier tamaño a condición de que mantengan la actividad definida. Preferentemente, el fragmento biológicamente activo mantiene al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 75 % o al menos el 90 % de la actividad de la proteína en su longitud completa.

Con respecto a un polipéptido o enzima definida, se apreciará que cifras de % de identidad mayores a las que se proporcionan en el presente documento constituirán realizaciones preferidas. De este modo, según corresponda, en vista de las cifras mínimas de % de identidad, se prefiere que el polipéptido/la enzima comprenda una secuencia de aminoácido que sea idéntica al menos en un 60 %, más preferentemente al menos en un 65 %, más preferentemente al menos en un 70 %, más preferentemente al menos en un 75 %, más preferentemente al menos en un 76 %, más preferentemente al menos en un 80 %, más preferentemente al menos en un 85 %, más preferentemente al menos en un 90 %, más preferentemente al menos en un 91 %, más preferentemente al menos en un 92 %, más preferentemente al menos en un 93 %, más preferentemente al menos en un 94 %, más preferentemente al menos en un 95 %, más preferentemente al menos en un 96 %, más preferentemente al menos en un 97 %, más preferentemente al menos en un 98 %, más preferentemente al menos en un 99 %, más preferentemente al menos en un 99,1 %, más preferentemente al menos en un 99,2 %, más preferentemente al menos en un 99,3 %, más preferentemente al menos en un 99,4 %, más preferentemente al menos en un 99,5 %, más preferentemente al menos en un 99,6 %, más preferentemente al menos en un 99,7 %, más preferentemente al menos en un 99,8 %, e incluso más preferentemente al menos en un 99,9 % a la SEQ ID NO. nominada pertinente.

Se pueden preparar variantes/mutantes de secuencias de aminoácidos de los polipéptidos definidos en el presente documento mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico definido en el presente documento, o mediante la síntesis in vitro del polipéptido deseado. Dichas variantes/mutantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácido. Se puede realizar una combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones para alcanzar la construcción final, a condición de que el producto péptido final posea la actividad enzimática deseada.

Los péptidos mutantes (alterados) pueden prepararse usando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, un polinucleótido definido en el presente documento puede someterse a una mutagénesis in vitro o a técnicas de barajado de ADN como lo describe de manera amplia Harayama (1998). Los productos derivados de ADN

mutado/alterado pueden analizarse fácilmente mediante el uso de técnicas descritas en el presente documento para determinar si poseen, por ejemplo, actividad de desaturasa o de elongasa.

A la hora de diseñar mutantes de secuencias de aminoácidos, la ubicación del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la o las característica o características que se van a modificar. Los sitios para la mutación pueden modificarse de forma individual o en serie, por ejemplo, mediante (1) la sustitución en primera instancia con selecciones conservadoras de aminoácido y en segunda instancia con selecciones más radicales dependiendo de los resultados alcanzados, (2) la eliminación del residuo objetivo o (3) la inserción de otros residuos adyacentes al sitio localizado.

Las eliminaciones de secuencias de aminoácidos oscilan generalmente entre aproximadamente 1 y 15 residuos, más preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 residuos y normalmente entre aproximadamente 1 y 5 residuos contiguos.

En los mutantes de sustitución se elimina al menos un residuo de aminoácido en la molécula de polipéptido y se inserta un residuo diferente en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen sitios que no se conservan entre desaturasas o elongasas de origen natural. Preferentemente, estos sitios son sustituidos de manera relativamente conservadora para mantener la actividad de la enzima. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 3 debajo del título "sustituciones ilustrativas".

En una realización preferida, un polipéptido mutante/variante tiene únicamente, o no más de, uno o dos o tres o cuatro cambios conservadores de aminoácidos en comparación con un polipéptido de origen natural. En la Tabla 3 se proporcionan detalles de los cambios conservadores de aminoácidos. Como se dará cuenta el experto, dichos cambios menores pueden predecirse de forma razonable para no alterar la actividad del polipéptido cuando se expresa en una célula recombinante.

Los polipéptidos pueden producirse de diversas maneras, incluida la producción y la recuperación de polipéptidos naturales o polipéptidos recombinantes de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. En una realización, se produce un polipéptido recombinante mediante el cultivo de una célula capaz de expresar el polipéptido en condiciones eficaces para la producción del polipéptido, tal como una célula hospedadora definida en el presente documento. Una célula más preferida para producir el polipéptido es una célula presente en una planta, especialmente una célula presente en una semilla dentro de una planta.

Polinucleótidos

La solicitud también describe y/o la invención usa polinucleótidos que pueden ser, por ejemplo, un gen, un polinucleótido aislado, una construcción genética quimérica tal como una molécula ADN-T o un ADN quimérico. Puede ser ADN o ARN de origen genómico o sintético, de cadena doble o simple, y combinado con hidratos de carbono, lípidos, proteínas u otros materiales para realizar una actividad en particular definida en el presente documento. El término "polinucleótido" se usa en el presente documento de manera intercambiable con la expresión "molécula de ácido nucleico". "Polinucleótido aislado" significa un polinucleótido que, si se obtiene a partir de una fuente natural, ha sido separado de las secuencias de polinucleótidos con las que estaba asociado o a las que estaba enlazado en su estado nativo, o un polinucleótido de origen no natural. Preferentemente, el polinucleótido aislado se encuentra libre en al menos un 60 %, más preferentemente libre en al menos un 75 % y más preferentemente libre en al menos un 90 % de otros componentes con los que se encuentra asociado de manera natural.

Tabla 3. Sustituciones ilustrativas.

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly

Ser (S)	thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

En un aspecto, un polinucleótido para su uso en la invención es de origen no natural. Los ejemplos de polinucleótidos de origen no natural incluyen, pero sin limitación, aquellos que han sido mutados (por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento) y polinucleótidos en los que un marco de lectura abierto que codifica una proteína se enlaza operativamente a un promotor al cual no se encuentra asociado de manera natural (como en las construcciones que se describen en el presente documento).

Como se usa en el presente documento, el término "gen" debe tomarse en su sentido más amplio e incluye las secuencias de desoxirribonucleótidos que comprenden la región transcrita y, si se traduce, la región codificante de la proteína de un gen estructural e incluye secuencias ubicadas en forma adyacente a la región codificante tanto en el extremo 5' como en el 3' a lo largo de una distancia de al menos 2 kb hacia cada extremo y que participan de la expresión del gen. En este sentido, el gen incluye señales de control tales como promotores, potenciadores, señales de terminación y/o poliadenilación que se encuentran asociadas de manera natural a un gen determinado, o señales heterólogas de control, en cuyo caso se refiere al gen como "gen quimérico". Se refiere a las secuencias que se ubican en 5' de la región codificante de la proteína y se encuentran presentes en el ARNm como secuencias 5' no traducidas. Se refiere a las secuencias que se ubican en 3' o en la parte posterior de la región codificante de la proteína y se encuentran presentes en el ARNm como secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto al ADNc como a las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o un clon de un gen contiene la región codificante que puede encontrarse interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en el ARN nuclear (ARNhn). Los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o se "desempalman" de la transcripción nuclear o primaria; por lo tanto, los intrones se encuentran ausentes de la transcripción de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente. El término "gen" incluye una molécula sintética o de fusión que codifica la totalidad o parte de las proteínas para su uso en la invención descritas en el presente documento y una secuencia de nucleótidos que complementa a cualquiera de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, un "ADN quimérico" o "construcción genética quimérica" se refiere a cualquier molécula de ADN que no sea una molécula de ADN nativa en su ubicación nativa, también denominada en el presente documento como "construcción de ADN". Normalmente, un ADN quimérico o gen quimérico comprende secuencias reguladoras y transcritas o codificantes de proteínas que no se encuentran enlazadas operativamente en forma colectiva en la naturaleza, es decir, que son heterólogas entre sí. En consecuencia, un ADN quimérico o gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero organizadas de manera diferente a la que se encuentran de forma natural.

El término "endógeno" se usa en el presente documento para hacer referencia a una sustancia que normalmente se encuentra presente o se produce, por ejemplo, en una planta no modificada en la misma etapa del desarrollo que la planta en investigación. Un "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su ubicación natural dentro del genoma de un organismo. Como se usa en el presente documento, "molécula de ácido nucleico recombinante", "polinucleótido recombinante" o variaciones de los mismos se refieren a una molécula de ácido nucleico que ha sido construida o modificada mediante tecnología de ADN recombinante. Las expresiones "polinucleótido extraño" o "polinucleótido exógeno" o "polinucleótido heterólogo" y similares se refieren a cualquier ácido nucleico que se introduce en el genoma de una célula mediante manipulaciones experimentales. Los genes extraños o exógenos pueden ser genes que se insertan en un organismo no nativo, genes nativos introducidos en una nueva ubicación dentro del hospedador nativo o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. Las expresiones "genéticamente modificado", "transgénico" y variaciones de los mismos incluyen la introducción de genes en células mediante transformación o transducción, la mutación de genes en el interior de las células y la alteración o modulación de la regulación de un gen en el interior de una célula u organismos en los que se han realizado estas acciones o en cuya progenie se han realizado estas acciones. Como se usa en el presente documento, una "región genómica" se refiere a una posición dentro del genoma donde se ha insertado un transgén o grupo de transgenes (al que también se hace referencia en el presente documento como conglomerado) en una célula, o un ancestro de la misma. Dichas regiones únicamente comprenden nucleótidos que se han incorporado mediante la intervención del hombre, por ejemplo mediante los métodos descritos en el presente documento.

El término "exógeno" en el contexto de un polinucleótido se refiere al polinucleótido cuando este se encuentra presente en una célula en una cantidad alterada en comparación con su estado nativo. En una realización, la célula es una célula que no comprende el polinucleótido de manera natural. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un polinucleótido no endógeno que provoca que se produzca una cantidad alterada del polipéptido

codificado. Un polinucleótido exógeno de la invención incluye polinucleótidos que no han sido separados de otros componentes de la célula (recombinante) transgénica o sistema de expresión carente de células en que se encuentran presentes, así como polinucleótidos producidos en dichas células o sistemas carentes de células que posteriormente se purifican lejos de al menos algunos otros componentes. El polinucleótido exógeno (ácido nucleico) puede ser un tramo contiguo de nucleótidos que existen en la naturaleza o comprenden dos o más tramos contiguos de nucleótidos provenientes de distintas fuentes (de origen natural y/o sintéticos) ligados para formar un único polinucleótido. Normalmente, dichos polinucleótidos quiméricos comprenden al menos un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido para su uso en la invención enlazado operativamente a un promotor adecuado de transcripción conducente del marco de lectura abierto en una célula de interés.

Como se usa en el presente documento, la expresión "diferentes polinucleótidos exógenos" o variaciones de los mismos significan que la secuencia de nucleótidos de cada polinucleótido son diferentes por lo menos en uno, preferentemente en más, nucleótidos. Los polinucleótidos codifican ARN que pueden o no traducirse a una proteína en el interior de la célula. En un ejemplo, se prefiere que cada polinucleótido codifique una proteína con una actividad diferente. En otro ejemplo, cada polinucleótido exógeno es idéntico en menos de un 95 %, menos de un 90 % o menos de un 80 % a los demás polinucleótidos exógenos. Preferentemente, los polinucleótidos exógenos codifican proteínas/enzimas funcionales. Además, se prefiere que los diferentes polinucleótidos exógenos no se encuentren superpuestos en cuanto a que cada polinucleótido sea una región distinta, por ejemplo, del ácido nucleico de transferencia extracromosómica que no se superpone con otro polinucleótido exógeno. Como mínimo, cada polinucleótido exógeno tiene un sitio de inicio y de final de la transcripción, así como el promotor designado. Un polinucleótido exógeno individual puede o no comprender intrones.

Con respecto a los polinucleótidos definidos, se apreciará que cifras de % de identidad mayores a las proporcionadas anteriormente constituirán realizaciones preferidas. De este modo, según corresponda, en vista de las cifras mínimas de % de identidad, se prefiere que el polinucleótido comprenda una secuencia de polinucleótido que sea idéntica al menos en un 60 %, más preferentemente al menos en un 65 %, más preferentemente al menos en un 70 %, más preferentemente al menos en un 75 %, más preferentemente al menos en un 80 %, más preferentemente al menos en un 85 %, más preferentemente al menos en un 90 %, más preferentemente al menos en un 91 %, más preferentemente al menos en un 92 %, más preferentemente al menos en un 93 %, más preferentemente al menos en un 94 %, más preferentemente al menos en un 95 %, más preferentemente al menos en un 96 %, más preferentemente al menos en un 97 %, más preferentemente al menos en un 98 %, más preferentemente al menos en un 99 %, más preferentemente al menos en un 99,1 %, más preferentemente al menos en un 99,2 %, más preferentemente al menos en un 99,3 %, más preferentemente al menos en un 99,4 %, más preferentemente al menos en un 99,5 %, más preferentemente al menos en un 99,6 %, más preferentemente al menos en un 99,7 %, más preferentemente al menos en un 99,8 %, más preferentemente al menos en un 99,9 % a la SEQ ID NO. nominada pertinente.

Un polinucleótido para su uso en la presente invención puede hibridar de forma selectiva, en condiciones rigurosas, para alcanzar un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Como se usa en el presente documento "condiciones rigurosas" son aquellas que (1) durante la hibridación emplean un agente desnaturizante tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 % (p/v), Ficoll al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 %, tampón de fosfato de sodio 50 mM con un pH de 6,5 con NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (2) emplean formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonidos (50 g/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1 % y/o (3) emplean una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/SDS al 0,1 % a 50 °C.

Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden poseer, en comparación con moléculas de origen natural, una o más mutaciones, que sean eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de nucleótidos. Los polinucleótidos que tienen mutaciones relativas a la secuencia de referencia pueden o bien ser de origen natural (es decir, aislados de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo, mediante la realización de mutagénesis dirigida al sitio o barajado de ADN en el ácido nucleico como se describió anteriormente). De este modo, es evidente que los polinucleótidos para su uso en la invención pueden o bien provenir de fuentes de origen natural o ser recombinantes. Los polinucleótidos preferidos son aquellos que tienen regiones codificantes que tienen codones optimizados para la traducción en células vegetales, como se sabe en la técnica.

Vectores recombinantes

Un aspecto de la presente solicitud incluye un vector recombinante, el cual comprende al menos una molécula de polinucleótidos definida en el presente documento, insertada en cualquier vector capaz de llevar la molécula de polinucleótidos a una célula hospedadora. Los vectores recombinantes incluyen vectores de expresión. Los vectores recombinantes contienen secuencias de polinucleótidos heterólogas, esto es, secuencias de polinucleótidos que no se encuentran de manera natural adyacentes a las moléculas de polinucleótidos definidas en el presente documento que preferentemente derivan de una especie distinta a la especie de la cual deriva la o las moléculas de polinucleótidos. El vector puede ser ARN o ADN y normalmente es un plásmido. Normalmente, los vectores

plásmidos incluyen secuencias de ácido nucleico adicionales que permiten la fácil selección, amplificación y transformación del casete de expresión en células procariotas, por ejemplo, vectores derivados de pUC, vectores derivados de pSK, vectores derivados de pGEM, vectores derivados de pSP, vectores derivados de pBS o preferentemente vectores binarios que contienen una o más regiones de ADN-T. Secuencias de ácido nucleico
5 adicionales incluyen orígenes de replicación que permiten la replicación autónoma del vector, genes marcadores seleccionables, que preferentemente codifican resistencia a antibióticos o a herbicidas, sitios únicos de clonación múltiple que permiten que múltiples sitios inserten secuencias de ácido nucleico o genes codificados en la construcción de ácido nucleico y secuencias que potencian la transformación de células (especialmente vegetales) procariotas y eucariotas. El vector recombinante puede comprender más de un polinucleótido definido en el presente
10 documento, por ejemplo tres, cuatro, cinco o seis polinucleótidos definidos en el presente documento en combinación, preferentemente una construcción genética quimérica como se describe en el presente documento, encontrándose cada polinucleótido enlazado operativamente a las secuencias de control de la expresión que son operables en la célula de interés. Más de un polinucleótido definido en el presente documento, por ejemplo 3, 4, 5 o 6 polinucleótidos, preferentemente se ligan covalentemente en conjunto a un vector recombinante simple, preferentemente dentro de una molécula de ADN-T simple, que entonces puede introducirse como una molécula simple en una célula para formar una célula recombinante de acuerdo con la invención y preferentemente se integran dentro del genoma de la célula recombinante, por ejemplo en una planta transgénica. De esta manera, los polinucleótidos que así se ligan serán heredados en su conjunto como un locus genético simple en la progenie de la célula o planta recombinante. El vector o la planta recombinante puede comprender dos o más de dichos vectores
15 recombinantes, cada uno de los cuales contiene múltiples polinucleótidos, por ejemplo en donde cada vector recombinante comprende 3, 4, 5 o 6 polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, "enlazado operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional del elemento regulador de transcripción (promotor) con respecto a una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor se encuentra enlazado operativamente a una secuencia codificante, tal como un polinucleótido definido en el presente documento, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula apropiada. Generalmente, los elementos reguladores de transcripción del promotor que se encuentran enlazados operativamente a una secuencia transcrita se ubican físicamente contiguos a la secuencia transcrita, es decir, actúan en cis. Sin embargo,
25 algunos elementos reguladores de transcripción, tales como los potenciadores, no necesitan encontrarse físicamente contiguos o ubicarse en proximidad estrecha a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Cuando se encuentran presentes múltiples promotores, cada promotor puede ser independientemente el mismo o
35 distinto.

Las moléculas recombinantes tales como los ADN quiméricos o las construcciones genéticas pueden contener también (a) una o más señales secretoras que codifican secuencias de péptidos señal para permitir que un polipéptido expresado definido en el presente documento se secrete desde la célula que produce el polipéptido o que facilita la ubicación del polipéptido expresado, por ejemplo para la retención del polipéptido en el retículo endoplasmático (ER, por sus siglas en inglés) en el interior de la célula o la transferencia dentro de un plasto y/o (b) secuencias de fusión que conducen a la expresión de moléculas de ácido nucleico como proteínas de fusión. Los ejemplos de segmentos adecuados de señales incluyen cualquier segmento de señal capaz de dirigir la secreción o localización de un polipéptido definido en el presente documento. Las moléculas recombinantes también pueden
40 incluir secuencias intermedias y/o no traducidas que se encuentran en los alrededores y/o dentro de las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de ácido nucleico definidas en el presente documento.

Para facilitar la identificación de los transformantes, la construcción de ácido nucleico idealmente comprende un gen marcador seleccionable o detectable como, o sumado a, el polinucleótido extraño o exógeno. "Gen marcador" significa un gen que imparte un fenotipo distintivo a células que expresan el gen marcador y de esta forma permite que dichas células transformadas se distingan de las células que no tienen el marcador. Un gen marcador seleccionable confiere un rasgo por el cual uno puede "seleccionar" basándose en la resistencia a un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida, antibiótico, radiación, calor u otro tratamiento que resulte dañino a las células no transformadas). Un gen marcador analizable (o gen indicador) confiere un rasgo que uno puede identificar mediante observación o pruebas, es decir, mediante "análisis" (por ejemplo, β -glucuronidasa, luciferasa, GFP u otra actividad de enzima no presente en células no transformadas). El gen marcador y la secuencia de nucleótidos de interés no tienen que encontrarse enlazados. La elección de un marcador en cuestión no es crucial a condición de que sea funcional (es decir, selectiva) en combinación con las células elegidas tal como una célula vegetal.
55

Son ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos los marcadores que confieren resistencia a antibióticos tal como la resistencia a la ampicilina, eritromicina, cloranfenicol o tetraciclina, preferentemente resistencia a la kanamicina. Los ejemplos de marcadores seleccionables para la selección de transformantes vegetales incluyen, pero sin limitación, un gen *hyg* que codifica resistencia a la higromicina B; un gen (*nptII*) de neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a la kanamicina, paromomicina, G418; un gen de glutatión-S-transferasa de hígado de rata que confiere resistencia a herbicidas derivados de glutatión como, por ejemplo, se describe en el documento EP 256223; un gen de glutamina sintetasa que confiere, al momento de la sobreexpresión, resistencia a
65

inhibidores de glutamina sintetasa tales como fosfinotricina como, por ejemplo, se describe en el documento WO 87/05327, un gen de acetiltransferasa proveniente de *Streptomyces viridochromogenes* que confiere resistencia a la fosfinotricina del agente selectivo como, por ejemplo, se describe en el documento EP 275957, un gen que codifica una 5-enolshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere tolerancia a N-fosfonometilglicina como, por ejemplo, lo describen Hinchee et al. (1988), un gen bar que confiere resistencia contra bialafos como, por ejemplo, se describe en el documento WO91/02071; un gen de nitrilasa tal como bxn proveniente de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia al bromoxinilo (Stalker et al., 1988); un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR, por sus siglas en inglés) que confiere resistencia al metotrexato (Thillet et al., 1988); un gen mutante de acetolactato sintasa (ALS), el cual confiere resistencia a la imidazolinona, sulfonilurea u otros químicos inhibidores de ALS (EP 154,204); un gen mutado de antranilato sintasa que confiere resistencia al 5-metil triptófano; o un gen de dalapón deshalogenasa que confiere resistencia al herbicida.

Los marcadores analizables preferidos incluyen, pero sin limitación un gen uidA que codifica una enzima β -glucuronidasa (GUS) para la cual se conocen diversos sustratos cromógenos, un gen de proteína fluorescente verde (Niedz et al., 1995) o sus derivados; un gen de luciferasa (luc) (Ow et al., 1986), que permite la detección de bioluminiscencia, y otros conocidos en la técnica. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "molécula indicadora" significa una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que facilita la determinación de actividad del promotor mediante referencia al producto de proteína.

Preferentemente, la construcción de ácido nucleico se incorpora de manera estable al genoma de la célula, tal como la célula vegetal. En consecuencia, el ácido nucleico puede comprender elementos apropiados que permiten que la molécula se incorpore al genoma, preferentemente las secuencias de borde derecho e izquierdo de una molécula de ADN-T o la construcción se coloca en un vector apropiado que puede incorporarse al cromosoma de la célula.

25 Expresión

Como se usa en el presente documento, un vector de expresión es un vector de ADN que es capaz de transformar una célula hospedadora y de efectuar la expresión de una o más molécula o moléculas de polinucleótidos especificados. Los vectores de expresión preferidos de la presente invención pueden dirigir la expresión génica en células de levadura y/o vegetales. Los vectores de expresión útiles para para su uso en la invención contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de transcripción, secuencias de control de traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión de las moléculas de polinucleótidos como se describen en el presente documento. En particular, los polinucleótidos o vectores útiles para la presente invención incluyen secuencias de control de transcripción. Las secuencias de control de transcripción son secuencias que controlan la iniciación, elongación y terminación de la transcripción. Las secuencias de control de transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan la iniciación de transcripción, tales como las secuencias promotoras y potenciadoras. Las secuencias de control de transcripción adecuadas incluyen toda secuencia de control de transcripción que puede funcionar en al menos una de las células recombinantes de la presente invención. La elección de secuencias reguladoras usadas depende del organismo objetivo como puede ser una planta y/u órgano objetivo o tejido de interés. Dichas secuencias reguladoras pueden obtenerse a partir de cualquier organismo eucariótico tal como plantas o virus de plantas, o pueden sintetizarse químicamente. Varias de dichas secuencias de control de transcripción son de conocimiento común de los expertos en la técnica. Las secuencias de control de transcripción particularmente preferidas son promotoras activas en la dirección de la transcripción en plantas, ya sea de forma constitutiva o específica de la etapa y/o el tejido, dependiendo del uso de la planta o las partes de la misma.

Una cantidad de vectores adecuados para la transfección estable de células vegetales o para establecer plantas transgénicas se ha descrito en, por ejemplo, Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, sup. 1987; Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989; y Gelvin et al., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Normalmente, los vectores de expresión vegetal incluyen, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control de transcripción de secuencias 3' y 5' reguladoras y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión vegetal también pueden contener una región reguladora promotora (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada por el ambiente o por el desarrollo, o específica de la célula o del tejido), un sitio de partida de la iniciación de transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

Se ha descrito una cantidad de promotores constitutivos que se encuentran activos en células vegetales. Los promotores adecuados para la expresión constitutiva en plantas incluyen, pero sin limitación, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés), el virus del mosaico de Figwort (FMV, por sus siglas en inglés) 35S, el promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar, el promotor del virus del moteado amarillo de commelina, el promotor inducible por luz proveniente de la pequeña subunidad de la ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa, el promotor de triosafosfato isomerasa citosólica del arroz, el promotor de adenina fosforribosiltransferasa de *Arabidopsis*, el promotor del gen actin 1 del arroz, los promotores de manopina sintasa y octopina sintasa, el promotor de Adh, el promotor de sacarosa sintasa, el promotor del complejo del gen R y el promotor del gen de proteína de unión a clorofila α/β .

A los efectos de la expresión en los tejidos fuente de la planta, tales como la hoja, semilla, raíz o tallo, se prefiere que los promotores utilizados en la presente invención tengan una expresión relativamente elevada en estos tejidos específicos. A estos efectos, uno puede elegir, dentro de un número de promotores, genes con expresión específica o potenciada del tejido o de la célula. Los ejemplos de dichos promotores citados en la bibliografía incluyen el promotor GS2 de glutamina sintetasa del cloroplasto del guisante, el promotor de fructosa-1,6-bisfosfatasa del cloroplasto del trigo, el promotor ST-LS1 fotosintético nuclear de la patata, el promotor de serina/treonina cinasa y el promotor de glucoamilasa (CHS) de *Arabidopsis thaliana*. También se afirma que los promotores de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa y promotores Cab se encuentran activos en tejidos fotosintéticamente activos.

También se puede usar diversos promotores de genes vegetales que se regulan en respuesta a señales ambientales, hormonales, químicas y/o del desarrollo para la expresión de genes en células vegetales, incluidos los promotores regulados por (1) calor, (2) luz (por ejemplo, promotor RbcS-3A del guisante, promotor RbcS del maíz); (3) hormonas, tales como el ácido abscísico, (4) lesión (por ejemplo, Wun1); o (5) químicos, tales como jasmonato de metilo, ácido salicílico, hormonas esteroideas, alcohol, protectores (documento WO97/06269) o también puede ser ventajoso emplear (6) promotores específicos de órganos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "promotor específico de semilla vegetal" o variaciones de la misma se refieren a un promotor que preferentemente, en comparación con otros tejidos vegetales, dirige la transcripción génica en una semilla en desarrollo de una planta. En una realización, el promotor específico de la semilla se expresa con una fuerza al menos 5 veces mayor en la semilla en desarrollo de la planta en relación con las hojas y/o los tallos de la planta y se expresa preferentemente con mayor fuerza en el embrión de la semilla en desarrollo en comparación con otros tejidos. Preferentemente, el promotor únicamente dirige la expresión de un gen de interés en la semilla en desarrollo y/o la expresión del gen de interés en otras partes de la planta tales como las hojas no es detectable por análisis de transferencia Northern y/o TI-PCR. Normalmente, el promotor conduce la expresión de genes durante el crecimiento y desarrollo de la semilla, en particular durante la fase de síntesis y acumulación de compuestos de almacenamiento en la semilla. Dichos promotores pueden conducir la expresión génica en la totalidad del órgano de reserva de la planta o únicamente en una parte de este tal como el revestimiento de la semilla o el o los cotiledones, preferentemente en los embriones, en semillas de plantas dicotiledóneas o la capa de endosperma o aleurona de semillas de plantas monocotiledóneas.

Los promotores preferidos para la expresión específica de la semilla incluyen i) promotores provenientes de genes que codifican enzimas que participan de la biosíntesis de ácido graso y la acumulación en semillas, tales como las desaturasas y elongasas, ii) promotores provenientes de genes que codifican proteínas de almacenamiento de semillas y iii) promotores provenientes de genes que codifican enzimas que participan de la biosíntesis de hidrato de carbono y la acumulación en semillas. Los promotores específicos de la semilla adecuados son los promotores del gen de napina de colza de semilla oleaginosa (documento US5,608,152), el promotor de USP de *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), el promotor de oleosina de *Arabidopsis* (documento WO98/45461), el promotor de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (documento US5,504,200), el promotor de Bce4 de *Brassica* (documento WO91/13980) o el promotor de LeB4 proveniente de *Vicia faba* (Baumlein et al., 1992), así como los promotores que conducen a la expresión específica de la semilla en monocotiledóneas tales como el maíz, la cebada, el trigo, el centeno, el arroz y similares. Promotores destacados que son adecuados son el promotor del gen lpt2 o lpt1 de la cebada (documento WO95/15389 y documento WO95/23230) o los promotores descritos en el documento WO99/16890 (promotores provenientes del gen de hordeína de la cebada, el gen de glutelina del arroz, el gen de orizina del arroz, el gen de prolamina del arroz, el gen de gliadina del trigo, el gen de glutelina del trigo, el gen de zeína del maíz, el gen de glutelina de la avena, el gen de kasirina del sorgo, el gen de secalina del centeno). Otros promotores incluyen aquellos descritos por Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), documento US20070192902 y documento US20030159173. En una realización, el promotor específico de la semilla es preferentemente expresado en partes definidas de la semilla tales como el embrión, el o los cotiledones o el endosperma. Los ejemplos de dichos promotores específicos incluyen, pero sin limitación, el promotor FP1 (Ellerstrom et al., 1996), el promotor de legumina del guisante (Perrin et al., 2000), el promotor de fitohemaglutina del frijol (Perrin et al., 2000), los promotores de conlinina 1 y conlinina 2 para genes que codifican las proteínas de almacenamiento 2S del lino (Cheng et al., 2010), el promotor del gen FAE1 proveniente de *Arabidopsis thaliana*, el promotor de BnGLP del gen de proteína similar a la globulina de *Brassica napus*, el promotor de LPXR del gen de peroxirredoxina proveniente de *Linum usitatissimum*.

La secuencia líder 5' no traducida puede ser derivada del promotor seleccionado para expresar la secuencia génica heteróloga del polinucleótido descrito en el presente documento o preferentemente es heteróloga con respecto a la región codificante de la enzima a producirse y puede ser modificada específicamente si así se desea para incrementar la traducción de ARNm. Para revisar la expresión optimizadora de transgenes, ver Koziel et al. (1996). También pueden obtenerse las regiones 5' no traducidas a partir de ARN virales de plantas (virus del mosaico del tabaco, virus del grabado del tabaco, virus del mosaico enano del maíz, virus del mosaico de la alfalfa, entre otros) provenientes de genes eucarióticos, genes vegetales (líder del gen de proteína de unión a la clorofila a/b del trigo y del maíz) o provenientes de una secuencia génica sintética. La presente descripción no se limita a construcciones en donde la región no traducida es derivada de la secuencia 5' no traducida que acompaña a la secuencia promotora. La secuencia líder también podría ser derivada de un promotor o secuencia codificante no relacionados. Las

secuencias líderes útiles en el contexto de la presente invención comprenden la líder Hsp70 del maíz (documento US 5.362.865 y documento US 5.859.347) y el elemento omega TMV.

La terminación de la transcripción se logra mediante una secuencia 3' de ADN no traducida enlazada operativamente en el vector quimérico al polinucleótido de interés. La región 3' no traducida de una molécula de ADN recombinante contiene una señal de poliadenilación que funciona en las plantas para causar la adición de nucleótidos de adenilato al extremo 3' del ARN. La región 3' no traducida puede obtenerse de diversos genes que se expresan en células vegetales. La región 3' no traducida de nopalina sintasa, la región 3' no traducida del gen de Rubisco de la subunidad pequeña del guisante, la región 3' no traducida del gen de proteína de almacenamiento de la semilla 7S de la soja o un gen de conlinina del lino se usan comúnmente en este rol. Las regiones 3' transcritas no traducidas que contienen la señal de poliadenilato de los genes del plásmido inductor de tumores (Ti, por sus siglas en inglés) de *Agrobacterium* también son adecuadas.

Pueden usarse tecnologías de ADN recombinante para mejorar la expresión de una molécula de polinucleótidos transformada mediante la manipulación, por ejemplo, de la cantidad de copias de la molécula de polinucleótidos en el interior de la célula hospedadora, la eficacia con la que aquellas moléculas de polinucleótidos se transcriben, la eficacia con la que los transcritos resultantes se traducen y la eficacia de las modificaciones posteriores a la traducción. Las técnicas recombinantes útiles para incrementar la expresión de moléculas de polinucleótidos definidas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, la integración de la molécula de polinucleótidos dentro de uno o más cromosomas de la célula hospedadora, la adición de secuencias de estabilidad en los ARNm, las sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), las sustituciones o modificaciones de señales de control de la traducción (por ejemplo, sitios de unión al ribosoma, secuencias Shine-Dalgarno), la modificación de moléculas de polinucleótidos para asemejarse al uso del codón de la célula hospedadora y la eliminación de secuencias que desestabilizan transcritos.

Células recombinantes

La invención también proporciona una célula recombinante, preferentemente una célula vegetal recombinante, la cual es una célula hospedadora transformada con una o más moléculas recombinantes, tales como los polinucleótidos, las construcciones genéticas quiméricas o los vectores recombinantes definidos en el presente documento. La célula recombinante puede comprender cualquier combinación de los anteriores, tales como dos o tres vectores recombinantes o un vector recombinante y uno o más polinucleótidos o ADN quiméricos adicionales. Las células adecuadas de la invención incluyen toda célula que pueda ser transformada con un polinucleótido, ADN quimérico o vector recombinante descritos en el presente documento, tal como, una molécula que codifica un polipéptido o una enzima descrita en el presente documento. Preferentemente, la célula es una célula que, de esta forma, es capaz de ser usada para producir LC-PUFA. La célula recombinante puede ser una célula en cultivo, una célula in vitro o en un organismo tal como una planta o en un órgano tal como una semilla o una hoja. Preferentemente, la célula se encuentra en una planta o parte de una planta, más preferentemente en la semilla de una planta.

Las células hospedadoras en las cuales se introducen el o los polinucleótidos pueden ser o bien células no transformadas o células que ya han sido transformadas con al menos una molécula de ácido nucleico. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden estar relacionadas o no con la síntesis de LC-PUFA. Las células hospedadoras de la presente invención pueden o bien ser capaces de manera endógena (o sea, de manera natural) de producir proteínas definidas en el presente documento, en cuyo caso la célula recombinante derivada de estas tienen una capacidad potenciada de producir los polipéptidos, o pueden ser capaces de producir dichas proteínas únicamente después de ser transformadas con al menos un polinucleótido descrito en el presente documento. En una realización, una célula recombinante de la invención tiene una capacidad potenciada para sintetizar un ácido graso poliinsaturado de cadena larga. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula con una capacidad potenciada para sintetizar un ácido graso poliinsaturado de cadena larga" es una expresión relativa según la cual la célula recombinante de la invención se compara a la célula hospedadora que carece de polinucleótido o polinucleótidos utilizados en la invención, produciendo la célula recombinante más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga o una mayor concentración de LC-PUFA tales como DHA (en relación con otros ácidos grasos) que la célula nativa. La célula con una capacidad mejorada para sintetizar otro producto, tal como otro ácido graso, un lípido, un hidrato de carbono tal como el almidón, una molécula de ARN, un polipéptido, un producto farmacéutico o de otro tipo tiene un significado semejante.

Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína descrita en el presente documento e incluyen células bacterianas, fúngicas (inclusive de levadura), parasitarias, de artrópodo, animales y vegetales. Las células pueden ser procariotas o eucariotas. Las células hospedadoras de preferencia son células de levadura y vegetales. En una realización preferida, la célula vegetal es una célula de semilla, en particular una célula en un cotiledón o endospermo de una semilla. En una realización, la célula es una célula animal o una célula de alga. La célula animal puede ser de cualquier tipo de animal, tal como, por ejemplo, una célula animal no humana, una célula de vertebrado no humano, una célula de mamífero no humano o células de animales acuáticos tales como, por ejemplo, peces o crustáceos, invertebrados, insectos, etc. Las células pueden ser de un organismo adecuado para un proceso de fermentación. Como se usa en el presente

documento, la expresión "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprende una etapa de fermentación. Los ejemplos de organismos fermentativos incluyen organismos fúngicos, tales como la levadura. Como se usa en el presente documento, "levadura" incluye *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Candida* spp., *Kluveromyces* spp., *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Trichoderma* spp., *Lipomyces starkey* y *Yarrowia lipolytica*. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp. y, en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

Plantas transgénicas

La invención también proporciona una planta que comprende una célula de la invención, tal como una planta transgénica que comprende uno o más polinucleótidos como se describen en el presente documento. El término "planta", tal como se usa en el presente documento, se refiere a plantas enteras; cuando se usa el adjetivo "vegetal", se refiere a cualquier sustancia presente en, obtenida de, derivada de o relacionada con una planta, tal como, órganos celulares (por ejemplo, hojas, raíces, flores), células individuales (por ejemplo, polen), semillas, células vegetales y similares. La expresión "parte de planta" se refiere a todas las partes de planta que comprenden el ADN de la planta, inclusive estructuras vegetativas tales como, por ejemplo, hojas o tallos, raíces, órganos o estructuras florales, polen, semilla, partes de semilla tales como un embrión, endospermo, escutelo o episperma, tejido vegetal tal como, por ejemplo, tejido vascular, células y progenie de este, a condición de que la parte de la planta sintetice lípidos de acuerdo con la invención.

Una "planta transgénica", "planta modificada genéticamente" o variaciones de las mismas hacen referencia a una planta que contiene una construcción génica ("transgén") que no se encuentra en una planta de tipo silvestre de la misma especie, variedad o cultivar. Las plantas transgénicas, según se definen en el contexto de la presente invención, incluyen plantas y su progenie, las cuales se han modificado genéticamente con técnicas recombinantes para ocasionar la producción del lípido o al menos un polipéptido definido en el presente documento en la planta u órgano vegetal deseados. Las células vegetales transgénicas y las partes de plantas transgénicas tienen significados correspondientes. En el presente documento se refiere a un "transgén" con su significado normal en la técnica de biotecnología e incluye una secuencia genética que se ha producido o alterado mediante tecnología de ADN o ARN recombinante y que se ha introducido en una célula de la invención, de preferencia una célula vegetal. El transgén puede incluir secuencias genéticas derivadas de una célula vegetal que puede ser de la misma especie, variedad o cultivar que la célula vegetal en la cual se introduce el transgén, de una especie, variedad o cultivar diferente o de una célula que no sea una célula vegetal. Normalmente, el transgén se introdujo en la célula, tal como una planta, mediante manipulación humana, tal como, por ejemplo, mediante transformación, pero puede utilizarse cualquier método que desee el experto en la técnica.

Los términos "semilla" y "grano" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. "Grano" se refiere a grano maduro tal como grano cosechado o grano que se encuentre aún en una planta pero esté listo para cosechar, pero también puede referirse al grano después de imbibición o germinación, de acuerdo con el contexto. La semilla o grano maduro comúnmente tiene un contenido de humedad inferior al 18-20 %. Como se usa en el presente documento, "semilla en desarrollo" se refiere a una semilla antes de su madurez, normalmente encontrada en las estructuras reproductivas de la planta tras la fertilización o antesis, pero puede hacer referencia también a dichas semillas aisladas de la planta antes de la madurez.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "obtener una parte de una planta" u "obtener una semilla" hacen referencia a cualquier medio para obtener una semilla o parte de una planta, respectivamente, inclusive la cosecha de semillas o partes de planta de plantas del campo o contención tal como un invernadero o cámara de crecimiento, o mediante su compra o recibo de un proveedor de las semillas o partes de planta. La semilla puede ser adecuada para plantación, es decir, tener la capacidad de germinar y producir plantas de progenie o, de manera alternativa, haber sido procesada de forma tal que no tiene la capacidad de germinar, por ejemplo, semillas partidas, pulidas o molidas, útiles para aplicaciones culinarias o alimenticias, o para extracción de lípidos de la invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "órgano de almacenamiento vegetal" se refiere a una parte de una planta especializada para almacenar energía en forma de, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, ácidos grasos y/o aceites. Los ejemplos de órganos de almacenamiento vegetal son semillas, fruta, raíces tuberosas y tubérculos. Un órgano de almacenamiento vegetal preferido de la invención es la semilla.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fenotípicamente normal" se refiere a una planta u órgano vegetal genéticamente modificados, en particular un órgano de almacenamiento tal como una semilla, tubérculo o fruta que no tenga una capacidad significativamente reducida de crecer y reproducirse en comparación con una planta u órgano vegetal no modificados. En una realización, la planta u órgano vegetal genéticamente modificado fenotípicamente normal comprende un polinucleótido exógeno que codifica un supresor de silenciamiento unido operativamente a un promotor específico al órgano de almacenamiento vegetal y que tiene una capacidad de crecer o reproducirse que sea esencialmente la misma que la de un órgano o planta isogénica que no comprenda dicho polinucleótido. Preferentemente, la biomasa, tasa de crecimiento, tasa de germinación, tamaño de órgano de almacenamiento, tamaño de la semilla y/o cantidad de semillas viables producidas no es inferior al 90 % de los de una planta que no posea dicho polinucleótido exógeno cuando se cultiva en condiciones idénticas. Esta expresión no

abarca características de la planta que pueden ser distintas a la planta de tipo silvestre pero no tienen la utilidad de la planta con fines comerciales tales como, por ejemplo, un fenotipo de bailarina de hojas de plántula.

5 Las plantas proporcionadas por la presente invención o contempladas para su uso en la misma incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. En realizaciones preferidas, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada o guisantes), u otras legumbres. Las plantas pueden cultivarse para la producción de raíces, tubérculos, hojas, tallos, flores o frutas productos alimenticios. Las plantas pueden ser vegetales o plantas ornamentales. Las plantas de la invención pueden ser: maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), mostaza (*Brassica juncea*), lino (*Linum usitatissimum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (10 (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), boniato (*Lopmoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Anana comosus*), citrus (*Citrus* spp.), cocoa (*Theobroma cacao*), té (*Camellia senensis*), plátano (*Musa* spp.), 15 aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), pacay (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), oliva (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avena o cebada.

20 En una realización preferida, la planta es un angiosperma.

En una realización, la planta es una planta de semilla oleaginosa o una planta de cultivo de semilla oleaginosa. Como se usa en el presente documento, una "planta de semilla oleaginosa" es una especie vegetal utilizada para la producción comercial de aceites de las semillas de la planta. La planta de semilla oleaginosa puede ser colza (tal como colza), maíz, girasol, soja, sorgo, lino (linaza) o remolacha azucarera. Adicionalmente, la planta de semilla oleaginosa puede ser otra planta que produzca Brassicas, algodón, cacahuete, amapola, mostaza, semilla de ricino, sésamo, cártamo o nueces. La planta puede producir altos niveles de aceite en su fruta, tal como la oliva, la palma de aceite o el coco. Las plantas hortícolas a las que se puede aplicar la presente invención son lechuga, endivia o brassicas vegetales, inclusive repollo, brócoli o coliflor. La presente invención puede aplicarse al tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, tomate o pimienta.

30 En una realización adicional preferida, la planta no transgénica utilizada para producir una planta transgénica de la invención produce aceite, especialmente en la semilla, la cual tiene i) menos del 20 %, menos del 10 % o menos del 5 % de ácidos grasos 18:2 y/o ii) menos del 10 % o menos del 5 % de ácidos grasos 18:3.

35 En una realización preferida, la planta transgénica es homocigota para cada gen que se ha introducido (transgén), de manera que su progenie no segrega para el fenotipo deseado. La planta transgénica puede ser también heterocigótica para el o los transgenes introducidos, de preferencia heterocigótica de manera uniforme para el transgén, tal como en la progenie F1 que se cultivó de semillas híbridas. Dichas plantas pueden proporcionar ventajas tales como vigor híbrido, conocido en la técnica.

40 Donde sea pertinente, las plantas transgénicas pueden comprender también transgenes adicionales que codifican enzimas involucradas en la producción de LC-PUFA tal como, pero sin limitación, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 9$ -elongasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\omega 3$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -elongasa, diacilglicerol aciltransferasa, LPAAT, una $\Delta 17$ -desaturasa, una $\Delta 15$ -desaturasa y/o una $\Delta 12$ 45 desaturasa. Se conocen en la técnica ejemplos de dichas enzimas con una o más de estas actividades e incluyen las descritas en el presente documento. En ejemplos específicos, la planta transgénica al menos comprende polinucleótidos exógenos que codifican;

- 50 a) una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -elongasa y una $\Delta 6$ -elongasa,
- b) una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -elongasa y una $\Delta 9$ -elongasa,
- c) una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -elongasa, una $\Delta 9$ -elongasa, y una $\Delta 15$ -desaturasa,
- d) una -desaturasa, una -desaturasa, una -desaturasa, una -elongasa, una -elongasa y una 5-desaturasa,
- 55 e) una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -elongasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 17$ -desaturasa, o
- f) una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -elongasa, una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 17$ -desaturasa.

60 En una realización, los polinucleótidos exógenos codifican conjuntos de polipéptidos que son una $\Delta 6$ -desaturasa de *Pythium irregulare*, una $\Delta 5$ -desaturasa de *Thraustochytrid* o una $\Delta 5$ -desaturasa de *Emiliana huxleyi*, una $\Delta 6$ -elongasa de *Physcomitrella patens*, una $\Delta 5$ -elongasa de *Thraustochytrid* o una $\Delta 5$ -elongasa de *Ostreococcus taurii*, una $\omega 3$ -desaturasa de *Phytophthora infestans* o una $\omega 3$ -desaturasa de *Pythium irregulare* y una $\Delta 4$ -desaturasa de *Thraustochytrid*.

65 En una realización, las plantas de la invención se cultivan en el campo, de preferencia como una población de al menos 1.000 o 1.000.000 plantas que son esencialmente la misma, o en un área de al menos 1 hectárea. Las

densidades de las plantas difieren de acuerdo con la especie de planta, la diversidad de planta, el clima, las condiciones del suelo, el flujo de fertilizantes y otros factores conocidos en la técnica. Por ejemplo, la colza normalmente se cultiva en una densidad de plantación de 1,2-1,5 millones de plantas por hectárea. Las plantas se cosechan tal como se sabe en la técnica, lo que puede comprender poner a las plantas en hileras, hozada y/o segado de las plantas, seguido de desgranado y/o la selección de las partes buenas del material de planta para separar la semilla del resto de las partes de planta a menudo en forma de cascarilla. De manera alternativa, la semilla puede cosecharse de plantas en el campo en un único proceso, a saber, la combinación.

Transformación de plantas

Las plantas transgénicas pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como aquellas descritas en A. Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003), y P. Christou y H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley e hijos (2004).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "transformar de manera estable", "transformado de manera estable" y variaciones de estas hacen referencia a la integración de las moléculas exógenas de ácido nucleico en el genoma de la célula, de forma que se transfieran a células de progenie durante la división celular sin necesidad de seleccionar de manera positiva su presencia. Los transformadores estables, o progenie de estos, pueden seleccionarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la transferencia Southern de ADN cromosómico o hibridación in situ de ADN genómico.

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir genes en células vegetales, dado que el ADN puede introducirse en células en tejidos vegetales completos u órganos vegetales, o explantos en el cultivo de tejidos, ya sea para expresión transitoria o para integración estable del ADN en el genoma de la célula vegetal. Es conocido en la técnica el uso de los vectores de integración vegetal mediada por *Agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales (ver, por ejemplo, documento US 5177010, documento US 5104310, documento US 5004863 o documento US 5159135), inclusive métodos de inmersión floral con *Agrobacterium* u otras bacterias que pueden transferir ADN a células vegetales. La región de ADN a transferir se define por las secuencias limítrofes, y el ADN que interviene (ADN-T) se inserta normalmente en el genoma de la planta. Adicionalmente, la integración del ADN-T es un proceso relativamente preciso que da como resultado pocas reestructuraciones. En las variedades de plantas donde la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficaz, es el método elegido, debido a la naturaleza sencilla y definida de la transferencia génica. Los vectores de transformación de *Agrobacterium* preferidos son capaces de replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*, lo que permite las manipulaciones convenientes descritas (Klee et al., en: *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, Nueva York, p. 179-203 (1985).

Los métodos de aceleración que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, bombardeo de microproyectiles y similares. Un ejemplo de un método para administrar moléculas transformadoras de ácido nucleico a células vegetales es el bombardeo de microproyectiles. Este método fue revisado por Yang et al., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, Inglaterra (1994). Las partículas no biológicas (microproyectiles) que pueden recubrirse con ácidos nucleicos y administrarse a las células mediante una fuerza propulsora. Los ejemplos de partículas incluyen aquellos compuestos de tungsteno, oro, platino y similares. Una ventaja en particular del bombardeo de microproyectiles, además de ser un medio eficaz para transformar las monocotiledóneas de manera reproductiva, es que no se requiere ni el aislamiento de protoplastos, ni la susceptibilidad de infección de *Agrobacterium*.

En otra realización alternativa, los plastos pueden transformarse de manera estable. Los métodos desvelados para la transformación de plastos en plantas mayores incluyen la administración por pistola génica de ADN que contiene un marcador seleccionable y direccionamiento del ADN al genoma del plasto mediante recombinación homóloga (documento US5.451.513, documento US5.545.818, documento US5.877.402, documento US5.932.479 y documento WO99/05265).

Pueden utilizarse otros métodos de transformación celular e incluyen, pero sin limitación, la introducción de ADN en plantas mediante transferencia directa de ADN en polen, mediante inyección directa de ADN en órganos reproductivos de una planta, o mediante inyección directa de ADN en las células de embriones inmaduros, seguida de la rehidratación de embriones deshidratados.

Se conoce en la técnica la regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de una sola planta o de varios explantos transformados (Weissbach et al., en: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif., (1988). Este proceso de regeneración y crecimiento normalmente incluye las etapas de selección de células transformadas, cultivo de las células individualizadas mediante las etapas usuales de desarrollo embrionario mediante la etapa de plántulas arraigadas. Las semillas y los embriones transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes arraigados transgénicos resultantes se plantan luego en un medio de crecimiento vegetal adecuado, tal como el suelo.

Se conoce en la técnica el desarrollo o regeneración de plantas que contienen el gen extraño y exógeno.

Preferentemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigotas. De otra manera, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas cultivadas por semillas de estirpes agrónomicamente importantes. Por el contrario, el polen de plantas de estas estirpes importantes se utiliza para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contenga un ácido nucleico exógeno deseado se cultiva con métodos conocidos para el experto en la técnica.

Para confirmar la presencia de los transgenes en plantas y células transgénicas, puede realizarse una amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o análisis de transferencia Southern, mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los productos de expresión de los transgenes pueden detectarse en cualquiera de una cantidad de formas, dependiendo de la naturaleza del producto, inclusive el ensayo de enzimas y transferencia Western. Una vez obtenidas las plantas transgénicas, pueden cultivarse para producir partes de plantas o tejidos vegetales con el fenotipo deseado. Los tejidos vegetales o las partes de plantas pueden cosecharse y/o pueden recolectarse las semillas. Las semillas pueden servir como fuente de cultivo de plantas adicionales con tejidos o partes que tengan las características deseadas.

Una planta transgénica formada con *Agrobacterium* u otros métodos de transformación normalmente contiene un único locus genético en un cromosoma. Puede decirse que dichas plantas transgénicas son hemicigóticas para el o los genes añadidos. Se prefiere más una planta transgénica que sea homocigota para el o los genes añadidos; es decir, una planta transgénica que contiene dos genes añadidos, un gen en el mismo locus en cada cromosoma de un par de cromosomas. Puede obtenerse una planta transgénica homocigota mediante la autofertilización de una planta transgénica hemicigótica, germinación de parte de las semillas producidas y análisis de las plantas resultantes en búsqueda del gen de interés.

También debe entenderse que dos plantas transgénicas distintas que contienen dos locus o genes exógenos segregantes de manera independiente pueden también cruzarse (aparearse) para producir descendencia que contenga ambos conjuntos de genes o locus. La autopolinización o una progenie apropiada de F1 pueden producir plantas homocigotas para ambos locus o genes exógenos. Se contemplan también el retrocruzamiento a una planta parental y el cruzamiento con una planta no transgénica, así como la propagación vegetativa. Pueden encontrarse descripciones de otros métodos de fitomejoramiento usados comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en Fehr, en: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Potenciación de niveles de ARN exógeno y expresión estabilizada

Supresores de silenciamiento

En una realización, una célula, planta o parte de planta de la invención comprende un polinucleótido exógeno que codifica una proteína supresora del silenciamiento.

El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) es un mecanismo de defensa específico de la secuencia de nucleótidos que puede dirigirse a ARNm tanto celular como viral dado que la degradación PTGS ocurre en plantas u hongos transformados de manera estable o transitoria con ADN extraño (heterólogo) o endógeno y da como resultado la acumulación reducida de moléculas de ARN con una similitud de secuencia al ácido nucleico introducido.

Se ha considerado ampliamente que la coexpresión de un supresor de silenciamiento con un transgén de interés aumentará los niveles de ARN presente en la célula transcrita del transgén. Mientras que esto se ha comprobado en las células in vitro, se han observado efectos secundarios significativos en muchos estudios de coexpresión en plantas completas. Más específicamente, según se describe en Mallory et al. (2002), Chapman et al. (2004), Chen et al. (2004), Dunoyer et al. (2004), Zhang et al. (2006), Lewsey et al. (2007) y Meng et al. (2008), las plantas que expresan supresores de silenciamiento, generalmente bajo promotores constitutivos, son a menudo fenotípicamente anormales al grado en que no son útiles para la producción comercial.

Se ha descubierto recientemente que pueden aumentarse los niveles de moléculas de ARN y/o pueden estabilizarse los niveles de moléculas de ARN a lo largo de varias generaciones al limitar la expresión del supresor de silenciamiento a una semilla de una planta o parte de esta (documento WO2010/057246). Como se usa en el presente documento, una "proteína supresora de silenciamiento" o SSP (por sus siglas en inglés) es cualquier polipéptido que puede expresarse en una célula vegetal que potencia el producto de nivel de expresión de un transgén distinto en la célula vegetal, particularmente a lo largo de generaciones repetidas de la planta transformada inicialmente. En una realización, la SSP es un supresor de silenciamiento viral o un mutante de este. Son conocidos en la técnica una gran cantidad de supresores de silenciamiento viral e incluyen, pero sin limitación, P19, V2, P38, Pe-Po y RPV-P0. En una realización, el supresor de silenciamiento viral comprende aminoácidos con una secuencia como la proporcionada en cualquiera de las SEQ ID NO 53 a 57, un fragmento biológicamente activo de estas o una secuencia de aminoácidos que es al menos en un 50 % idéntica a una o más de las SEQ ID NO 53 a 57 y la cual tiene actividad como un supresor de silenciamiento.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "expresión estabilizadora", "expresado de manera estable", "expresión estabilizada" y variaciones de estas hacen referencia a que el nivel de la molécula de ARN es

esencialmente el mismo o mayor en plantas de progenie a lo largo de generaciones repetidas, por ejemplo al menos tres, al menos cinco o al menos 10 generaciones, en comparación con plantas isogénicas que carezcan el polinucleótido exógeno que codifica el supresor de silenciamiento. Sin embargo, estas expresiones no excluyen la posibilidad de que, a lo largo de las generaciones repetidas, haya una pérdida de niveles de la molécula de ARN en comparación con una generación anterior, por ejemplo, una pérdida no menor a un 10 % por generación.

El supresor puede seleccionarse entre cualquier fuente, por ejemplo, planta, virus, mamífero, etc. Véase el documento WO2010/057246 para una lista de virus de los cuales puede obtenerse el supresor y la proteína (por ejemplo, B2, P14, etc.) o designación de región de codificación para el supresor de cada virus en particular. Pueden usarse varias copias de un supresor. Pueden utilizarse juntos diferentes supresores (por ejemplo, en tándem).

Moléculas de ARN

Esencialmente, puede expresarse con el supresor de silenciamiento cualquier molécula de ARN que se desee expresar en una semilla vegetal. Los polipéptidos codificados pueden estar involucrados en el metabolismo del aceite, almidón, hidratos de carbono, nutrientes, etc., o pueden ser responsables de la síntesis de proteínas, péptidos, ácidos grasos, lípidos, ceras, aceites, almidones, azúcares, hidratos de carbono, sabores, olores, toxinas, carotenoides, hormonas, polímeros, flavonoides, proteínas de almacenamiento, ácidos fenólicos, alcaloides, ligninas, taninos, celulosas, glicoproteínas, glucolípidos, etc., de preferencia la biosíntesis o montaje de TAG.

En un ejemplo en particular, las plantas produjeron un aumento de niveles de enzimas para la producción de aceite en plantas tales como Brassicas, por ejemplo colza o girasol, cártamo, lino, algodón, soja, *Camelina* o maíz.

Niveles producidos de LC-PUFA

Son de importancia los niveles de los LC-PUFA o combinación de LC-PUFA que se producen en la parte de planta, como la semilla, o célula recombinante. Los niveles pueden expresarse como una composición (en porcentaje) del ácido graso total que es un LC-PUFA particular o grupo de LC-PUFA relacionados, por ejemplo los ω 3 LC-PUFA, los ω 6 LC-PUFA, los VLC-PUFA u otros que puedan determinarse por métodos conocidos en la técnica. El nivel también puede expresarse como un contenido de LC-PUFA, tal como el porcentaje de LC-PUFA en el peso seco de material que comprende las células recombinantes, por ejemplo el porcentaje del peso de semillas que son LC-PUFA. Se apreciará que las LC-PUFA que se producen en una semilla oleaginosa pueden ser considerablemente mayores en términos de contenido de LC-PUFA en un vegetal o grano que no se cultiva para producción de aceite, y aun así pueden tener composiciones de LC-PUFA similares, y pueden utilizarse ambas como fuentes de LC-PUFA para consumo humano o animal.

Los niveles de LC-PUFA pueden determinarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. En un método preferido, los lípidos totales se extraen de las células, tejidos u organismos y los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos previo al análisis mediante cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés). Dichas técnicas se describen en el Ejemplo 1. La posición del pico en el cromatograma puede utilizarse para identificar cada ácido graso en particular, y el área bajo cada pico se puede integrar para determinar la cantidad. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el porcentaje de ácidos grasos particulares en una muestra se determina como el área bajo el pico para ese ácido graso como porcentaje del área total para ácidos grasos en el cromatograma. Esto corresponde esencialmente a un porcentaje en peso (p/p). La identidad de los ácidos grasos puede confirmarse mediante CG-EM. Pueden separarse los lípidos totales mediante técnicas conocidas en la técnica para purificar fracciones tales como la fracción TAG. Por ejemplo, puede realizarse una cromatografía en capa fina (CCF) en una escala analítica para separar TAG de otras fracciones de lípidos, tales como DAC, acil-CoA o fosfolípidos, con la finalidad de determinar específicamente la composición de ácidos grasos de TAG.

En una realización, la suma total de ARA, EPA, DPA y DHA en los ácidos grasos en los lípidos extraídos está entre aproximadamente el 7 % y aproximadamente el 25 % de los ácidos grasos totales en la célula. En una realización adicional, el total de ácidos grasos en la célula tiene menos del 1 % de C20:1. En realizaciones preferidas, el TAG extraíble en la célula comprende los ácidos grasos en niveles mencionados en el presente documento. También se encuentra comprendida cada combinación posible de las características que definen los lípidos descritos en el presente documento.

El nivel de producción de LC-PUFA en la célula recombinante, planta o parte de planta tal como una semilla también puede expresarse como un porcentaje de conversión de un ácido graso de un sustrato específico a uno o más ácidos grasos producidos, que se denomina en el presente documento una "eficacia de conversión" o "eficacia enzimática". Este parámetro está basado en la composición del ácido graso en el lípido extraído de la célula, planta o parte de planta o semilla, es decir, la cantidad de los LC-PUFA formados (inclusive otros LC-PUFA derivados de estos) como un porcentaje de uno o más sustratos de ácido graso (inclusive todos los ácidos grasos derivados de estos). La fórmula general para un porcentaje de conversión es: $100 \times (\text{la suma de porcentajes de los LC-PUFA producidos y todos los productos derivados de estos}) / (\text{la suma de los porcentajes del sustrato de ácido graso y todos los productos derivados de estos})$. Con respecto al DHA, por ejemplo, esto puede expresarse como la relación del

nivel de DHA (como porcentaje en el total del contenido de ácido graso en el lípido) al nivel de un sustrato de ácido grado (por ejemplo, OA, LA, ALA, SDA, ETA O EPA) y todos los productos que no sean DHA derivados del sustrato. El porcentaje de conversión o eficacia de conversión puede expresarse para una única etapa enzimática en una vía, o para parte de la vía o la vía completa.

5

Las eficacias de conversión específicas se calculan en el presente documento de acuerdo con las fórmulas:

1. OA a DHA = $100 \times (\% \text{ de DHA}) / (\% \text{ de suma para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
- 10 2. LA a DHA = $100 \times (\% \text{ de DHA}) / (\% \text{ de suma para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
3. ALA a DHA = $100 \times (\% \text{ de DHA}) / (\% \text{ de suma para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
4. EPA a DHA = $100 \times (\% \text{ de DHA}) / (\% \text{ de suma para EPA, DPA y DHA})$.
- 15 5. DPA to DHA (eficacia de $\Delta 4$ -desaturasa) = $100 \times (\% \text{ de DHA}) / (\% \text{ de suma para DPA y DHA})$.
6. Eficacia de $\Delta 12$ -desaturasa = $100 \times (\% \text{ de suma para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA}) / (\% \text{ de suma para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
7. Eficacia de $\omega 3$ -desaturasa = $100 \times (\% \text{ de suma para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA}) / (\% \text{ de suma para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
- 20 8. OA a ALA = $100 \times (\% \text{ de suma para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA}) / (\% \text{ de suma para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
9. Eficacia de $\Delta 6$ -desaturasa (en ALA de sustrato $\omega 3$) = $100 \times (\% \text{ de suma para SDA, ETA, EPA, DPA y DHA}) / (\% \text{ de ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
10. Eficacia de $\Delta 6$ -elongasa (en SDA de sustrato $\omega 3$) = $100 \times (\% \text{ de suma para ETA, EPA, DPA y DHA}) / (\% \text{ de suma para SDA, ETA, EPA, DPA y DHA})$.
- 25 11. Eficacia de $\Delta 5$ -desaturasa (en ETA de sustrato $\omega 3$) = $100 \times (\% \text{ de suma para EPA, DPA y DHA}) / (\% \text{ de suma para ETA, EPA, DPA y DHA})$.
12. Eficacia de $\Delta 5$ -elongasa (en EPA de sustrato $\omega 3$) = $100 \times (\% \text{ de suma para DPA y DHA}) / (\% \text{ de suma para EPA, DPA y DHA})$.

- 30 La composición de ácidos grasos del lípido, de preferencia aceite de semilla, de la invención, también se caracteriza por la relación de ácidos grasos $\omega 6$: ácidos grasos $\omega 3$ en el contenido total de total ácidos grasos, por ácidos grasos $\omega 6$ totales:ácidos grasos $\omega 3$ totales o por ácidos grasos $\omega 6$ nuevos:ácidos grasos $\omega 3$ nuevos. Las expresiones ácidos grasos $\omega 6$ totales, ácidos grasos $\omega 3$ totales, ácidos grasos $\omega 6$ nuevos y ácidos grasos $\omega 3$ nuevos tienen los significados definidos en el presente documento. Las relaciones se calculan de la composición de ácidos grasos en el lípido extraído de la célula, planta, parte de planta o semilla, de la forma que se ilustra en el presente documento.
- 35 Es deseable tener un nivel mayor de ácidos grasos $\omega 3$ que $\omega 6$ en el lípido y, por lo tanto, se prefiere una relación $\omega 6$: $\omega 3$ inferior a 1,0. Una relación de 0,0 indica una ausencia total de los ácidos grasos $\omega 6$ definidos; una relación de 0,03 se alcanzó según lo descrito en el Ejemplo 6. Dichas relaciones bajas pueden lograrse a través del uso combinado de una $\Delta 6$ -desaturasa, la cual tiene una preferencia de sustrato $\omega 3$ junto con una $\omega 3$ -desaturasa, en particular una $\omega 3$ -desaturasa fúngica tal como la $\omega 3$ -desaturasa *Pichia pastoris* según se ejemplifica en el presente documento.

El rendimiento de LC-PUFA en peso de semilla también puede calcularse con base en el contenido total de aceite en la semilla y el % de DHA en el aceite. Por ejemplo, si el contenido de aceite de la semilla de colza es de aproximadamente el 40 % (p/p) y aproximadamente el 12 % del contenido total de ácidos grasos del aceite es DHA, el contenido de DHA de la semilla es de aproximadamente el 4,8 % o aproximadamente 48 mg por gramo de semilla. Según se describe en el Ejemplo 2, el contenido de DHA de la semilla *Arabidopsis* que tiene aproximadamente el 9 % de DHA, que tiene un contenido de aceite menor que la colza, era de aproximadamente 25 mg/g de semilla. En un contenido de DHA de aproximadamente el 7 %, la semilla de colza o *Camelina sativa* tiene un contenido de DHA de aproximadamente 28 mg por gramo de semilla. La presente invención, por lo tanto, proporciona las plantas *Brassica napus*, *B. juncea* y *Camelina sativa* y semillas obtenidas de estas, que comprenden al menos aproximadamente 28 mg de DHA por gramo de semilla. La semilla tiene un contenido de humedad convencional para las semillas maduras cosechadas después del secado (4-15 % de humedad). La invención también proporciona un proceso para obtener aceite, que comprende obtener la semilla y extraer el aceite de la semilla, y usos del aceite y métodos para obtener la semilla, que comprenden cosechar las semillas de las plantas de acuerdo con la invención.

La cantidad de DHA producido por hectárea también puede calcularse si se conoce o puede estimarse el rendimiento de la semilla por hectárea. Por ejemplo, la colza en Australia normalmente proporciona aproximadamente 2,5 toneladas de semilla por hectárea, las cuales, a 40 % de contenido de aceite, proporcionan aproximadamente 1000 kg de aceite. Al 12 % de DHA en el aceite total, esto proporciona aproximadamente 120 kg de DHA por hectárea. Si el contenido de aceite se reduce en un 50 %, esto todavía proporciona aproximadamente 60 kg de DHA/ha.

65 Las pruebas a la fecha sugieren que algunas desaturasas expresadas de manera heteróloga en levadura o plantas tienen una actividad relativamente baja en combinación con algunas elongasas. Esto puede paliar al proporcionar

una desaturasa con la capacidad de usar una forma acil-CoA del ácido graso como un sustrato en la síntesis de LC-PUFA, y se considera que esto conlleva ventajas en células recombinantes, en particular en células vegetales. Una combinación particularmente beneficiosa para una síntesis eficaz de DHA es una ω 3-desaturasa fúngica, por ejemplo como la ω 3-desaturasa *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 12), con una Δ 6-desaturasa con una referencia por sustratos de acilo ω 3 tales como, por ejemplo, la Δ 6-desaturasa de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 13) o variantes de esta con al menos de 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "carece esencialmente" significa que la composición (por ejemplo lípido o aceite) comprende poco (por ejemplo, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,25 % o menos de aproximadamente el 0,01 %) o nada del componente definido. En una realización, "carece esencialmente" significa que el componente no es detectable con una técnica analítica habitual, por ejemplo, un ácido graso específico (tal como ácido ω 6-docosapentanoico) no puede detectarse con cromatografía de gases, según se esboza en el Ejemplo 1.

15 Producción de aceites

Las técnicas que se practican habitualmente en la técnica pueden utilizarse para extraer, procesar y analizar los aceites producidos por células, plantas, semillas, etc. de la presente invención. Normalmente, las semillas vegetales se cocinan, se exprimen y se extraen para producir aceite en bruto, el cual después se desgoma, refina, blanquea y desodoriza. Generalmente, se conocen en la técnica los métodos para triturar semillas. Por ejemplo, las semillas oleaginosas pueden templarse rociándolas con agua para aumentar el contenido de humedad a, por ejemplo, 8,5 % y se descascaran con un rodillo liso con una brecha establecida en 0,23 a 0,27 mm. Dependiendo del tipo de semilla, no podrá añadirse agua antes de la trituración. La aplicación de calor desactiva las enzimas, facilita la rotura adicional de las células, fusiona las gotas de aceite y aglomera las partículas de proteína, lo que facilita el proceso de extracción.

En una realización, la mayoría del aceite de semilla se libera mediante pasaje a través de una prensa de tornillo. Las tortas expulsadas de la presa de tornillo son extraídas con solventes, por ejemplo, con hexano, con una columna con aplicación de calor. De manera alternativa, el aceite en bruto producido mediante la operación de prensa se puede hacer pasar a través de un decantador con una superficie de desagüe de cable perforado para quitar los sólidos que se expresan con el aceite durante la operación de prensa. El aceite aclarado se puede hacer pasar a través de un filtro de placa y marco para quitar todas las partículas sólidas y finas. Si se desea, el aceite recuperado del proceso de extracción puede combinarse con el aceite aclarado para producir un aceite en bruto mezclado.

Una vez que el solvente se separa del aceite en bruto, las partes prensadas y extraídas se combinan y se someten a procedimientos normales de procesamiento de aceite. Como se usa en el presente documento, el término "purificado", al usarse junto con lípidos u aceites de la invención, normalmente significa que el lípido o aceite se ha sometido a una o más etapas de procesamiento de aumento de la pureza del componente de lípido/aceite. Por ejemplo, una etapa de purificación puede comprender uno o más del grupo que consiste en: desgomar, desodorizar, decolorar, secar y/o fraccionar el aceite extraído. Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, el término "purificado" no incluye un proceso de transesterificación u otro proceso que altere la composición de ácidos grasos del lípido o aceite de la invención con la finalidad de aumentar el contenido de DHA como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos. En otras palabras, la composición de ácidos grasos de los lípidos o aceites purificados es esencialmente la misma que la de los lípidos o aceites sin purificar.

45 *Desgomado*

El desgomado es una etapa temprana en el refinado de aceites y su objetivo primordial es quitar la mayoría de los fosfolípidos del aceite, que pueden estar presentes como aproximadamente el 1-2 % del total de los lípidos extraídos. La adición de un ~2 % de agua, que normalmente contiene ácido fosfórico, a 70-80 °C al aceite en bruto da como resultado la separación de la mayoría de los fosfolípidos acompañados de trazas metálicas y pigmentos. El material insoluble que se quita es principalmente una mezcla de fosfolípidos y triacilgliceroles y también se conoce como lecitina. El desgomado puede realizarse añadiendo ácido fosfórico concentrado al aceite de semilla para convertir fosfátidos no hidratables en una forma hidratable, y para quelar metales menores que están presentes. La goma se separa del aceite de semilla mediante centrifugado.

Refinación alcalina

La refinación alcalina es uno de los procesos de refinado para el tratamiento de aceite en bruto, denominado a veces neutralización. Normalmente se realiza tras el desgomado y antecede el blanqueo. Tras el desgomado, el aceite de semilla puede tratarse añadiendo una cantidad suficiente de una solución alcalina para titular todos los ácidos grasos y ácidos fosfóricos y quitando los jabones que se forman. Los materiales alcalinos adecuados incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio e hidróxido de amonio. Este proceso normalmente se realiza a temperatura ambiente y quita la fracción de ácidos grasos libres. El jabón se quita mediante centrifugado o por extracción en un solvente para el jabón, y el aceite neutralizado se lava con agua. De ser necesario, cualquier exceso alcalino en el aceite puede neutralizarse

con un ácido adecuado, tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

Blanqueo

- 5 El blanqueo es un proceso de refinamiento en el cual los aceites se calientan a 90-120 °C durante 10-30 minutos en presencia de tierra de blanqueo (0,2-2,0 %) y en ausencia de oxígeno, mediante funcionamiento con nitrógeno, vapor o al vacío. Esta etapa en el procesamiento del aceite está diseñada para quitar pigmentos no deseados (carotenoides, clorofila, gopiol, etc.) y el proceso también quita productos de oxidación, trazas metálicas, compuestos de azufre y trazas de jabón.

10

Desodorización

La desodorización es un tratamiento de aceites y grasas a una temperatura alta (200-260 °C) y presión baja (0,1–1 mm Hg). Esto se logra normalmente al introducir vapor en el aceite de semilla a una tasa de aproximadamente 0,1 ml/minuto/100 ml de aceite de semilla. Después de aproximadamente 30 minutos de inyección de aire, el aceite de semilla se deja enfriar al vacío. Normalmente, el aceite de semilla se transfiere a un recipiente de vidrio y se llena de argón antes de almacenarse en refrigeración. Este tratamiento mejora el color del aceite de semilla y quita una mayoría de las sustancias volátiles o compuestos fétidos, inclusive cualquier remanente de ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y productos de oxidación.

20

Winterización

La winterización es un proceso utilizado ocasionalmente en la producción comercial de aceites para la separación de aceites y grasas en fracciones sólidas (estearina) y líquidas (oleínas) mediante cristalización a temperaturas subambiente. Se aplicó originalmente al aceite de semilla de algodón para producir un producto carente de sólidos. Se utiliza normalmente para disminuir el contenido de ácidos grasos saturados de los aceites.

25

Transesterificación

30 La transesterificación es un proceso que intercambia los ácidos grasos dentro y entre TAG o transfiere los ácidos grasos a otro alcohol para formar un éster, inicialmente mediante la liberación de ácidos grasos de los TAG ya sea como ácidos grasos libres o como ésteres de ácidos grasos, por lo general ésteres etílicos o ésteres metílicos de ácidos grasos. Al combinarse con un proceso de fraccionamiento, la transesterificación puede utilizarse para modificar la composición de ácidos grasos de los lípidos (Marangoni et al., 1995). La transesterificación puede utilizar medios químicos (por ejemplo, ácido fuerte o base catalizada) o enzimáticos; los últimos utilizan lipasas, las que pueden tener una posición específica (específica *sn*-1/3 o *sn*-2) para el ácido graso en el TAG, o tener una preferencia por algunos ácidos grasos sobre otros (Speranza et al., 2012). El fraccionamiento de ácidos grasos para aumentar la concentración de LC-PUFA en un aceite puede alcanzarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cristalización por congelación, formación de complejos con urea, destilación molecular, extracción con fluido supercrítico y formación de complejos con iones de plata. La formación de complejos con urea es un método preferido por su simplicidad y eficacia en la reducción del nivel de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el aceite (Gamez et al., 2003). Inicialmente, los TAG del aceite se separan en sus ácidos grasos componentes, a menudo en forma de ésteres de ácido graso, mediante hidrólisis en condiciones de reacción catalizada básica o ácida, donde un mol de TAG se hace reaccionar con al menos 3 moles de alcohol (por ejemplo, etanol para ésteres etílicos o metanol para ésteres metílicos) con exceso de alcohol utilizado para facilitar la separación de los ésteres de alquilo formados y el glicerol que también se forma, o mediante lipasas. Estos ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos, los cuales no son por lo general alterados en la composición de ácidos grasos por el tratamiento, pueden mezclarse entonces con una solución etanólica de urea para la formación de complejos. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados forman complejos fácilmente con la urea y se cristalizan al enfriarse, y pueden, posteriormente, quitarse mediante filtración. La fracción en complejo que no es de urea se enriquece con LC-PUFA.

40

45

50

Piensos

55 La presente memoria descriptiva describe composiciones que pueden utilizarse como piensos. Para los fines de la presente invención, "piensos" o "productos alimenticios" incluye cualquier comida o preparación para consumo humano o animal que, al llevarse al cuerpo (a) sirven para nutrir o construir tejidos o proporcionar energía; y/o (b) mantener, restaurar o apoyar la función metabólica o el estado nutricional adecuado. Los piensos o productos alimenticios producidos de acuerdo con la invención incluyen composiciones nutricionales para bebés y/o niños pequeños, tales como, por ejemplo, fórmulas para lactantes y el polvo de la semilla de la invención.

60

Los piensos o productos alimenticios producidos de acuerdo con la invención comprenden, por ejemplo, una célula de la invención, una planta de la invención, la parte de la planta de la invención, la semilla de la invención, un extracto de la invención, el producto del método de la invención, el producto del proceso de fermentación como se describe en el presente documento o una composición junto con uno o más vehículos adecuados. El término "vehículo" se utiliza en su sentido más amplio para abarcar cualquier componente que pueda tener valor nutricional o no. Como lo apreciará el experto en la técnica, el vehículo debe ser adecuado para su uso (o utilizado en una

65

concentración lo suficientemente baja) en un pienso, de forma que no tenga un efecto perjudicial sobre un organismo que consuma el pienso.

5 El pienso o producto alimenticio producido de acuerdo con la presente invención comprende un aceite, éster de ácido graso o ácido graso producido directa o indirectamente a través del uso de los métodos, células o plantas desvelados en el presente documento. La composición puede estar en forma sólida o líquida. Adicionalmente, la composición puede incluir macronutrientes, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y/o minerales productos alimenticios en cantidades deseadas para un uso en particular. Las cantidades de estos ingredientes variarán dependiendo de si la composición está dirigida al uso con individuos normales o para el uso con individuos con
10 necesidades especializadas, tales como individuos que sufren de trastornos metabólicos y similares.

Los ejemplos de vehículos adecuados con valor nutricional incluyen, pero sin limitación, macronutrientes tales como grasas, hidratos de carbono y proteínas productos alimenticios. Los ejemplos de dichas grasas productos alimenticios incluyen, pero sin limitación, aceite de coco, aceite de borraja, aceite fúngico, aceite de cassis, aceite de soja, monoglicéridos y diglicéridos. Los ejemplos de dichos hidratos de carbono incluyen (pero sin limitación): glucosa, lactosa producto alimenticio y almidón hidrolizado. Adicionalmente, los ejemplos de proteínas que pueden utilizarse en la composición nutricional descrita en el presente documento incluyen (pero sin limitación) proteínas de soja, suero de leche electrodiálizado, leche desnatada electrodiálizada, suero de leche o los hidrolizados de estas
15 proteínas.

Con respecto a las vitaminas y minerales, los siguientes pueden añadirse a las composiciones de pienso o productos alimenticios producidas de acuerdo con la presente invención: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yoduro y Vitaminas A, E, D, C y el complejo B. También pueden añadirse otras vitaminas y minerales de este tipo.
20

Los componentes utilizados en las composiciones de pienso o productos alimenticios producidas de acuerdo con la presente invención pueden tener origen semipurificado o purificado. Por purificado o semipurificado se entiende un material que se preparó mediante purificación de un material natural o mediante síntesis primaria.
25

Una composición de pienso o producto alimenticio producido de acuerdo con la presente invención también puede añadirse a comida, incluso cuando no es necesaria la suplementación de la dieta. Por ejemplo, la composición puede añadirse a la comida de cualquier tipo, inclusive (pero sin limitación): margarina, manteca modificada, quesos, leche, yogur, chocolate, dulces, refrigerios, aceites para ensalada, aceites de cocina, grasas de cocina, carnes, pescado y bebidas.
30

El género *Saccharomyces* spp se utiliza en la destilación de la cerveza y la confección de vino, y también es un agente en el horneado, particularmente de pan. También son útiles otras levaduras tales como levadura oleaginosa, inclusive, por ejemplo, *Yarrowia* spp, en la producción de LC-PUFA. Las levaduras pueden utilizarse como un aditivo en la alimentación animal, tal como la acuicultura. Será aparente que pueden proporcionarse cepas de levadura modificadas genéticamente que están adaptadas para sintetizar LC-PUFA, según se describe en el presente documento. Estas cepas de levadura, o los LC-PUFA producidos en ellas, pueden utilizarse en productos alimenticios y en la producción de vino y cerveza para proporcionar productos que tengan un contenido potenciado de ácidos grasos.
35

Adicionalmente, también pueden utilizarse los ácidos grasos producidos de acuerdo con la presente invención o las células hospedadoras transformadas para contener y expresar los genes en cuestión como complementos de alimento animal para alterar la composición de ácidos grasos el tejido, huevos o leche de un animal para un consumo humano o animal más deseable. Los ejemplos de dichos animales incluyen ovejas, ganado, caballos, aves de corral tales como pollos y similares.
40

Adicionalmente, los piensos producidos de acuerdo con la invención pueden utilizarse en acuicultura para mejorar los niveles de ácidos grasos en los peces o en crustáceos tales como, por ejemplo, langostinos para consumo humano o animal. El salmón es un pez preferido.
45

Los piensos o productos alimenticios preferidos producidos de acuerdo con la invención son las plantas, semillas y otras partes de plantas, tales como las hojas y los tallos, que puedan ser utilizadas directamente como comida o alimento para seres humanos u otros animales. Por ejemplo, los animales pueden alimentarse directamente de las plantas cultivadas en el campo o ser alimentados con cantidades más medidas en alimentación controlada. La invención incluye el uso de dichas plantas y partes de plantas como alimento para aumentar los niveles de LC-PUFA en seres humanos y otros animales.
50

Composiciones

La presente solicitud también describe composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los ácidos grasos y/o aceites resultantes producidos utilizando los métodos de la invención.
55
60
65

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más de los ácidos grasos y/o aceites, en combinación con un adyuvante, vehículo o excipiente convencional, conocido, no tóxico y farmacéuticamente aceptable, tal como salina tamponada con fosfato, agua, etanol, polioles, aceites vegetales, un agente humectante o una emulsión tal como una emulsión agua/aceite. La composición puede estar en forma sólida o líquida. Por ejemplo, la composición
 5 puede estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido ingerible, inyectable o crema o ungüento tópico. Puede mantenerse una fluidez propicia, por ejemplo, al mantener el tamaño de partículas necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes,
 10 agentes aromatizantes y agentes perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden comprender agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias.
 15

Las formas sólidas de dosificación tales como comprimidos y cápsulas pueden prepararse con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos grasos producidos de acuerdo con la presente invención pueden hacerse comprimidos con bases convencionales de comprimidos tales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz, junto con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes, tales como almidón de patata o ácido algínico, y un lubricante, tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las cápsulas pueden prepararse incorporando estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con antioxidantes y el o los ácidos grasos pertinentes.
 20

Para la administración intravenosa, los ácidos grasos producidos de acuerdo con la presente invención o los derivados de estos pueden incorporarse en formulaciones comerciales.
 25

Una dosificación típica de un ácido graso en particular es de 0,1 mg a 20 g, tomada de una a cinco veces por día (hasta 100 g por día) y se encuentra, de preferencia, en el intervalo de aproximadamente el 10 mg a aproximadamente el 1, 2, 5 o 10 g por día (en una o múltiples dosis). Según se conoce en la técnica, es deseable un mínimo de aproximadamente el 300 mg/día de ácidos grasos, especialmente LC-PUFA. Sin embargo, se apreciará que cualquier cantidad de ácidos grasos será beneficiosa para el sujeto.
 30

Las posibles vías de administración de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, enteral (por ejemplo, oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida puede administrarse por vía oral o rectal. Adicionalmente, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua y mezclarse en condiciones estériles con conservantes, tampones, propulsores o diluyentes fisiológicamente aceptables, para formar un pulverizador o inhalador.
 35

La dosificación de la composición a ser administrada al paciente puede determinarse por un experto en la técnica y depende de varios factores tales como el peso del paciente, la edad del paciente, salud general del paciente, historia anterior del paciente, la situación inmunitaria del paciente, etc.
 40

Adicionalmente, las composiciones descritas en el presente documento pueden utilizarse con fines cosméticos. Puede añadirse a composiciones cosméticas preexistentes, de modo que se forme una mezcla o puede utilizarse un ácido graso producido de acuerdo con la solicitud objeto como el único ingrediente "activo" en una composición cosmética.
 45

Ejemplos

50 **Ejemplo 1. Materiales y métodos**

Expresión de genes en células vegetales en un sistema de expresión transitoria

Las construcciones genéticas exógenas se expresaron en células vegetales en un sistema de expresión transitoria esencialmente según lo descrito por Voinnet et al. (2003) y Wood et al. (2009). Se introdujeron a la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* los plásmidos que contenían una región de codificación a expresar de un promotor constitutivo fuerte tal como el promotor CaMV 35S. Un gen quimérico 35S:p19 para la expresión del supresor de silenciamiento viral p19 se introdujo por separado a AGL1, según se describe en el documento WO 201/057246. Las células recombinantes de *Agrobacterium* se cultivaron a 28 °C en caldo LB complementado con 50 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de rifampicina en la fase estacionaria. Las bacterias se precipitaron por centrifugado a 5000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de resuspenderse a DO600 = 1,0 en un tampón de filtración con MES 10 mM pH 5,7, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 100 M. Las células se incubaron a 28 °C con agitación durante 3 horas antes de mezclar volúmenes iguales de cultivos de *Agrobacterium* que contenían 35S:p19 y la o las construcciones quiméricas de prueba de interés, antes de la filtración al tejido foliar. Las plantas se cultivaron normalmente durante cinco días más después de la filtración antes de que los discos de hoja se tomaran y se liofilizaron para el análisis por CG de los ácidos grasos.
 55
 60
 65

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de lípidos de hoja totales en muestras liofilizadas se produjeron al incubar las muestras en una solución de metanol/HCl/diclorometano (10/1/1 v/v) durante 2 horas a 80 °C junto con una cantidad conocida de ácido hexadecanoico como un patrón interno. Los FAME se extrajeron en hexano/DCM, se concentraron a un volumen pequeño en hexano y se inyectaron en una CG. La cantidad de ácidos grasos individuales y totales presentes en las fracciones de lípido se cuantificaron sobre la base de la cantidad conocida de patrón interno.

Análisis por cromatografía de gases (CG) de ácidos grasos

Los FAME se analizaron mediante cromatografía de gases con Agilent Technologies 7890A CG (Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con una columna SGE-BPX70 de 30 m (70 % de cianopropil polisilfenileno-siloxano, 0,25 mm de diámetro interior, 0,25 mm de grosor de película), un FID, un inyector con/sin división y un inyector y muestreador automático Agilent Technologies 7693 Series. Se utilizó helio como gas transportador. Las muestras se inyectaron en el modo división (proporción 50:1) a una temperatura de horno de 150 °C. Tras la inyección la temperatura del horno se mantuvo a 150 °C durante 1 minuto y se aumentó a 210 °C a 3 °C.min⁻¹, se aumentó nuevamente a 240 °C a 50 °C.min⁻¹ y finalmente se mantuvo durante 1,4 min a 240 °C. Los picos se cuantificaron con el software ChemStation de Agilent Technologies (Rev B.04,03 (16), Palo Alto, California, EE.UU.) con base en la respuesta de la cantidad conocida del patrón externo GLC-411 (Nucheck) y el patrón interno C17:0-ME.

Análisis de lípidos de cromatografía líquida - espectrometría de masas (CL-EM)

Los lípidos totales se extrajeron de semillas desarrolladas liofilizadas doce días después de florecer (daf) y semillas maduras tras añadir una cantidad conocida de tri-C 17:0-TAG como un patrón interno de valoración. Los lípidos extraídos se disolvieron en 1 ml de hidroxitolueno butilado 10 mM en butanol:metanol (1:1 v/v) por 5 mg de material seco y se analizaron con un LC Agilent 1200 series y un CL-EM triple cuadrupolo de ionización por electronebulización 6410b. Los lípidos se separaron con cromatografía usando una columna Ascentis Express RP-Amide (50 mm x 2,1 mm, 2,7 µm, Supelco) operando un gradiente binario con una velocidad de flujo de 0,2 mL/min. Las fases móviles fueron: A. formiato de amonio 10 mM en H₂O:metanol:tetrahidrofurán (50:20:30 v/v/v); B. formiato de amonio 10 mM en H₂O:metanol:tetrahidrofurán (5:20:75 v/v/v). Las listas de monitoreo de reacción múltiple (MRM) se basaron en los siguientes ácidos grasos principales: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6 con una energía de colisión de 30 V y un fragmentador de 60 V. Se identificó el TAG de MRM individual con base en el hierro precursor amoniado y el hierro producido de la pérdida neutral de 22:6. El TAG se cuantificó con un patrón externo de triestearina 10 µM.

Determinación del perfil del contenido de aceite y ácidos grasos de la semilla

Donde había que determinar el contenido de aceite, las semillas se secaron en un desecador durante 24 horas y se transfirieron aproximadamente 4 mg de semillas a un vial de vidrio de 2 ml con tapa rosca de teflón. Se añadieron al vial 0,05 mg de triheptadecanoína disueltos en 0,1 ml de tolueno como patrón interno.

Los FAME de las semillas se prepararon añadiendo 0,7 ml de HCl metanólico 1N (Supelco) al vial que contenía material de semilla, se agitaron brevemente con formación de vórtice y se incubaron a 80 °C durante 2 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 0,3 ml de NaCl al 0,9 % (p/v) y 0,1 ml de hexano al vial y se mezcló bien durante 10 minutos en Heidolph Vibramax 110. Los FAME se recolectaron en un inserto de vidrio de 0,3 ml y se analizaron mediante CG con un detector de ionización de llama (FID), según ha mencionado anteriormente.

Las áreas de pico de FAME individuales se corrigieron primero sobre la base de las respuestas de las áreas de pico de cantidades conocidas de los mismos FAME presentes en un patrón comercial GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., EE.UU.). GLC-411 contiene cantidades iguales de 31 ácidos grasos (% en peso) en un intervalo de C8:0 a C22:6. En el caso de los ácidos grasos, que no estaban presentes en el patrón, los inventores tomaron las respuestas de las áreas de pico de los FAME más parecidos. Por ejemplo, la respuesta del área de pico de los FAME de 16:1d9 se utilizó para 16:1d7 y la respuesta de FAME de C22:6 se utilizó para C22:5. Las áreas corregidas se utilizaron para calcular la masa de cada FAME en la muestra mediante comparación con la masa del patrón interno. El aceite se almacena principalmente en forma de TAG y su peso se calculó con base en el peso de FAME. Se determinó el total de moles de glicerol mediante el cálculo de moles por cada FAME y la división del total de moles de FAME entre tres. El TAG se calculó como la suma de glicerol y restos de ácidos grasos con una relación: % de aceite en peso = 100x ((41x total mol FAME/3)+(total g FAME- (15x total mol FAME)))/g semilla, donde 41 y 15 son pesos moleculares del resto de glicerol y grupo metilo, respectivamente.

Análisis del contenido de esteroles de las muestras de aceite

Las muestras de aproximadamente 10 mg de aceite, junto con una alícuota añadida de C24:0 monol como patrón interno, se saponificaron con 4 ml de KOH al 5 % en MeOH al 80 % y se calentaron durante 2 horas a 80 °C en un tubo de vidrio con tapa rosca de teflón. Después de enfriarse la mezcla de reacción, se añadieron 2 ml de agua Milli-Q y los esteroides se extrajeron en 2 ml de hexano:diclorometano (4:1 v/v) mediante agitación y formación de vórtice.

La mezcla se centrifugó y el extracto de esteroles se quitó y lavó con 2 ml de agua Milli-Q. El extracto de esteroles se quitó después de agitar y centrifugar. El extracto se evaporó con una corriente de gas de nitrógeno y los esteroides se sililaron con 200 ml de BSTFA y calentamiento durante 2 horas a 80 °C.

5 Para el análisis CG/CG-EM de los esteroides, se secaron los derivados de esteroles-OTMSi en una corriente de gas de nitrógeno en un bloque térmico a 40 °C y luego se redisolviaron en cloroformo o hexano inmediatamente antes del análisis CG/CG-EM. Los derivados de esteroles-OTMS se analizaron mediante cromatografía de gases (CG) con Agilent Technologies 6890A CG (Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con una columna capilar de sílice fundida (15 m x 0,1 mm d.i., 0,1 µm de grosor de película), un FID, un inyector con/sin división y un inyector y muestreador automático Agilent Technologies 7683B Series. El helio fue el gas transportador. Las mezclas se inyectaron en el modo sin división a temperatura de horno de 120 °C. Tras la inyección, la temperatura del horno se aumentó a 270 °C a 10 °C min⁻¹ y finalmente a 300 °C a 5 °C min⁻¹. Los picos se cuantificaron con software Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, California, EE.UU.). Los resultados de CG están sujetos a un error de ± el 5 % de áreas componentes individuales.

15 Los análisis por CG-espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un CG-EM Finnigan Thermoquest GCQ y un CG-EM Finnigan Thermo Electron Corporation; ambos sistemas se ajustaron con un inyector en columna y software Thermoquest Xcalibur (Austin, Texas, EE.UU.). Cada CG se ajustó con una columna capilar de polaridad similar a la descrita anteriormente. Los componentes individuales se identificaron con datos del espectro de masas y mediante comparación de datos de tiempo de retención con los obtenidos para patrones de laboratorio y auténticos. Simultáneamente, se realizó un análisis en blanco de procedimiento completo al lote de muestra.

Condiciones de TI-PCR

25 La amplificación por PCR con transcripción inversa (TI-PCR) se realizó normalmente con el sistema de TI-PCR Superscript III One-Step (Invitrogen) en un volumen de 25 µl con 10 pmol del cebador hacia adelante y 30 pmol del cebador inverso, MgSO₄ en una concentración final de 2,5 mM, 400 ng de ARN total con componentes de nucleótidos y tampón de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los regímenes típicos de temperatura fueron: 30 1 ciclo de 45 °C durante 30 minutos para que ocurriera la transcripción inversa; luego, 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos seguidos de 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 70 °C durante 1 minuto; luego, 1 ciclo de 72 °C durante 2 minutos antes de enfriar las mezclas de reacción a 5 °C.

Producción de embriones somáticos de *B. napus* mediante inducción con 35S-LEC2

35 Las semillas de *B. napus* (cv. Oscar) se esterilizaron con gas de cloro según lo descrito por (Attila Kereszt et al., 2007). Las semillas esterilizadas se germinaron en medio de EM de potencia 1/2 (Murashige y Skoog, 1962) con agar al 0,8 % ajustado a pH 5,8 y cultivado a 24 °C con luces fluorescentes (50 µE/m²s) con un fotoperíodo de 18/6 h (luz/oscuridad) durante 6-7 días. Los pecíolos cotiledonares con una longitud de tallo de 2-4 mm se aislaron de manera aséptica de esas plántulas y se utilizaron como explantos. Los cultivos de la cepa transformada de *A. tumefaciens* AGL1, uno de ellos con un vector binario específico de la semilla y el segundo con una construcción 35S-LEC2, se inocularon de colonias únicas de placas frescas y se cultivaron en 10 ml de medio LB con antibióticos apropiados y se cultivaron durante la noche a 28 °C con agitación a 150 rpm. Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugado a 4000 rpm durante 5 minutos, se lavaron con medio de EM con sacarosa al 2 % y se resuspendieron en 10 ml del mismo medio, y se cultivaron con antibióticos para la selección, según fuera apropiado, 45 4 horas después de la adición de acetosiringona a 100 µM. Dos horas después de la adición a los tejidos vegetales, se añadió espermidina a una concentración final de 1,5 mM y la densidad final de las bacterias se ajustó a DO 600 nm = 0,4 con medio fresco. Los dos cultivos bacterianos, uno con la construcción específica de la semilla y el otro con 35S-AtLEC2, se mezclaron en proporciones 1:1 y 1:1,5.

50 Los pecíolos cotiledonares de *B. napus* recientemente aislados se infectaron con 20 ml de cultivos de *A. tumefaciens* durante 6 minutos. Los pecíolos cotiledonares se transfirieron en papel de filtro estéril para quitar el exceso de *A. tumefaciens* y luego se transfirieron a medio de cocultivo (medio de EM con 1 mg/l de TDZ, 0,1 mg/l de NAA, 100 µM de acetosiringona complementada con L-cisteína (50 mg/l), ácido ascórbico (15 mg/l) y MES (250 mg/l)). Las placas se sellaron con cinta micropore y se incubaron en la oscuridad a 24 °C durante 48 horas. Los explantos cocultivados se transfirieron a medio de preselección ((EM con 1 mg/l de TDZ, 0,1 mg/l de NAA, 3 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima y 50 mg/l de timentina) y se cultivaron durante 4-5 días a 24 °C con un fotoperíodo de 16 horas/8 horas. Los explantos se transfirieron a medio de selección (EM con 1 mg/l de TDZ, 0,1 mg/l de NAA, 3 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima y 50 mg/l de timentina) de acuerdo con el gen marcador seleccionable en el vector específico de la semilla y se cultivaron durante 2-3 semanas a 24 °C con un fotoperíodo de 16 horas/8 horas. Los explantos con callos embriogénicos verdes se transfirieron a medio de EM sin hormonas (EM con 3 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de timentina y el agente de selección) y se cultivaron durante 2-3 semanas más. Los embriones en etapa torpedo o cotiledonar aislados de explantos sobrevivientes en el medio de selección se analizaron en búsqueda de la composición de ácidos grasos en sus lípidos totales con CG.

65 **Ejemplo 2. Expresión estable de vías de DHA transgénicas en semillas de *Arabidopsis thaliana***

Construcción del vector binario

Los vectores binarios pJP3416-GA7 y pJP3404 contenían, cada uno, siete genes heterólogos de biosíntesis de ácidos grasos que codificaban 5 desaturasas y 2 elongasas, y un marcador seleccionable de planta entre las repeticiones de los bordes izquierdo y derecho del ADN-T presente en cada vector (Figuras 2 y 3). La SEQ ID NO:1 proporciona la secuencia de nucleótidos de la región de ADN-T de pJP3416-GA7 de las secuencias de borde derecho al izquierdo. Ambas construcciones genéticas contenían genes vegetales optimizados por codones que codificaban una desaturasa $\Delta 12$ de *Lachancea kluyveri* (que comprendía los nucleótidos 14143-16648 de la SEQ ID NO: 1), una desaturasa $\Delta 6$ de *Micromonas pusilla* (que comprendía los nucleótidos 226-2309 de la SEQ ID NO: 1), las desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 4$ de *Pavlova salina* (que comprendían los nucleótidos 4524-6485 y 10157-14142 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente) y las elongasas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ de *Pyramimonas cordata* (que comprendían los nucleótidos 2310-4523 y 17825-19967 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente). Las regiones específicas de la región de ADN-T (Orientación: secuencias de borde izquierdo a derecho) del vector binario pJP3416-GA7 con respecto a la SEQ ID NO: 1 son las siguientes:

Nucleótidos 1-163: Borde derecho; 480-226, terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (TER_NOS); 1883-489, desaturasa $\Delta 6$ de *Micromonas pusilla*; 2309-1952, promotor de napina truncado de *Brassica napus* (PRO_FP1); 2310-3243, promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana* (PRO_FAE1); 3312-4181, elongasa $\Delta 6$ de *Pyramimonas cordata*; 4190-4523, terminador de lectina de *Glycine max* (TER_Lectina); 4524-4881, PRO_FP1; 4950-6230: desaturasa $\Delta 5$ de *Pavlova salina*; 6231-6485: TER_NOS; 7653-6486, región de unión a la matriz de Rb7 de *Nicotiana tabacum* (MAR); 8387-7654, terminador de conlinina1 de *Linum usitatissimum* (TER_Cnl1); 9638-8388, desaturasa $\omega 3$ de *Pichia pastoris*; 10156-9707, promotor de conlinina1 de *Linum usitatissimum* (PRO_Cnl1); 10157-12189, promotor de conlinina1 de *Linum usitatissimum*; 12258-13604, desaturasa $\Delta 4$ de *Pavlova salina*; 13605-14142, terminador de conlinina2 de *Linum usitatissimum*; 14143-14592, PRO_Cnl1; 14661-15914, desaturasa $\Delta 12$ de *Lachancea kluyveri*; 15915-16648, TER_Cnl1; 17816-16649, MAR; 17825-18758, PRO_FAE1; 18827-19633, elongasa $\Delta 5$ de *Pyramimonas cordata*; 19634-19967, TER_Lectina; 19990-20527, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor con región duplicada del potenciador; 20537-21088, fosfotricin-N-acetiltransferasa de *Streptomyces viridochromogenes*; 21097-21349, TER_NOS; 21367-21527, borde izquierdo.

Cada una de las siete regiones de codificación en las construcciones estaba bajo el control de un promotor específico de la semilla - se utilizaron tres promotores diferentes, a saber, el promotor de napina truncado de *Brassica napus* (pBnFP1), el promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana* (pAtFAE1) y el promotor de conlinina1 de *Linum usitatissimum* (pLuCnl1). Los siete genes de biosíntesis de ácidos grasos, en conjunto, codificaron una vía completa de síntesis de DHA que estaba diseñada para convertir 18:1 $\Delta 9$ (ácido oleico) en 22:6 $\Delta 4,7,10,13,16,19$ (DHA). Ambos vectores binarios contenían una región de codificación de marcador seleccionable de planta BAR unida operativamente a un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con región duplicada del potenciador y un terminador de la transcripción de la región 3' de poliadenilación de *A. tumefaciens*. El marcador seleccionable de la planta estaba situado adyacente al borde izquierdo de la región de ADN-T y, por ende, ubicado de manera distal en el ADN-T con respecto a la orientación de la transferencia de ADN-T a las células vegetales. Esto aumentó la probabilidad de que una transferencia parcial del ADN-T, la cual probablemente no incluiría el gen marcador seleccionable, no fuera seleccionada. Tanto pJP3416-GA7 como pJP3404 contenían un origen de replicación RiA4 de *Agrobacterium rhizogenes* (Hamilton, 1997).

El pJP3416-GA7 se generó mediante la síntesis de la región de ADN correspondiente a los nucleótidos 226-19975 de la SEQ ID NO: 1 (región GA7) y la inserción de esta región en el vector binario receptor pJP3416 en el sitio PspOMI. Cada gen biosintético de ácido graso en GA7 incluía una secuencia de región 5' no traducida (5'UTR) del virus del mosaico de tabaco, la cual se encontraba unida operativamente a cada región de codificación, entre el promotor y la iniciación de la traducción ATG, para maximizar la eficacia de la traducción de los ARNm producidos de los genes. La construcción GA7 también incluía dos secuencias de región de unión a la matriz (MAR) de Rb7 de *Nicotiana tabacum*, según lo descrito por Hall et al. (1991). Las secuencias MAR, a veces denominadas regiones de unión nuclear, pueden unirse específicamente a la matriz nuclear in vitro y pueden mediar la unión de la cromatina a la matriz nuclear in vivo. Se piensa que las MAR funcionan para reducir el silenciamiento de transgenes. En pJP3416-GA7, las MAR también se insertaron y posicionaron dentro de la región de ADN-T para que funcionaran como espaciadores de ADN para aislar los casetes de expresión génica. El vector pJP3416, antes de la inserción de la región GA7, contenía únicamente el casete del marcador seleccionable de la planta entre los bordes.

La construcción genética pJP3404 se hizo mediante inserciones basadas en enzimas de restricción de secuencias en las que se añadieron casetes génicos al vector binario, pJP3367, que comprendía genes para la producción de SDA en las semillas. Esta construcción contenía genes que codificaban la $\Delta 12$ -desaturasa de *L. kluyveri* y la $\omega 3$ -desaturasa de *P. pastoris* de ambas expresadas mediante el promotor de napin truncado (FP1) *B. napus*, y la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* expresada mediante el promotor FAE1 *A. thaliana* (Figura 4). Primero, el intrón FAD2 de *A. thaliana* se flanqueó por sitios EcoRI y se clonó en el sitio pJP3367 MfeI para generar pJP3395. Un fragmento que contenía los casetes P. cordata $\Delta 6$ - y $\Delta 5$ -elongasa impulsados por los promotores FAE1 y FP1, respectivamente, se clonó en el sitio KasI de pJP3395 para generar pJP3398. pJP3399 se generó entonces mediante el reemplazo del origen de replicación RK2 en pJP3398 con un origen de replicación RiA4. El vector binario final, pJP3404, se generó

mediante la clonación del fragmento flanqueado SbfI que contenía los casetes de *P. salina* $\Delta 5$ - y $\Delta 4$ -desaturasa impulsados por los promotores FP1 y FAE1, respectivamente, en el sitio SbfI de pJP3399.

Transformación de *A. thaliana* y análisis de la composición del ácido graso

5 Los vectores quiméricos se introdujeron en la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* y en células de cultivos de *Agrobacterium* transformado usado para tratar plantas *A. thaliana* (ecotipos Columbia y un mutante fad2) usando el método de inmersión floral para la transformación (Clough y Bent, 1998). Después de la maduración, las semillas T1 de las plantas tratadas se cosecharon y se colocaron en placas de EM que contenían PPT para seleccionar las plantas que contenían el gen marcador de selección BAR. Las plántulas sobrevivientes saludables T1 se transfirieron al suelo. Después de que las plantas crecieron hasta la madurez y se permitió la autofertilización, las semillas T2 de estas plantas se cosecharon y la composición del ácido graso del lípido de la semilla se analizó por análisis CG tal como se describe en el Ejemplo 1.

15 Los datos del nivel de DHA en los lípidos de la semilla se muestran en la Figura 5 (canales etiquetados T2) para 13 transformantes usando pJP3416-GA7 en el fondo genético Columbia, y para seis transformantes usando el mutante fad2. La construcción pJP3416-GA7 resulta en la producción de niveles de DHA ligeramente superiores, como un porcentaje del contenido total de ácido graso, en promedio que los de la construcción pJP3404. La tabla 4 muestra la composición del ácido graso del lípido total de la semilla de las estirpes T2 con los niveles de DHA más elevados. 20 Las eficacias de conversión calculadas para cada etapa enzimática en la producción de DHA a partir de ácido oleico en las mismas semillas se muestran en la Tabla 5. Las eficacias de conversión se calcularon como (% de producto x 100)/(sustrato restante + % de producto) expresado de este modo como un porcentaje.

25 El nivel más elevado de DHA producido que se observó en las estirpes transformadas de pJP3416-GA7 T2 fue del 6,2 %, con un 0,5 % de EPA y un 0,2 % de DPA adicionales (estirpe n.º 14). Estas semillas T2 aún estaban segregando para el transgén, es decir, todavía no eran homocigotos uniformes. Los datos recopilados de los perfiles del lípido total de la semilla de la semilla transgénica independiente (Tabla 4) se muestran en la Tabla 6. Los niveles de ácidos grasos $\omega 3$ producidos como resultado de los transgenes en estas semillas (total de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos, sin incluir el nivel de ALA que se produjo de forma endógena en el fondo genético Columbia) fue del 10,7 % 30 mientras que el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ (total de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos, sin incluir 18:2 $\Delta 9,12$) fue del 1,5 %. Esto representa una relación extremadamente favorables de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos:ácidos grasos $\omega 6$ nuevos, a saber 7,3:1.

35 Las semillas T2 de estirpes seleccionadas transformadas con pJP3416-GA7, a saber, para las estirpes designadas 7, 10, 14, 22 y 34 en el fondo genético Columbia y para las estirpes designadas 18, 21 y 25 en el fondo genético mutante fad2, se colocaron en placas de medios de EM que contenían PPT para la selección de plántulas transgénicas in vitro. Veinte plántulas resistentes a PPT para cada estirpe se transfirieron al suelo y se cultivaron hasta la madurez después de la autofertilización. Era muy probable que estas plantas fueran homocigotas para el gen marcador de selección, y de este modo, para al menos una inserción de ADN-T en el genoma de las plantas. 40 Las semillas T3 de estas plantas se cultivaron y analizaron para obtener su composición de ácidos grasos en su aceite de semilla por CG. Los datos se muestran en la Tabla 7. El análisis reveló que la construcción pJP3416-GA7 generó niveles más altos de $\omega 3$ LC-PUFA DHA en las semillas T3 de las plantas homocigotas en la semilla T2 que segrega. Se observó hasta aproximadamente el 13,9 % de DHA en la estirpe transformada pJP3416-GA7 T3 designada 22.2 en el fondo genético Columbia, aumentado a partir del 5,5 % en la semilla hemocigota T2, con un nivel total de aproximadamente el 24,3 % de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos como un porcentaje del total de ácidos grasos en el contenido lípido de la semilla. Los ácidos grasos $\omega 6$ nuevos estaban a un nivel del 1,1 % del total de ácidos grasos, representando una relación muy favorable de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos:ácidos grasos $\omega 6$ nuevos, a saber, aproximadamente 22:1. De manera similar, los transformantes en el fondo genético mutante fad2 rindieron un 0,6 % como total de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos, que incluye el 11,5 % de DHA, como un porcentaje del total de ácidos grasos en el contenido lípido de la semilla. 50

Tabla 4. La composición del ácido graso del lípido total de la semilla a partir de semillas transgénicas independientes T2 *Arabidopsis* con niveles en el extremo más alto del intervalo observado. 'Col' se refiere al ecotipo Columbia y 'FAD2' al ecotipo mutante fad2. 'GA7' se refiere a la transformación con el ADN-T del vector pJP3416-GA7, pJP3404 con el ADN-T del vector pJP3404. Los ácidos grasos 20:1n-9 y 20:1n-11 no se resolvieron en el análisis por CG. "Otros ácidos grasos menores" incluyen 14:0, 16:1n7, 16:1n9, 16:1n13t, 16:2n6, 16:3n3, i18:0, 18:1n5, 20:1n5, 22:0, 22:1n7, 22:1n11/n13, 24:0, 24:1n9. 55

	pJP3404_Col_#1	pJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
16:0	9,6	7,8	8,7	8,2	8,7	8,6	8,3	9,7	7,2	8,5	7,5
18:0	2,9	3,9	3,7	3,9	3,6	3,3	3,4	3,6	3,2	3,9	3,0
18:1d11	2,2	1,8	2,0	1,9	2,0	2,3	2,3	2,7	1,9	2,0	1,8
20:0	1,6	2,3	2,0	2,0	2,1	1,6	1,6	1,8	1,6	2,2	1,5
20:1d13	2,2	1,8	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,7	1,5	1,7	1,4
20:1d9/d11	13,0	15,9	16,1	16,1	16,3	15,0	13,9	13,5	18,3	15,9	17,0
22:1d13	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,2
Otros menores	1,9	1,5	1,5	1,4	1,5	1,3	1,6	1,7	1,6	1,4	1,6
18:1d9	10,8	14,0	10,6	10,6	10,1	11,1	10,0	7,7	26,0	8,2	20,9
18:2ω6	28,9	28,3	16,4	16,1	18,2	13,7	13,7	11,4	6,6	16,6	4,3
18:3ω3	16,6	14,9	29,6	29,6	27,5	32,4	30,4	32,8	21,9	27,7	30,1
18:3ω6	0,7	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
20:2ω6	1,6	1,5	1,1	1,2	1,3	1,0	1,0	1,0	0,4	1,4	0,4
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	1,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4
22:5ω6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4ω3	1,0	0,5	1,2	1,1	1,1	1,5	2,7	2,7	1,9	1,8	1,7
20:3ω3	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,7	0,0	0,8	0,6
20:4ω3	0,4	0,6	0,6	0,7	0,5	0,8	0,8	0,4	1,0	0,8	0,8
20:5ω3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,5	0,6	0,4	0,5
22:5ω3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
22:6ω3	3,6	2,4	3,0	3,1	3,3	3,9	5,5	6,2	4,3	4,4	4,8

Tabla 5. Eficacia de conversión de las etapas enzimáticas individuales para la producción de DHA del ácido oleico, observada en el lípido total de la semilla de semillas transgénicas independientes como para la Tabla 4.

	pJP3404_Col_#1	pJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
d12											
des	69,6 %	62,5 %	66,4 %	66,6 %	66,7 %	67,5 %	70,2 %	72,7 %	45,9 %	69,5 %	53,7 %
d15	39,8 %	37,8 %	66,1 %	66,8 %	62,3 %	72,1 %	72,7 %	77,2 %	79,7 %	66,0 %	88,1 %

ES 2 636 487 T3

	- des											
Omega-6	d6- des	4,5 %	2,5 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,9 %	1,3 %	1,0 %	1,6 %	1,1 %	1,1 %
	(d9- elo)	3,1 %	3,1 %	2,2 %	2,3 %	2,4 %	1,8 %	1,8 %	1,7 %	1,2 %	2,7 %	0,9 %
	d6- elo	71,4 %	56,9 %	83,3 %	83,4 %	83,0 %	84,7 %	70,3 %	74,5 %	85,5 %	66,1 %	88,0 %
	d5- des	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	d5- elo	100,0 %	97,8 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	d4- des	6,2 %	13,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Omega-3	d6- des	23,9 %	21,0 %	15,2 %	15,4 %	16,4 %	17,1 %	24,7 %	23,6 %	27,1 %	21,9 %	21,0 %
	(d9- elo)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,8 %	0,0 %	0,0 %	2,0 %	2,2 %	0,0 %	2,6 %	2,1 %
	d6- elo	80,6 %	86,6 %	77,7 %	79,6 %	79,4 %	77,5 %	72,7 %	73,0 %	76,7 %	77,4 %	79,2 %
	d5- des	93,7 %	92,1 %	91,7 %	91,4 %	91,5 %	92,6 %	89,6 %	92,4 %	88,0 %	91,8 %	91,0 %
	d5- elo	93,7 %	92,1 %	91,7 %	91,4 %	91,5 %	92,6 %	89,6 %	92,4 %	88,0 %	91,8 %	91,0 %
	d4- des	100,0 %	90,6 %	94,8 %	94,0 %	95,3 %	94,4 %	95,8 %	96,9 %	93,1 %	92,9 %	94,2 %

Tabla 6. Los datos compilados del total de los perfiles de lípidos de las semillas de semillas transgénicas independientes se muestran en la Tabla 2. Los cálculos no incluyen los "ácidos grasos menores" en la Tabla 4.

Parámetro	PJP3404_Col_#1	PJP3404_FAD2_#31	GA7_Col_#7	GA7_Col_#34	GA7_Col_#2	GA7_Col_#10	GA7_Col_#22	GA7_Col_#14	GA7_FAD2_#25	GA7_FAD2_#21	GA7_FAD2_#18
w3 total (% del total de FA)	21,8	18,8	34,9	35,6	32,9	39,1	40,9	43,5	30,0	36,2	38,8
w6 total (% del total de FA)	32,9	31,0	17,9	17,7	19,9	15,2	15,4	12,9	7,6	18,6	5,2
relación w3 / w6	0,66	0,61	1,95	2,01	1,65	2,57	2,66	3,37	3,95	1,95	7,46
relación w6 / w3	1,51	1,65	0,51	0,50	0,60	0,39	0,38	0,30	0,25	0,51	0,13
w3 nuevo total (% del total de FA)	5,2	3,9	5,3	6,0	5,4	6,7	10,5	10,7	8,1	8,5	8,7
w6 nuevo total (% del total de FA)	4,0	2,7	1,5	1,6	1,7	1,5	1,7	1,5	1,0	2,0	0,9
relación nuevo w3 / w6	1,30	1,44	3,53	3,75	3,18	4,47	6,18	7,13	8,10	4,25	9,67
relación w6 nuevo / w3	0,77	0,69	0,28	0,27	0,31	0,22	0,16	0,14	0,12	0,24	0,10
Eficacia de OA en EPA	4,8 %	3,5 %	4,3 %	4,4 %	4,7 %	5,4 %	7,9 %	8,8 %	6,3 %	6,4 %	6,7 %
Eficacia de OA en DHA	4,5 %	3,0 %	3,7 %	3,8 %	4,1 %	4,8 %	6,8 %	7,9 %	5,2 %	5,5 %	5,8 %
Eficacia de LA en EPA	6,9 %	5,6 %	6,6 %	6,8 %	7,2 %	8,1 %	11,4 %	12,2 %	13,8 %	9,3 %	12,7 %
Eficacia de LA en DHA	6,6 %	4,8 %	5,7 %	5,8 %	6,3 %	7,2 %	9,8 %	11,0 %	11,4 %	8,0 %	10,9 %

Eficacia de ALA en EPA	17,4 %	14,9 %	10,0 %	10,1 %	11,6 %	11,3 %	15,6 %	15,9 %	17,3 %	14,1 %	14,4 %
Eficacia de ALA en DHA	16,5 %	12,8 %	8,6 %	8,7 %	10,0 %	10,0 %	13,4 %	14,3 %	14,3 %	12,2 %	12,4 %
Total de sustratos	14,1	14,0	14,4	14,1	14,4	13,5	13,3	15,1	12,0	14,6	12,0
Total de monoinsaturados	29,3	34,7	31,4	31,2	31,4	31,0	28,7	26,6	48,7	29,1	42,3
Total de poliinsaturados	54,7	49,8	52,8	53,3	52,8	54,3	56,3	56,4	37,6	54,8	44,0
Total de C20	17,4	20	19,7	20,4	20,1	18,7	18,5	17,8	21,8	21	20,7
Total de C22	6,4	4,5	4,6	4,7	5,1	5,5	7,2	7,8	6,1	6,4	6,7
relación C20/C22	2,72	4,44	4,28	4,34	3,94	3,40	2,57	2,28	3,57	3,28	3,09

Tabla 7. La composición del ácido graso del lípido total de la semilla a partir de semillas progenies transgénicas independientes T3 y T4 *Arabidopsis* obtenidas a partir de las estirpes vegetales como en la Tabla 3. El error que se muestra en la generación T4 representa el SD de n=10.

	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2-25.10	GA7_FAD2-21.2	GA7_FAD2-18.14	T4 Col_22.2 (promedio±SD)	T4 Col_22.2 mejor estirpe
16:0	9,8	9,0	9,5	11,2	10,4	8,1	10,7	7,7	10,6±0,9	12,2
18:0	4,0	3,8	4,2	3,4	3,5	3,5	3,8	3,3	3,5±0,4	3,6
18:1n7	2,0	1,9	2,2	2,9	2,5	1,7	2,2	1,6	2,3±0,2	2,6
20:0	2,2	1,9	1,7	1,4	2,3	1,8	2,0	1,9	1,9±0,3	2,0
20:1d13	1,4	1,3	1,2	1,6	2,5	1,2	1,4	1,3	1,6±0,2	1,9
20:1d9/11	13,6	14,7	12,4	9,5	13,0	15,7	12,4	18,4	11,7±1,7	9,5
22:1d13	1,2	1,2	0,8	0,6	1,6	1,0	1,1	1,5	0,9±0,1	0,8
Otros menores	1,8	1,5	1,5	2,1	2,6	1,7	1,9	1,6	1,9±0,1	2,3
18:1d9	5,5	6,7	6,8	4,6	6,9	11,3	4,2	11,5	4,6±1,0	3,3
18:2ω6	7,5	7,9	7,4	5,6	14,8	5,8	8,9	5,6	5,3±0,9	4,3
18:3ω3	33,7	33,7	36,1	31,5	26,1	28,3	28,9	30,8	31,0±1,1	29,5
18:3ω6	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	0,6	0,1	0,4±0,1	0,4
20:2ω6	1,0	1,0	0,7	0,7	1,4	0,6	1,2	0,6	0,9±0,1	0,9
20:3ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
20:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
22:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1±0,0	0,1
22:5ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
18:4ω3	3,1	2,6	3,0	5,3	3,3	3,7	5,2	2,6	4,8±0,9	5,5
20:3ω3	1,4	1,3	1,2	1,3	1,2	1,1	1,3	1,3	1,5±0,2	1,7
20:4ω3	0,7	0,6	0,6	0,9	0,2	1,7	0,9	0,9	0,8±0,2	0,8
20:5ω3	0,9	0,9	0,7	1,9	0,8	1,2	1,0	0,8	1,5±0,3	1,8
22:5ω3	0,7	0,6	0,6	1,0	0,4	0,8	0,6	0,5	1,1±0,2	1,5
22:6ω3	9,5	9,2	9,4	13,9	6,6	10,3	11,5	7,9	13,3±1,6	15,1

Las eficacias de conversión enzimática para cada etapa enzimática en la vía de producción de DHA a partir de ácido oleico se muestra en la Tabla 8 para las semillas T3 con los niveles de DHA más elevados. La eficacia de conversión de la $\Delta 12$ -desaturasa en semillas de la estirpe 22,2 fue del 81,6 % y la eficacia de la $\omega 3$ -desaturasa fue del 89,1 %, ambas son notablemente elevadas e indican que estas enzimas fúngicas (levadura) eran capaces de funcionar bien en las semillas en desarrollo. Las actividades de otras enzimas exógenas en la vía de DHA fueron similarmente altas para los sustratos de $\omega 3$ con la $\Delta 6$ -desaturasa actuando con una eficiencia del 42,2 %, la $\Delta 6$ -elongasa del 76,8 %, la $\Delta 5$ -desaturasa del 95,0 %, la $\Delta 5$ -elongasa del 88,7 % y la $\Delta 4$ -desaturasa con una eficiencia del 93,3 %. La actividad de la $\Delta 6$ -desaturasa en el sustrato de LA $\omega 6$ fue mucho más baja, con la $\Delta 6$ -desaturasa actuando con una eficacia de conversión de solo el 0,7 % en LA. GLA estuvo presente solo a un nivel del 0,4 % y fue el único producto de $\omega 6$ nuevo aparte del 20:2 $\omega 6$ detectado en las semillas T3 con el contenido de DHA más elevado. Los datos recopilados de los perfiles del lípido total de la semilla de la semilla transgénica independiente (Tabla 7) se muestran en la Tabla 9. Estos datos para la estirpe con el mejor nivel de DHA incluía una relación del total de FA $\omega 6$ (que incluía LA) con respecto a un total de FA $\omega 3$ (que incluía ALA) de 0,10. La relación de FA $\omega 6$ nuevos (sin incluir LA) con respecto a FA $\omega 3$ (sin incluir ALA) en el lípido de esta estirpe fue de 0,05. Los niveles totales de ácido graso poliinsaturado fueron más del 50 % en estas estirpes, y mayores que el 60 % en al menos 4 de las estirpes. Se calculó que las eficacias de conversión generales fueron: OA en EPA = 21,8 %, OA en DHA = 18,0 %, LA en EPA = 26,9 %, LA en DHA = 22,2 %, ALA en EPA = 30,1 %, ALA en DHA = 24,9 %.

Tabla 8. Eficacia de conversión de las etapas enzimáticas individuales para la producción de DHA del ácido oleico, observada en el lípido total de la semilla de semillas transgénicas independientes como para la Tabla 7.

		GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2-25.10	GA7_FAD2-21.2	GA7_FAD2-18.14	T4 Col_22.2 (promedio SD)	T4 Col_22.2 mejor estirpe
	d12-des	75,4 %	73,1 %	75,7 %	81,6 %	73,4 %	66,6 %	78,5 %	63,1 %	67,6 %	82,7 %
	d15-des	85,3 %	84,4 %	86,2 %	89,1 %	70,2 %	87,5 %	82,2 %	87,6 %	81,0 %	90,9 %
Omega-6	d6-des	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,7 %	0,3 %	0,6 %	1,0 %	0,2 %	1,3 %	0,7 %
	(d9-elo)	1,7 %	1,7 %	1,2 %	1,2 %	2,6 %	1,1 %	2,0 %	1,3 %	1,6 %	1,5 %
	d6-elo										
	d5-des										
	d5-elo										
	d4-des										
Omega-3	d6-des	30,7 %	29,3 %	28,2 %	42,2 %	30,2 %	38,5 %	40,0 %	29,2 %	41,0 %	45,7 %
	(d9-elo)	2,7 %	2,7 %	2,3 %	2,4 %	3,0 %	2,3 %	2,7 %	2,9 %	2,8 %	3,1 %
	d6-elo	79,0 %	81,1 %	79,0 %	76,8 %	70,9 %	79,2 %	73,2 %	79,1 %	77,5 %	77,7 %
	d5-des	94,0 %	94,6 %	94,5 %	95,0 %	97,9 %	87,8 %	93,3 %	91,1 %	95,0 %	95,8 %
	d5-elo	91,9 %	91,7 %	93,6 %	88,7 %	89,5 %	89,9 %	92,2 %	91,6 %	90,8 %	90,2 %
	d4-des	93,2 %	93,7 %	94,4 %	93,3 %	93,7 %	92,5 %	95,0 %	93,9 %	92,2 %	90,9 %

Tabla 9. Los datos compilados del total de los perfiles de lípidos de las semillas de semillas transgénicas independientes se muestran en la Tabla 2. Los cálculos no incluyen los "ácidos grasos menores" en la Tabla 7.

Parámetro	GA7-Col_7.2	GA7-Col_34.2	GA7-Col_10.13	GA7-Col_22.2	GA7-Col_14.19	GA7-FAD2-25.10	GA7-FAD2-21.2	GA7-FAD2-18.14	T4 Col_22.2 (promedio±SD)	T4 Col_22.2 mejor estirpe
w3 total (% del total de FA)	50,0	48,9	51,6	55,8	38,6	47,1	49,4	44,8	54,0	55,9
w6 total (% del total de FA)	8,7	9,1	8,3	6,7	16,3	6,7	10,7	6,3	6,7	5,7
relación w3 / w6	5,75	5,37	6,22	8,33	2,37	7,03	4,62	7,11	8,06	9,81
relación w6 / w3	0,17	0,19	0,16	0,12	0,42	0,14	0,22	0,14	0,12	0,10
w3 nuevo total (% del total de FA)	16,3	15,2	15,5	24,3	12,5	18,8	20,5	14,0	23,0	26,4
w6 nuevo total (% del total de FA)	1,2	1,2	0,9	1,1	1,5	0,9	1,8	0,7	1,4	1,4
relación nuevo w3 / w6	13,58	12,67	17,22	22,09	8,33	20,89	11,39	20,00	16,43	18,86
relación w6 nuevo / w3	0,07	0,08	0,06	0,05	0,12	0,05	0,09	0,05	0,06	0,05
Eficacia de OA en EPA	14,1 %	13,3 %	13,4 %	21,8 %	10,2 %	15,0 %	16,8 %	11,2 %	20,4 %	24,5 %
Eficacia de OA en DHA	12,0 %	11,4 %	11,8 %	18,0 %	8,6 %	12,6 %	14,8 %	9,6 %	17,1 %	20,1 %
Eficacia de LA en EPA	18,9 %	18,4 %	17,9 %	26,9 %	14,2 %	22,9 %	21,8 %	18,0 %	26,2 %	29,9 %
Eficacia de LA en DHA	16,2 %	15,9 %	15,7 %	22,2 %	12,0 %	19,1 %	19,1 %	15,5 %	21,9 %	24,5 %
Eficacia de ALA en EPA	22,2 %	21,9 %	20,7 %	30,1 %	20,2 %	26,1 %	26,5 %	20,5 %	29,4 %	32,9 %
Eficacia de ALA en DHA	19,0 %	18,8 %	18,2 %	24,9 %	17,1 %	21,9 %	23,3 %	17,6 %	24,6 %	27,0 %
Total de sustratos	16,0	14,7	15,4	16,0	16,2	13,4	16,5	12,9	16,0	17,8
Total de monoinsaturados	23,7	25,8	23,4	19,2	26,5	30,9	21,3	34,3	21,1	18,1
Total de poliinsaturados	58,7	58,0	59,9	62,5	54,9	53,8	60,1	51,1	60,7	61,6
Total de C20	19	19,8	16,8	15,9	19,1	21,5	18,2	23,3	18	16,6
total de C22	11,4	11	10,8	15,5	8,6	12,1	13,2	9,9	15,4	17,5
relación C20/C22	1,67	1,80	1,56	1,03	2,22	1,78	1,38	2,35	1,17	0,95

- 5 Las semillas T3 de la estirpe 22.2 de pJP3416-GA7 en el fondo genético Columbia, que eran progenie de la estirpe 22 T2, se sembraron directamente en el suelo y la composición del ácido graso de la semilla madura de las plantas T3 se analizaron mediante CG. El nivel de DHA promedio de estas semillas fue del 13,3 % ± 1,6 (n=10) como un porcentaje del total de ácidos grasos en el lípido de la semilla. Como se muestra en la Tabla 6 (columna de la derecha), la estirpe con el nivel más elevado de DHA contenía el 15,1 % de DHA en el total de ácidos grasos del lípido de la semilla. Las eficacias de conversión enzimática se muestran en la Tabla 8 para cada etapa de la producción de DHA a partir de ácido oleico.

- 15 La relación total de FA ω6 (que incluye LA) con respecto a FA ω3 (que incluye ALA) en la estirpe con el nivel de DHA más elevado fue de 0,102. La relación total de FA ω6 (sin incluir LA) con respecto a FA ω3 (sin incluir ALA) en la estirpe con el nivel de DHA más elevado fue de 0,053. El nivel del total de ácidos grasos saturados fue de aproximadamente el 17,8 % y el nivel de ácidos grasos monoinsaturados fue de aproximadamente el 18,1 %. El

nivel del total de ácidos grasos $\omega 6$ fue de aproximadamente el 5,7 % y el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ fue de aproximadamente el 55,9 %. Se calculó que las eficacias de conversión generales fueron: OA en EPA = 24,5 %, OA en DHA = 20,1 %, LA en EPA = 29,9 %, LA en DHA = 24,5 %, ALA en EPA = 32,9 %, ALA en DHA = 27,0 %. Se encontró que el total de ácidos grasos omega-3 se acumuló hasta 55,9 % del total de ácidos grasos mientras que los ácidos grasos omega-6 fueron del 5,7 % del perfil total.

Se realizó el análisis de hibridación Southern. Los resultados mostraron que las estirpes de acumulación alta de DHA eran copias simples o dobles del ADN-T de la construcción pJP3416-GA7 con excepción de la estirpe transgénica Columbia n.º 22, que tenía tres inserciones de ADN-T en el genoma de la planta *Arabidopsis*. También se analizó la semilla de la generación T5 y se encontró que tenía hasta el 13,6 % de DHA en el total de lípidos de la semilla. Se encontró que la construcción GA7 era estable a través de múltiples generaciones en términos de la capacidad para producir DHA.

Determinación del contenido de aceite en las estirpes de DHA *A. thaliana* transgénica

El contenido de aceite de las semillas de *A. thaliana* transgénica con los diferentes niveles de DHA se determinó mediante CG tal como se describe en el Ejemplo 1. Los datos se muestran en la Figura 6, que grafica el contenido de aceite (% de aceite en peso de semilla) contra el contenido de DHA (como un porcentaje del total de ácidos grasos). Se observó hasta 26,5 mg de DHA por gramo de semilla (Tabla 10). Se encontró que el contenido de aceite se las semillas transgénicas de *Arabidopsis* estaba correlacionado de forma negativa con el contenido de DHA. La cantidad de DHA en peso de semilla fue mayor en las semillas transformadas con un nivel de DHA de aproximadamente el 9 % en relación con las semillas con aproximadamente el 14 % de DHA. No se determinó si esto es verdadero para otras semillas además de las *Arabidopsis*.

Tabla 10. Proporción y cantidad de DHA en las semillas transformadas de GA7 *Arabidopsis*

	Contenido de DHA (% de TFA)	Contenido de aceite (% de aceite por g de semilla)	Contenido de DHA en peso (mg/g de semilla)
GA7/col 22,2-1	14,2	14,89	20,2
GA7/col 22,2-2	14,3	15,02	20,5
GA7/col 22,2-3	14,0	15,92	21,2
GA7/col 10,15-1	8,7	30,23	25,06
GA7/col 10,15-2	8,6	31,25	25,77
GA7/col 10,15-3	8,8	31,70	26,49

Ejemplo 3. Expresión estable de una vía de DHA transgénico en semillas de *Camelina sativa*

El vector binario pJP3416-GA7 como se ha descrito anteriormente, se introdujo a la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* y las células de un cultivo del *Agrobacterium* transformado se usaron para el tratamiento de las plantas *C. sativa* con flores usando un método de inmersión floral para la transformación (Lu y Kang, 2008). Después de que las plantas crecieron hasta la madurez, las semillas T1 de las plantas tratadas se cosecharon, se sembraron en el suelo y las plantas resultantes se trataron rociándolas con el herbicida BASTA para seleccionar las plantas que eran transgénicas por, y que expresaban, el gen marcador de selección bar presente en el ADN-T de pJP3416-GA7. Las plantas T1 sobrevivientes que eran tolerantes al herbicida se cultivaron hasta la madurez después de permitirles la autofertilización, y la semilla T2 resultante se cosechó. Se obtuvieron cinco plantas transgénicas, de las cuales solo tres contenían el ADN-T completo.

Se extrajo el lípido de un grupo de aproximadamente veinte semillas de cada una de las tres plantas que contenían el ADN-T completo. Dos de las muestras agrupadas contenían niveles de DHA muy bajos, apenas detectables, pero el tercer grupo contenía aproximadamente el 4,7 % de DHA (Tabla 12). Por tanto, se extrajo el lípido de 10 semillas T2 individuales de esta planta y la composición del ácido graso se analizó por CG. Los datos de la composición del ácido graso de las semillas individuales para esta estirpe transformada también se muestran en la Tabla 11. Los datos recopilados de los perfiles del lípido total de la semilla (Tabla 11) se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11. La composición del ácido graso del total de los lípidos de la semilla a partir de las semillas T2 de *Camelina sativa* transgénica transformada con el ADN-T de pJP3416-GA7. La composición del ácido graso se muestra para un lote de semillas agrupadas (FD5.46) y para 10 semillas simples clasificadas (izquierda a derecha) desde el DHA más elevado al más bajo.

Ácido graso.	FD5.46 agrupado	n.º 2	n.º 4	n.º 8	n.º 7	n.º 9	n.º 1	n.º 3	n.º 5	n.º 6	n.º 10
14:0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	11,6	12,1	12,3	12,1	13,2	12,3	12,8	11,9	11,4	11,5	11,7
16:1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2

ES 2 636 487 T3

16:3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,7	3,3	3,2	3,2	3,0	3,1	3,2	3,3	3,1	3,2	3,2
18:1	10,8	8,0	8,0	8,6	8,5	9,4	11,0	10,2	8,3	9,4	8,6
18:1d11	1,7	1,3	1,4	1,4	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
18:2	24,7	18,2	19,5	19,2	18,5	20,1	23,8	32,2	30,3	29,8	31,6
18:3ω3	27,4	26,7	26,6	27,3	28,9	28,2	27,4	28,3	29,2	29,5	28,2
18:3ω6	0,2	1,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,0	0,5	0,4	0,6
20:0	1,6	1,4	1,3	1,4	1,2	1,4	1,4	1,8	2,1	1,9	2,0
18:4ω3	2,2	6,8	6,4	5,7	7,2	5,7	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1d11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5
20:1iso	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
20:2ω6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,7	1,3	1,5	1,4	1,4
20:3ω3	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
22:0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
20:4ω3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	1,1	1,1	1,2	1,1	0,5	0,9	0,8	1,6	2,2	1,9	2,0
20:5ω3	0,7	1,3	1,6	1,5	1,6	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
22:2ω6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2
22:4ω6+22:3ω3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,6	0,5	0,5
24:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4
24:1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,0	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
22:5ω3	0,3	1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6ω3	4,7	9,0	8,5	8,3	8,3	7,1	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 12. Los datos compilados del total de los perfiles de lípidos de las semillas de semillas transgénicas se muestran en la Tabla 11. Los cálculos no incluyen los "ácidos grasos menores" en la Tabla 11.

Parámetro	FD5.46 agrupados	n.º 2	n.º 4	n.º 8	n.º 7	n.º 9	n.º 1	n.º 3	n.º 5	n.º 6	n.º 10
w3 total (% del total de FA)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
w6 total (% del total de FA)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
relación w3 / w6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
relación w6 / w3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
w3 nuevo total (% del total de FA)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1
w6 nuevo total (% del total de FA)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
relación nuevo w3 / w6	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
relación w6 nuevo / w3	0,14	0,12	0,07	0,07	0,05	0,07	0,10				22,00
Eficacia de OA en EPA	8,2 %	15,6 %	15,5 %	15,1 %	15,1 %	12,8 %	10,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %
Eficacia de OA en DHA	6,7 %	12,3 %	11,6 %	11,5 %	11,4 %	10,0 %	7,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Eficacia de LA en EPA	9,2 %	17,2 %	17,1 %	16,7 %	16,2 %	13,9 %	11,4 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,2 %
Eficacia de LA en DHA	7,6 %	13,6 %	12,9 %	12,7 %	12,3 %	10,9 %	7,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Eficacia de ALA en EPA	15,8 %	24,8 %	24,9 %	24,2 %	22,8 %	20,6 %	18,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,3 %
Eficacia de ALA en DHA	13,0 %	19,6 %	18,7 %	18,4 %	17,2 %	16,1 %	12,2 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Total de sustratos	17,6	17,8	17,8	17,6	18	17,8	18,1	18,2	17,7	17,8	18,1
Total de monoinsaturados	19,8	15,5	16	16,6	14,3	16,6	16,8	18,7	19,3	19,6	18,6
Total de poliinsaturados	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
Total de C20	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
total de C22	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	0,9	0,7	0,7
relación C20/C22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	1,49	14,33	12,22	14,71	14,43

El DHA estaba presente en seis de las 10 semillas individuales. Las otras cuatro semillas no tenían DHA y se presumió que eran segregantes nulas que no tenían el ADN-T, basándose en la homocigotidad de la inserción del ADN-T en la planta parenteral. El lípido extraído de la semilla simple con el nivel más elevado de DHA tenía el 9,0 % de DHA mientras que la suma de los porcentajes para EPA, DPA y DHA fue del 11,4 %. La suma de los porcentajes para los ácidos grasos ω 3 nuevos en esta semilla, como resultado de la transformación (SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA, DHA) fue del 19,3 % mientras que la suma correspondiente para los ácidos grasos ω 6 nuevos (GLA, EDA, DGLA, ARA y todos los productos de elongación ω 6) fue del 2,2 % - solamente GLA y EDA se detectaron como ácidos grasos ω 6 nuevos. La relación del total de FA ω 6 (incluido LA) con respecto a FA ω 3 (incluido ALA) fue del 0,44. La relación del total de FA ω 6 (sin incluir LA) con respecto a FA ω 3 (sin incluir ALA) en la semilla con el nivel de DHA más elevado fue de 0,12. El nivel del total de ácidos grasos saturados fue de aproximadamente el 17,8 % y el nivel de ácidos grasos monoinsaturados fue de aproximadamente el 15,5 %. El nivel del total de ácidos grasos ω 6 fue de aproximadamente el 20,4 % y el nivel de ácidos grasos ω 3 fue de aproximadamente el 46 %. Se calculó que las eficacias de conversión generales fueron: OA en EPA = 15,6 %, OA en DHA = 12,3 %, LA en EPA = 17,2 %, LA en DHA = 13,6 %, ALA en EPA = 24,8 %, ALA en DHA = 19,6 %.

La semilla homocigota de esta estirpe se obtuvo en la generación T4. Se produjo hasta un 10,3 % de DHA en el evento FD5-46-18-110 con un promedio de 7,3 % de DHA a través de la generación T4 completa.

La semilla homocigota se plantó en varios invernaderos para generar un total de más de 600 plantas individuales. El aceite se extrae de la semilla usando varios métodos, incluidas las extracciones soxhlet, de acetona y de hexano.

Ya que el número de estirpes de *C. sativa* independientemente transformadas, que se obtuvieron como se ha descrito anteriormente, fue bajo, se realizaron experimentos adicionales para transformar *C. sativa* con pJP3416-GA7. Los inventores prevén que los niveles de DHA mayores al 10 % como un porcentaje del total de ácidos grasos en el aceite de la semilla serán alcanzados en estirpes transformadas adicionales, y plantas que son homocigotas por el ADN-T a un 20 % de DHA. Se generaron veinte eventos de GA7_modH *C. sativa* y la semilla se está analizando para obtener el contenido de DHA. Se generaron tres eventos de GA7_modB y el análisis de la semilla T1 del evento CMD17.1 reveló un contenido de DHA en la semilla agrupada del 9,8 %. Se encontró que el valor de DHA más elevado en la semilla simple fue del 13,5 %.

Ejemplo 4. Expresión estable de una vía de DHA transgénico en semillas de *Brassica napus*

Transformación de *B. napus* y análisis de la composición del ácido graso usando un solo

El vector binario pJP3416-GA7 se usó para generar plantas y semillas de *Brassica napus* transformadas a partir de las plantas. El vector pJP3416-GA7, como se ha descrito anteriormente, se introdujo a la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante procedimientos de electroporación convencionales. Cultivos de las células transgénicas *Agrobacterium* se cultivaron durante la noche a 28 °C en un medio de LB con agitación de 150 rpm. Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, se lavaron con un medio Winans AB (Winans, 1988) y se resuspendieron en 10 ml del medio Winans AB (pH 5,2) y el cultivo continuó durante la noche en presencia de kanamicina (50 mg/l), rifampicina (25 mg/l) y 100 μ M de acetosiringona. Dos horas antes de la infección de las células *Brassica* se añadió supermidina (120 mg/l) y se ajustó la densidad final de la bacteria a un DO de 600 nm de 0,3-0,4 con un medio de AB fresco. Peciolo de cotiledones aislados recientemente de plántulas *Brassica napus* de 8 días se cultivaron en 1/2 MS (Murashige y Skoog, 1962) o segmentos hipocótilos precondicionados por 3-4 días en un medio de EM con 1 mg/l de tidiazurón (TDZ) y 0,1 mg/l de ácido α -naftalenoacético (NAA) se infectaron con cultivos de 10 ml de *Agrobacterium* durante 5 minutos. Después, los explantes infectados con *Agrobacterium* se secaron en papel de filtro estéril para eliminar el exceso de *Agrobacterium* y se transfirieron a un medio de cocultivación (medio de EM con 1 mg/l de TDZ, 0,1 mg/l de NAA y 100 μ M de acetosiringona) complementado con o sin diferentes antioxidantes (50 mg/l de L-cisteína y 15 mg/l de ascórbico). Todas las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en la oscuridad a 23-24 °C durante 48 h.

Después, los explantes tratados se lavaron con agua destilada estéril que contenía 500 mg/l cefotaxima y 50 mg/l timentina durante 10 minutos, se enjuagaron en agua destilada estéril durante 10 minutos, se secaron en papel de filtro estéril, se transfirieron a un medio de preselección (EM que contenía 1 mg/l TDZ, 0,1 mg/l NAA, 20 mg/l sulfato de adenina (ADS), 1,5 mg/l AgNO₃, 250 mg/l cefotaxima y 50 mg/l timentina) y se cultivaron durante cinco días a 24 °C con un fotoperíodo de 16 h/8 h. Después, se transfirieron a un medio de selección (EM que contenía 1 mg/l de TDZ, 0,1 mg/l de NAA, 20 mg/l de ADS, 1,5 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima y 50 mg/l timentina) con 1,5 mg/l amonio de glufosinato como el agente para la selección de las células transformadas, y se cultivaron durante cuatro semanas a 24 °C con un fotoperíodo de 16 h/8 h con un subcultivo bisemanal en el mismo medio. Los explantes con callos verdes se transfirieron a un medio de iniciación de brotes (EM que contenía 1 mg/l de kinetina, 20 mg/l de ADS, 1,5 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de timentina y 1,5 mg/l de amonio de glufosinato) y se cultivaron durante otras 2-3 semanas. Los brotes que emergían de los explantes resistentes se transfirieron a un medio de elongación de brotes (EM que contenía 0,1 mg/l de ácido giberélico, 20 mg/l de ADS, 1,5 mg/l de AgNO₃, 250 mg/l de cefotaxima y 1,5 mg/l de amonio de glufosinato) y se cultivaron durante otras dos semanas. Los brotes saludables de 2-3 cm de largo se seleccionaron y se transfirieron a un medio de enraizamiento (1/2 EM que contenía 1 mg/l de NAA, 20 mg/l de ADS, 1,5 mg/l de AgNO₃ y 250 mg/l de cefotaxima) y se cultivaron

durante 2-3 semanas. Los brotes bien establecidos con raíces se transfirieron a recipientes que contenían una mezcla para la cría de plántulas y se cultivaron en un gabinete de crecimiento durante dos semanas y posteriormente se transfirieron a un invernadero. Se obtuvieron aproximadamente 40 plantas (T0) con la construcción GA7 por este método.

5 Las plantas se cultivaron hasta la madurez luego se permitírseles la autofertilización. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas se analizaron para obtener la composición del ácido graso en su aceite de semilla tal como se describe en el Ejemplo 1. Los datos para una estirpe transformada con el nivel de DHA más elevado se muestran en la Tabla 13. Los niveles de DHA en promedio fueron significativamente menores en el aceite de semilla de las semillas de *B. napus* transformadas con el ADN-T a partir de pJP3416-GA7 que en las semillas de *A. thaliana* (Ejemplo 2) o las semillas de Camelina (Ejemplo 3) transformada con la misma construcción. Se encontró que el nivel más elevado de DHA en aproximadamente 40 estirpes era del 1,52 % con la mayoría de las estirpes transgénicas con DHA detectable. Se notó que había una acumulación sustancial de ALA, aproximadamente el 35 % del total de los ácidos grasos, en estas semillas que no se convertía eficazmente en SDA o los productos que seguían en la vía.

10 Se realizó el análisis del perfil del ácido graso de las semillas de *B. napus* simple a partir de un evento T1, CT125-2, para determinar mejor la cantidad de DHA producido en las semillas transgénicas. Se encontró que las semillas contenían entre el 0 % (semillas nulas) y el 8,5 % de DHA (Tabla 13).

20 Algunas de las semillas de la estirpe vegetal CT116 así como de otras estirpes transgénicas que mostraban producción de DHA se sembraron para producir plantas progenie. Se realizó TI-PCR en el ARN total aislado a partir de embriones en desarrollo de estas plantas para determinar por qué la construcción GA7 tuvo un rendimiento pobre en cuanto a producción de DHA en relación con *A. thaliana* y *C. sativa* transgénicas que tenían la misma construcción, y pobre en relación con la combinación de los genes en pJP3115 y pJP3116 (a continuación). Se realizó TI-PCR en el ARN total usando un kit de TI-PCR de una etapa (Invitrogén) y cebadores específicos de los genes que dirigían cada gen. Esto confirmó que cada uno de los genes en la construcción GA7 se expresaba bien en los transformantes de *B. napus* excepto la $\Delta 6$ -desaturasa que se expresó de manera pobre en la mayoría de las semillas transformadas. Los otros genes de esta construcción funcionaron bien en ambas, las semillas de *B. napus* y *A. thaliana*, por ejemplo las $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas que funcionaron para producir niveles aumentados de LA y ALA en las semillas mientras que los niveles de ácido oleico disminuyeron. Un gel de TI-PCR representativo se muestra en la figura 7, la que muestra claramente la baja expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa en relación con los otros transgenes de pJP3416-GA7.

35 Las plantas y semillas transgénicas que son homocigotas por los transgenes se generan plantando progenies de las estirpes con el DHA más elevado.

Tabla 13. Composición del ácido graso como un porcentaje del total de ácidos grasos en el aceite de semilla de la semilla independiente *Brassica napus* transformada con pJP3416-GA7, las estirpes CT116-11 y CT-125-2 se compararon con el control de tipo silvestre (sin transformar). 22:6 ω 3 es DHA. Se refiere a los datos de las semillas *B. napus* CT125-2 simples mediante "SS".

	Control	CT116-11	CT125-2	CT125-2 n.º 2 SS	CT125-2 n.º 3 SS	CT125-2 n.º 10 SS
14:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
16:0	4,3	7,2	5,2	6,5	4,7	7,7
16:1	0,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,8
16:3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
18:0	2,1	2,2	2,4	2,3	2,3	2,8
18:1d9	59,1	27,0	38,1	34,0	19,3	14,8
18:1d11	3,7	6,6	4,2	4,4	4,3	9,6
18:2	19,7	14,1	16,6	13,9	10,2	10,2
18:3 ω 3	8,3	35,2	27,7	34,1	49,5	37,9
20:0	0,6	0,5	0,6	0,4	0,3	0,7
18:4 ω 3	0,0	0,9	0,3	0,5	0,6	2,6
20:1d11	1,2	1,1	1,0	1,0	0,8	0,6
20:1is0		0,2		0,1		0,2
20:2 ω 6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3 ω 3		1,3	0,7	0,8	1,6	0,9
22:0	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1	0,4
20:4 ω 3		0,1	0,3	0,4	0,6	0,5
22:1						
20:5 ω 3					0,1	0,3
22:3 ω 3					0,1	
24:0	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3
24:1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1

22:5ω3		0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
22:6ω3		1,52	1,2	1,3	2,7	8,5

Transformación de *B. napus* y análisis de la composición del ácido graso usando dos vectores

5 En otro experimento, en *B. napus* y como un formato alternativo para introducir los transgenes, se usaron los vectores binarios pJP3115 y pJP3116 tal como se describe en el documento WO 2010/057246 para generar de manera separada plantas de *B. napus* transformadas y se obtuvieron semillas transformadas a partir de las plantas. El ADN-T en pJP3115 comprendía genes quiméricos que codificaban la *Crepis palestina* Δ12-desaturasa, *Micromonas pusilla* Δ6-desaturasa, *Pyramimonas cordata* Δ6-elongasa y *Pavlova salina* Δ5-desaturasa y el ADN-T en pJP3116 contenía genes quiméricos que codificaban la *Perilla frutescens* Δ15-desaturasa, *Pyramimonas cordata* Δ5-elongasa y *Pavlova salina* Δ4-desaturasa. Los dos ADN-T, cuando se presentaban juntos y se expresaban en semillas en desarrollo, formaban una vía de 7 genes para producir DHA a partir de ácido oleico producido de manera endógena. Los vectores se introdujeron en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante procedimientos de electroporación convencionales y las células transformadas se usaron de manera independiente para transformar *B. napus* usando el método descrito anteriormente para generar plantas de T0 transformadas de manera estable. Se obtuvieron 29 transformantes pJP3115 y 19 pJP3116 y estas plantas se cultivaron hasta la madurez y las semillas obtenidas después de la autofertilización se analizaron para obtener la composición del ácido graso en el aceite de semilla. Se esperaba que la transformación con el ADN-T de pJP3115 resultara en la producción de EPA a partir de ALA producido de manera endógena mientras que se esperaba que la transformación con el ADN-T de pJP3116 resultara en el aumento de la producción de ALA a partir de LA. Se identificaron varias plantas que exhibían este fenotipo. La mayoría de los eventos exhibieron un fenotipo de disminución de OA/aumento de LA debido a la desaturación de 12 con un bajo nivel de producción de EPA. Se observó hasta un 2,6 % de EPA en la semilla transgénica agrupada pJP3115. De manera similar, se encontró que la mayoría de los eventos pJP3116 tenían un fenotipo de ALA elevado debido a la actividad de la 15-desaturasa. Se encontró hasta un 18,5 % de ALA en la semilla transformada agrupada con el ADN-T de pJP3116.

25 Las plantas T1 de las estirpes con los niveles más elevados de EPA y ALA se cruzaron y la semilla progenie (F1) de 24 eventos recuperados se analizaron para obtener el contenido de DHA. Se encontró DHA en 17 de estos eventos con hasta el 1,9 % de DHA encontrado en las semillas agrupadas de estos eventos. Se realizó el análisis de la semilla simple para determinar el intervalo de la producción de DHA - los datos se muestran en la Tabla 14. Se observó un gran intervalo de niveles de DHA en la progenie cruzada, probablemente debido a la naturaleza homocigota de los ADN-T en las plantas parentales, de modo que algunas semillas no recibieron ambos ADN-T. Se observó hasta un 6,7 % de DHA en el total del lípido de la semilla.

35 **Tabla 14.** Composición del ácido graso como un porcentaje del total de ácidos grasos en el aceite de semilla de las semillas simples F1 *B. napus* que se obtuvieron de una cruce de plantas transgénicas por el ADN-T de pJP3115 con plantas transgénicas por el ADN-T de pJP3116. B1, B2 y B4 designan los eventos. 0,0 = no detectable mediante el método CG.

	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1	B3.2
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
16:0	6,6	6,4	4,5	12,3	7,9	5,1	5,0	10,1	8,5	6,8	5,3	7,2
16:1	0,4	0,5	0,2	1,0	0,6	0,4	0,4	0,6	1,1	0,5	0,5	0,6
16:3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
18:0	2,3	2,6	2,2	1,6	2,9	2,9	3,4	2,2	1,8	2,9	3,4	2,4
18:1	34,1	39,3	46,9	14,9	20,7	41,6	46,3	14,4	23,4	38,3	43,6	32,0
18:1d11	4,6	5,8	2,7	6,8	6,2	3,8	4,9	5,9	8,7	4,5	5,5	5,1
18:2	33,6	30,7	30,4	29,2	34,4	31,7	27,7	33,2	23,9	33,3	27,9	33,4
18:3ω6	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,7	0,1	0,2	0,2	0,3
18:3ω3	10,3	7,1	7,7	18,7	14,9	8,2	5,9	14,8	28,1	6,3	7,3	10,0
20:0	0,6	0,7	0,6	0,5	0,7	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	0,9	0,7
18:4ω3	0,2	0,1	0,1	0,8	0,5	0,2	0,2	0,8	0,0	0,2	0,2	0,2
20:1d11	1,0	1,1	1,1	0,7	0,8	1,1	1,1	0,5	0,9	1,1	1,1	0,9
20:1iso	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
20:2ω6	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,5	0,3	0,5
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 636 487 T3

20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3ω3	1,8	1,6	1,1	2,8	2,1	1,1	1,0	2,7	0,7	1,4	0,9	1,6
22:0	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4
20:4ω3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5ω3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2
24:0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
22:5ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
24:1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
22:5ω3	0,7	0,7	0,3	2,1	1,6	0,3	0,4	3,2	0,0	0,5	0,4	1,2
22:6ω3	1,4	1,0	0,5	5,5	3,9	0,8	0,7	6,7	0,0	1,1	0,8	2,0

Tabla 15. Los datos compilados del total de los perfiles de lípidos de las semillas de semillas transgénicas se muestran en la Tabla 14. Los cálculos no incluyen los "ácidos grasos menores" en la Tabla 14.

Parámetro	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1
w3 total (% del total de FA)	4,6	3,9	2,3	12,1	9	2,7	2,6	14,8	0,8	3,6	2,6
w6 total (% del total de FA)	44,5	38,5	38,5	48,8	50,3	40,5	34,1	49,4	52,7	40,5	35,7
relación w3 / w6	0,10	0,10	0,06	0,25	0,18	0,07	0,08	0,30	0,02	0,09	0,07
relación w6 /w3	9,67	9,87	16,74	4,03	5,59	15,00	13,12	3,34	65,88	11,25	13,73
w3 nuevo total (% del total de FA)	2,6	2	1,1	8,9	6,5	1,4	1,4	11,4	0	2	1,5
w6 nuevo total (% del total de FA)	10,5	7,5	7,9	19,1	15,4	8,4	6,1	15,8	28,3	6,7	7,5
relación nuevo w3 / w6	0,25	0,27	0,14	0,47	0,42	0,17	0,23	0,72	0,00	0,30	0,20
relación w6 nuevo / w3	4,04	3,75	7,18	2,15	2,37	6,00	4,36	1,39		3,35	5,00
Eficacia de OA en EPA	2,5 %	2,1 %	0,9 %	10,1 %	6,9 %	1,3 %	1,3 %	12,8 %		1,9 %	1,4 %
Eficacia de OA en DHA	1,7 %	1,2 %	0,6 %	7,2 %	4,8 %	0,9 %	0,8 %	8,5 %		1,3 %	1,0 %
Eficacia de LA en EPA	4,3 %	4,0 %	2,0 %	12,6 %	9,4 %	2,5 %	3,0 %	15,7 %		3,6 %	3,1 %
Eficacia de LA en DHA	2,9 %	2,4 %	1,2 %	9,0 %	6,6 %	1,9 %	1,9 %	10,4 %		2,5 %	2,1 %
Eficacia de ALA en EPA	47,7 %	44,7 %	36,4 %	68,1 %	65,9 %	44,0 %	45,8 %	72,1 %		47,1 %	50,0 %
Eficacia de ALA en DHA	31,8 %	26,3 %	22,7 %	48,7 %	45,9 %	32,0 %	29,2 %	47,9 %		32,4 %	33,3 %
Total de sustratos	10,2	10,6	7,9	15,1	12,4	9,6	10,2	13,7	11,6	11,3	10,6
Total de monoinsaturados	40,4	47	51,1	23,8	28,7	47,2	53	21,8	34,7	44,7	51
Total de poliinsaturados	49,2	42,5	40,9	61	59,4	43,3	36,8	64,3	53,7	44,2	38,4
Total de C20	4,2	4	3,2	5,1	4,7	3,6	3,5	5,1	2,8	4	3,4
total de C22	2,6	2,5	1,3	8,3	6,4	1,7	1,8	11,1	0,5	2,4	1,9

relación C20/C22	1,62	1,60	2,46	0,61	0,73	2,12	1,94	0,46	5,60	1,67	1,79
-------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Los datos recopilados de los perfiles del lípido total (Tabla 14) se muestran en la Tabla 15. De los datos de la Tabla 15, la relación del total de FA $\omega 6$ (que incluye LA) con respecto a FA $\omega 3$ (que incluye ALA) en la semilla con el nivel de DHA más elevado fue de 3,34. La relación de FA $\omega 6$ nuevos (sin incluir LA) con respecto a FA $\omega 3$ (sin incluir ALA) fue de 1,39. El nivel del total de ácidos grasos saturados fue de aproximadamente el 13,7 % y el nivel de ácidos grasos monoinsaturados fue de aproximadamente el 21,8 %. El nivel del total de ácidos grasos $\omega 6$ fue de aproximadamente el 46,4 % y el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ fue de aproximadamente el 14,8 %. Se calculó que las eficacias de conversión generales fueron: OA en EPA = 12,8 %, OA en DHA = 8,5 %, LA en EPA = 15,7 %, LA en DHA = 10,4 %, ALA en EPA = 72,1 %, ALA en DHA = 47,9 %. Se pensó que la eficacia de conversión reducida de los ácidos grasos $\omega 6$ con respecto a la de los ácidos grasos $\omega 3$ observada en este experimento con la combinación del pJP3115 y pJP3116 se debía a una eficacia baja de la $\Delta 15$ -desaturasa vegetal comparada con la $\Delta 15/\omega 3$ desaturasa fúngica (Ejemplos 2 y 3) cuando se combinaba con los genes para la conversión de ALA en DHA.

La progenie de las estirpes que contienen DHA son homocigotas para todos los transgenes introducidos se generan para el análisis.

Ejemplo 5. Modificaciones a los ADN-T que codifican vías de DHA en semillas vegetales

Con el fin de mejorar el nivel de producción de DHA en *B. napus* más allá de los niveles descritos en el Ejemplo 4, los vectores binarios pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE y pJP3416-GA7-modF se construyeron tal como sigue. Los vectores binarios eran variantes de la construcción pJP3416-GA7 descrita en el Ejemplo 2 y se diseñaron para aumentar adicionalmente la síntesis de DHA en las semillas vegetales, particularmente mejorando las funciones de la $\Delta 6$ -desaturasa y $\Delta 6$ -elongasa. Se había observado que se acumulaba SDA en algunas semillas transformadas con la construcción GA7 debido a una eficacia de elongación baja en comparación con la $\Delta 5$ -elongasa, entre otras modificaciones, las dos posiciones génicas de la elongasa se cambiaron en el ADN-T.

Las dos secuencias codificadoras de elongasa en pJP3416-GA7 se cambiaron en sus posiciones en el ADN-T para rendir el pJP3416-GA7-modA clonando primero un casete de $\Delta 6$ -elongasa *P. cordata* entre los sitios *Sbfl* de pJP3416-GA7 para reemplazar el casete de $\Delta 5$ -elongasa de *P. cordata*. Esta construcción se modificó adicionalmente mediante el intercambio del promotor de FP1 que impulsaba la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* con un promotor de *Cnl2* conlininaa (pLuCnl2) para rendir pJP3416-GA7-modB. Esta modificación se realizó en un intento de aumentar la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa y de ese modo la eficacia de la enzima. Se pensó que el promotor de *Cnl2* podía rendir una mayor expresión del transgén en *B. napus* que el promotor de napina truncado. pJP3416-GA7-modC se produjo mediante la adición de un segundo casete de $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* con un uso del codón un poco diferente (SEQ ID NO:15) e impulsado por el promotor de FP1, que fue insertado en el sitio Pmel justo en el borde derecho de pJP3416-GA7-modB. El segundo casete de $\Delta 6$ -desaturasa se añadió a ambos, pJP3416-GA7-modB y pJP3416-GA7-modF para aumentar el nivel de expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa y extender el período de tiempo durante el desarrollo de la semilla para la expresión de la $\Delta 6$ -desaturasa mediante el uso de múltiples promotores. Se utilizaron diferentes usos del codón en las dos secuencias de nucleótidos para resultar en la traducción de la misma secuencia de proteínas sin arriesgar la cosupresión de regiones codificadoras similares dentro del mismo ADN-T. pJP3416-GA7-modD y pJP3416-GA7-modE eran variantes similares en los que una tercera secuencia MAR, correspondiente a los nucleótidos 16649-17816 de SEQ ID NO: 1, se añadió a pJP3416-GA7 y pJP3416-GA7-modB, respectivamente, en el sitio Pmel. pJP3416-GA7-modF se produjo mediante la adición de un segundo casete de $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* que contenía la secuencia de nucleótidos de la $\Delta 6$ -desaturasa nativa y se impulsó por el promotor de FP1 en el sitio Pmel en el borde derecho de pJP3416-GA7-modB. Primero, pJP3416-GA7-modG se hizo reemplazando el casete de la $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* con un casete de *Cnl2*: $\Delta 5$ -elongasa de *P. cordata* mediante clonación de restricción en los sitios *Ascl*-*Pacl*. Después, pJP3416-GA7-modG se hizo reemplazando el casete de *FAE1*: $\Delta 5$ -elongasa de *P. cordata* original con un casete de *FAE1*: $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* mediante clonación de restricción en los sitios *Sbfl*. Las secuencias de nucleótidos de los ADN-T a partir de cada una de estas construcciones genéticas se muestran como: pJP3416-GA7-modB (SEQ ID NO:2), pJP3416-GA7-modC (SEQ ID NO:3), pJP3416-GA7-modD (SEQ ID NO:4), pJP3416-GA7-modE (SEQ ID NO:5), pJP3416-GA7-modF (SEQ ID NO:6) y pJP3416-GA7-modG (SEQ ID NO:7).

Los vectores binarios pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE, pJP3416-GA7-modF y pJP3416-GA7-modG se usan para generar embriones somáticos de *Brassica* transformada y plantas y semillas progenie de *Brassica napus*, *Camelina sativa* y *Arabidopsis thaliana*. Los datos para pJP3416-GA7-modB ase muestran en el próximo ejemplo.

Se generaron ocho eventos transgénicos de pJP3416-GA7-modB *A. thaliana* y 15 eventos transgénicos de pJP3416-GA7-modG *A. thaliana*. Se observó entre el 3,4 % y el 7,2 % de DHA en la semilla agrupada de pJP3416-GA7-modB y se observó entre el 0,6 y el 4,1 % de DHA en la semilla agrupada de T2 pJP3416-GA7-modG. Varios de los eventos de pJP3416-GA7-modB más elevados se sembraron en un medio de selección y las plántulas sobrevivientes se llevaron a la siguiente generación. Las semillas se analizan para obtener su contenido de DHA.

5 Dado que las semillas T1 agrupadas representaban poblaciones que eran segregantes para los transgenes e incluían cualquier segregante nulo, se espera que las semillas homocigotas de las plantas progenie tendrán niveles de DHA aumentados, de hasta un 20 % del total del contenido de ácido graso en el aceite de la semilla. Las otras construcciones modificadas fueron usadas para transformar la *A. thaliana*. Aunque se obtuvo un pequeño número de las estirpes transformadas, ninguna produjo niveles de DHA más elevados que la construcción modB.

10 La construcción pJP3416-GA7-modB también se usó para generar plantas de *B. napus* transformada de la variedad cultivada Oscar y en una estirpe de fitomejoramiento denominada NX005. Se obtuvieron diez plantas transformadas independientes (T0) hasta ahora para la transformación Oscar, y 20 estirpes independientes para NX005. La semilla (la semilla T1) se cosechó de estas estirpes transgénicas. Se realizaron pruebas a grupos de semillas para obtener los niveles de DHA en el aceite de la semilla, y se seleccionaron las dos estirpes que mostraron los niveles más elevados, estas eran estirpes denominadas CT132.5 (en la variedad cultivada Oscar) y CT133.15 (en NX005). Se embebieron veinte semillas de CT132.5 y 11 semillas de CT133.15, después de dos días, se extrajo el aceite de medio cotiledón de cada semilla individual. La otra mitad de los cotiledones con ejes embrionarios se mantuvieron y cultivaron en un medio para mantener las estirpes de progenie específicas. Se determinó la composición de ácido graso en el aceite; los datos se muestran en la Tabla 16 para CT132.5. El nivel de DHA en diez de las 20 semillas analizadas se ubicó en el intervalo de 7-20 % del contenido total de ácido graso que se determinó mediante el análisis CG. Otras semillas tenían menos de un 7 % de DHA y pudo contener una copia parcial (incompleta del ADN-T de pJP3416-GA7-modB. La estirpe transgénica parecía contener múltiples inserciones de transgenes que no estaban unidas genéticamente. Las semillas de la estirpe transgénica CT133.15 exhibieron niveles de DHA en el intervalo del 0-5 %. Era probable que las semillas sin DHA fueran segregantes nulas. Estos datos confirmaron que la construcción modB tuvo un buen desempeño en la producción de DHA en las semillas de colza.

25 Las construcciones pJP3416-GA7-modB y pJP3416-GA7-modF también se usaron para generar plantas de *Camelina sativa*. Se obtuvieron al menos 24 plantas transformadas independientes (T0) y se examinaron más detalladamente mediante el análisis de progenie. La semilla (la semilla T1) se cosechó de estas estirpes transgénicas. Se realizaron pruebas a grupos de semillas para obtener los niveles de DHA en el aceite de la semilla, y se seleccionaron las 6 estirpes que mostraron los niveles más elevados de DHA (entre el 6 % y el 9 %). Los niveles de DHA en 20 semillas T1 de cada estirpe se analizaron - la mayoría de las semillas exhibieron niveles de DHA en del 6-14 % del contenido total de ácido graso que se determinó mediante el análisis CG. Se determinó la composición de ácido graso en el aceite; los datos se muestran en la Tabla 17 para varias semillas transgénicas. Estos datos confirmaron que las construcciones modB y modF tuvieron un buen desempeño en la producción de DHA en las semillas de *Camelina*.

35 **Tabla 16.** Los perfiles de ácido graso de la mitad de los cotiledones de las semillas de *B. napus* transgénica T1 en germinación contenían la construcción modB. Se observó hasta un 18,1 % de DHA con numerosas muestras que contenían más que 10 % de DHA

Semb	140	160	16C07	161	163	180	181	181d1	182	1816	1818	20	1818	C20d1	21d13	C206	C208	C20	2048	2168	2218	C30	C31	2258	C208
1	01	42	01	01	02	18	239	25	99	01	394	05	08	10	00	01	21	03	28	03	01	02	02	05	39
2	01	47	01	01	02	40	230	23	74	03	233	10	43	11	00	01	19	04	69	10	00	03	01	17	95
3	01	37	02	01	02	18	551	19	47	02	152	08	18	14	00	01	03	05	113	00	00	03	02	00	00
4	01	46	02	02	02	29	221	18	66	04	265	10	72	10	00	01	08	05	112	19	00	02	02	17	87
5	01	40	01	01	02	17	274	21	81	03	264	06	28	10	00	01	15	03	75	15	00	01	01	18	122
6	01	35	01	01	02	16	598	20	43	01	185	05	05	13	00	00	07	03	60	00	00	02	01	00	00
7	01	60	03	03	03	17	166	26	239	10	232	06	54	08	00	02	06	04	26	11	00	03	03	17	99
8	01	49	01	01	02	27	129	14	117	03	343	09	50	09	00	02	24	05	41	13	00	02	02	18	138
9	01	39	01	01	01	24	416	17	215	00	234	07	00	12	00	01	22	04	00	00	01	03	02	00	00
10	01	37	02	01	01	21	339	17	192	04	236	07	21	11	00	01	15	04	36	06	00	02	01	07	69
11	01	57	04	03	02	38	412	24	267	21	72	13	03	12	00	02	03	08	48	00	00	06	03	00	00
12	01	46	00	01	02	24	255	17	161	03	289	08	39	11	00	01	19	04	39	06	00	02	00	11	62
13	01	43	01	01	01	42	194	16	92	01	455	10	02	11	00	01	52	04	26	03	02	02	01	04	34
14	01	63	02	02	02	40	105	23	84	03	311	13	39	08	00	01	23	06	46	18	01	03	02	25	181
15	01	51	01	02	02	33	168	24	112	03	268	10	45	09	00	01	21	06	32	15	01	03	01	18	151
16	01	44	01	01	02	40	162	15	116	02	335	09	28	11	00	02	37	04	46	07	01	03	01	13	121
17	02	72	02	02	02	49	150	21	89	03	259	14	51	09	00	00	16	08	49	21	00	06	03	22	150
18	01	40	01	01	02	23	648	12	72	01	125	10	35	15	00	01	00	07	00	00	00	05	02	00	00
19	01	39	01	01	02	46	369	17	71	02	286	12	18	12	00	01	14	05	43	04	00	04	01	08	43
20	01	48	01	01	02	60	185	12	128	02	348	14	24	11	00	01	34	06	32	04	01	03	01	07	76

Tabla 17. Perfiles de ácido graso de semillas de *C. sativa* transgénica T1 que contienen construcciones modB o modF

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	C22:2n6	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3	
123-8	0,1	7,3	0,0	5,5	7,7	1,0	7,7	0,0	29,9	2,2	6,6	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,1	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	13,3
123-12	0,1	8,3	0,0	5,5	7,7	1,0	8,0	0,0	27,2	2,5	5,7	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,1	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	13,3	
5-8	0,1	8,3	0,0	3,5	9,9	1,0	8,1	1,1	29,0	1,3	9,3	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,12	
5-9	0,1	8,0	0,0	3,5	9,9	1,0	8,1	1,1	29,0	1,3	9,3	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,12	
17-10	0,1	8,0	0,0	4,5	8,4	1,0	5,5	1,1	26,1	1,6	11,8	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	13,3	
17-26	0,1	8,0	0,0	5,5	5,5	1,0	7,0	0,0	27,2	2,10	10,1	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	13,3	

5 Los inventores consideraron que, en general, la eficacia de las actividades enzimáticas que limitan la velocidad en la vía de DHA puede ser mejor en los transformantes de ADN-T de copia múltiple en comparación con los transformantes de ADN-T de copia simple, o pueden aumentar mediante la inserción de genes múltiples en el ADN-T que codifiquen la enzima que puede estar limitando en la vía. Se vio evidencia para la posible importancia de los transformantes de copia múltiple en las semillas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción GA7 (Ejemplo 2), donde el evento que produjo más DHA tenía tres ADN-T insertados en el Genoma hospedador. Los genes múltiples pueden ser idénticos, o son preferentemente diferentes variantes que codifican el mismo polipéptido, o están bajo el control de diferentes promotores que tienen patrones de expresión solapados. Por ejemplo, el aumento en la expresión puede conseguirse mediante la expresión de múltiples regiones codificadoras de Δ6-desaturasa, incluso donde se produce la misma proteína. En pJP3416-GA7-modF y pJP3416-GA7-modC, por ejemplo, dos versiones de Δ6-desaturasa de *M. pusilla* estaban presentes y se expresaron mediante diferentes promotores. Las secuencias codificadoras tenían un uso del codón diferente y por lo tanto diferentes secuencias de nucleótidos, para reducir los efectos de silenciamiento o cosupresión potenciales pero resultaron en la producción de la misma proteína.

Ejemplo 6. Actividad de las construcciones específicas de la semilla en embriones somáticos

20 Con el fin de establecer un sistema de evaluación rápido que era predictiva en cuanto a la expresión de construcciones genéticas en la semilla bajo el control de promotores específicos de la semilla, se estableció un sistema de embriones somáticos para *Brassica napus*. Este usó un vector para expresar el factor de transcripción de LEC2 que se involucra en la iniciación de la embriogénesis somática. Como una demostración, los vectores binarios 35S:LEC2 y pJP107 (Petrie et al, 2010a y b) se introdujeron en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* a través de electroporación convencional y los transformantes de *Agrobacterium* se usaron para cotransformar *Brassica napus* mediante cocultivo. La región de ADN-T de pJP107 contenía genes que codificaban la *Isochrysis galbana* Δ9-elongasa, *P. salina* Δ8-desaturasa and *P. salina* Δ5-desaturasa con cada gen expresado mediante un promotor específico de la semilla. Una transformación de control utilizó solo el vector 35S:LEC2. La expresión de 35S:LEC2 dio lugar a la generación de embriones somáticos en cultivo de tejidos directamente a partir de tejido de callo de *B. napus* transformada tal como se describe en el Ejemplo 1.

El análisis de los ácidos grasos demostró que los genes específicos de la semilla en el ADN-T de la construcción pJP107 se expresaron en los embriones somáticos transgénicos en presencia del gen LEC2 co-transformado y funcionaron para producir ARA (20:4^{Δ5,8,11,14}) a partir de LA y EPA (20:5^{Δ5,8,11,14,17}) a partir de ALA. Los datos para tres embriones somáticos co-transformados se muestran en la Tabla 18 y la composición de ácidos grasos de cada uno en comparación con la composición de ácidos grasos del aceite de semilla de la semilla de *Brassica napus* que era transgénica para, y expresando, el ADN-T de pJP107 (Petrie et al., 2010a y b). Se observaron porcentajes totales similares de ARA y los ácidos grasos intermedios EDA (20:2ω6) y DGLA (20:3ω6), así como eficacias de conversión, en el tejido de embriones somáticos cuando se compararon con los perfiles de semillas transformadas de manera estable. Se observaron resultados similares en las composiciones del ácido graso de las semillas transgénicas T2 estables y los embriones somáticos: los ácidos grasos ω6 estaban a un nivel del 26,6 % y el 25,6 % (en promedio), respectivamente, mientras que se encontró que los niveles de ARA eran del 9,7 % y el 10,6 % (en promedio), respectivamente.

45 Cuando se introdujo 35S:LEC2 solo y se analizaron los embriones somáticos en un tiempo de curso, se encontró que el perfil de ácidos grasos cambiaba a un perfil más parecido al del embrión con 18:3^{Δ9,12,15} decreciente y 18:1^{Δ9} creciente de manera inversamente correlacionados (Figura 8). Estos resultados indican que los embriones somáticos fueron pareciendo a semillas en el carácter y los genes en el ADN-T de pJP107 se expresaron. Esto demostró que el sistema de embrión somático permitió una rápida caracterización de las construcciones transgénicas específicas de la semilla en *B. napus* sin requerir el proceso completo de producción de una planta transgénica y, a partir de eso, la semilla madura.

Tabla 18. La composición del ácido graso del lípido obtenido a partir de embriones somáticos de *Brassica napus* generados mediante la cotransformación de pJP107 con 35S:LEC2, en comparación con el control no transformado (WT) y las semillas transformadas T2 con pJP107. Las eficiencias individuales de conversión enzimática se muestran entre paréntesis después de las etapas enzimáticas pertinentes. D9-Elo es $\Delta 9$ -elongasa, D8-Des es $\Delta 8$ -desaturasa y D5-Des es $\Delta 5$ -desaturasa.

	Tipo salvaje	Semilla transgénica pJP107 T2	LEC2:n.º 45	LEC2:n.º 57	LEC2:n.º 58
18:1 ^{Δ9}	57,2	45,7	3,8	2,5	1,9
18:2 ^{Δ9,12}	19,1	8,7	10	10,6	10
18:3 ^{Δ9,12,15}	10,2	4,1	22,5	27,5	24,2
20:2 ^{Δ11,14}		7,1 ± 1,9 (67 % D9-elo)	5,2 (61,8 % D9-elo)	3,7 (56,7 % D9-elo)	4,6 (61,8 % D9-elo)
20:3 ^{Δ8,11,14}		1,1 ± 0,2 (60 % D8-des)	0,4 (67 % D8-des)	0,2 (73 % D8-des)	0,4 (73 % D8-des)
20:4 ^{Δ5,8,11,14}		9,7 ± 0,9 (90 % D5-des)	10,6 (98 % D5-des)	10 (96 % D5-des)	11,2 (97 % D5-des)
20:3 ^{Δ11,14,17}		4,0 ± 0,8	9,9	5,5	7,3
20:4 ^{Δ8,11,14,17}		0,3 ± 0,1	0,4	0,3	0,4
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}		2,4 ± 0,2	7,6	6,4	7,9
Total de nuevos		24,6	34,1	26,1	31,8

Usando el mismo sistema para generar embriones somáticos, se transformaron células de *Brassica napus* de forma separada con pJP3416-GA7-modB y pJP3416-GA7-modD. Se obtuvieron 42 embriones, 18 para modB y 24 para modD. Lípido total fue extraído de los embriones y se analizó para obtener la composición del ácido graso. Lo embriónes contenían entre el 0 % y hasta el 16,9 % de DHA (Tabla 19). Se presume que los resultados con el 0 % de DHA se debieron a la integración de solo un ADNT-T parcial o una inserción en una región transcripcionalmente silenciosa del genoma. Se encontró que la relación del total de FA $\omega 3$ (incluido ALA) con respecto al total de FA $\omega 6$ (incluido LA) era de 2,3 para el embrión n.º 270 y de 11,96 para el embrión n.º 284. La relación del total de FA $\omega 6$ (incluido LA) con respecto a FA $\omega 3$ (incluido ALA) fue de 0,08 para el n.º 284. La relación de FA $\omega 6$ nuevos (sin incluir LA) con respecto a FA $\omega 3$ (sin incluir ALA) fue de 0,03 para el n.º 284. Se calculó que las eficiencias de conversión generales fueron: (para los embriones n.º 270, n.º 284) OA en EPA = 14,0 %, 29,8 %; OA en DHA = 9,7 %, 24,2 %; LA en EPA = 15,4 %, 30,7 %; LA en DHA = 10,7 %, 25,0 %; ALA en EPA = 22,1 %, 33,3 %; ALA en DHA = 15,3 %, 27,0 %. Estas eficiencias eran similares, o mayores que en el caso de n.º 284, con respecto a aquellas observadas para las estirpes de *Arabidopsis* pJP3416-GA7 T3 que indicaron que el vector pJP3416-GA7-modBera capaz de funcionar bien en las células de *B. napus*. El nivel de SDA estuvo por debajo del 3,0 %, indicando que la $\Delta 6$ -elongasa tuvo un mejor desempeño que la construcción GA7. Las eficiencias enzimáticas individuales alcanzadas en n.º 284 fueron: $\Delta 12$ -desaturasa, 97,4 %; $\omega 3$ -desaturasa, 92,3 %; $\Delta 6$ -desaturasa, 38,2 %; $\Delta 6$ -elongasa, 88,2 %; $\Delta 5$ -desaturasa, 98,8 %; $\Delta 5$ -elongasa, 94,1 %; y $\Delta 4$ -desaturasa, 86,3 %. Los saturados totales fueron de 21,2 %, los monoinsaturados totales fueron de 10,2 %, los poliinsaturados totales fueron del 68,6 %.

Los inventores creen que este fue el nivel más elevado de DHA alcanzado en las células de *B. napus* hasta la fecha, a excepción de datos adicionales que se describen a continuación. Esto también demostró que la modificación en pJP3416-GA7-ModB en relación con pJP3416-GA7 fue efectiva para aumentar el nivel de expresión del gen de la $\Delta 6$ -desaturasa. Los vectores binarios pJP3416-GA7, pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE y pJP3416-GA7-modF como se ha descrito anteriormente se co-transformaron con 35S:LEC2 para generar embriones somáticos de *B. napus* transformada. Se observó hasta un 7,0 % de DHA en los embriones de modD, un 9,9 % en los embriones de modE, un 8,3 % en los embriones de modF y un 3,6 % en un número menor de embriones de modG.

Tabla 19. La composición del ácido grasodel aceite de los embriones somáticos de *Brassica napus* n.º 270 y n.º 284 generaron mediante la cotransformación del DHA específico de la semilla de la construcción pJP3416-GA7-modB con 35S:LEC2, y n.º 286 y n.º 289 (pJP3416-GA7-modD).

	n.º 270	n.º 284	n.º 286	n.º 289
14:0	0,3	0,2	0,2	0,2
16:0	14,0	15,7	17,2	16,6
16:1d9	0,7	0,4	0,8	0,8
16:3	0,5	0,6	1,1	1,3
18:0	2,6	2,4	2,5	2,5
18:1d9	6,6	1,8	1,5	1,1
18:1d11	6,3	6,8	6,5	6,7
18:2	18,9	4,5	10,0	9,8
18:3 $\omega 6$	0,7	0,8	0,3	0,3
18:3 $\omega 3$	33,0	37,2	42,0	41,5
20:0	0,9	0,9	0,8	0,8

18:4 ω 3	1,9	2,8	3,6	4,5
20:1d11	0,2	0,1	0,1	0,1
20:2 ω 6	0,1	0,1	0,1	0,2
20:3 ω 3	0,5	0,0	0,5	0,6
22:0	0,8	1,5	0,6	0,7
20:4 ω 3	0,2	0,9	0,7	0,7
20:5 ω 3	0,7	0,2	0,3	0,3
22:2 ω 6	0,0	1,2	0,0	0,0
22:3 ω 3	0,0	0,1	0,0	0,1
24:0	0,8	1,0	1,0	1,0
24:1	0,8	1,0	0,7	0,9
22:5 ω 3	2,4	2,7	3,2	3,0
22:6ω3	7,0	16,9	6,1	6,4

Ejemplo 7. Análisis de TAG de semillas de *A. thaliana* transgénicas que producen DHA

La distribución de la posición de DHA en el TAG de las semillas de *A. thaliana* transformada se determinó por RMN. El lípido total fue extraído de aproximadamente 200 mg de semilla primero mediante trituración bajo hexano antes de transferir la semilla triturada a un tubo de vidrio que contenía 10 ml de hexano. El tubo se calentó a aproximadamente 55 °C en un baño de agua y luego se sometió a agitación con formación de vórtice y se centrifugó. La solución de hexano se retiró y se repitió el procedimiento con otros 4 x 10 ml. Los extractos se combinaron, se concentraron mediante evaporación rotatoria y el TAG en el lípido extraído se purificó lejos de los lípidos polares mediante el paso a través de una columna corta de sílice usando 20 ml de éter dietílico al 7 % en hexano. Las distribuciones de posición del grupo acilo en el TAG purificado se determinaron cuantitativamente tal como se describió previamente (Petrie et al., 2010a y b).

El análisis mostró que la mayoría del DHA en el aceite total de la semilla se ubicó en las posiciones *sn*-1/3 del TAG y se encontró poco en la posición *sn*-2 (Figura 9). Esto fue en contraste al TAG a partir de semillas que producían ARA, lo que demostró que el 50 % del ARA (20:4^{Δ5,8,11,14}) se encontraba en la posición *sn*-2 del aceite de colza transgénico mientras que se esperaba solo el 33 % en una distribución aleatoria (Petrie et al., 2012).

La distribución posicional del DHA en el TAG de las semillas de *B. napus* transformada con pJP3416-GA7 o con la combinación de pJP3115 y pJP3116 se determina esencialmente por el mismo método.

El lípido total de las semillas de *A. thaliana* transgénica también se analizó mediante triple cuadrupolo CL-EM para determinar las principales especies de triacilglicerol (TAG) que contienen DHA (Figura 10). Se encontró que las especies de TAG que contienen DHA más abundante son DHA-18:3-18:3 (TAG 58:12; nomenclatura no descriptiva de distribución de la posición) con el segundo más abundante siendo el DHA-18:3-18:2 (TAG 58:11) Se observó tri-DHA TAG (TAG 66:18) en el aceite de semilla total, aunque a niveles bajos pero detectables. Otras especies principales de TAG que contenían DHA incluían DHA-34:3 (TAG 56:9), DHA-36:3 (TAG 58:9), DHA-36:4 (TAG 58:10), DHA-36:7 (TAG 58:13) y DHA-38:4 (TAG 60:10). Las identidades de las dos especies principales de TAG que contenían DHA se confirmaron mediante Q-TOF MS/MS.

Ejemplo 8. Predicción de la producción de DHA en semillas de *B. napus*

La producción eficaz de DHA en las semillas de *Arabidopsis* a un nivel del 15 % usando la construcción genética GA7 se demostró en el Ejemplo 2. La misma construcción en semillas de *Brassica napus* produjo solo aproximadamente el 1,5 % de DHA en varios (pero no todos) de los transformantes, principalmente debido a la expresión pobre del gen Δ 6-desaturasa de GA7 en estas especies (Ejemplo 4). Basado en la comprensión de que las modificaciones a la construcción GA7 podrían superar el problema de la expresión génica de la Δ 6-desaturasa (véase el Ejemplo 5, como se demuestra en el Ejemplo 6), se realizaron cálculos para determinar el perfil del ácido graso probable de las semillas transgénicas de *B. napus* que expresan los genes a partir de una variante de pJP3416-GA7, donde cada enzima que codifica un transgén tenía un desempeño tan eficaz como se observó en *A. thaliana* con la construcción GA7. Las composiciones del ácido graso previstas para tres cálculos (n.º 1, n.º 2, n.º 3) se muestran en la Tabla 20. Esto se basó en una composición de ácido graso de un tipo silvestre (no transformado) para *B. napus* que incluía 59 % de ácido oleico, 20 % LA y el 8 % ALA. Los tres perfiles de ácidos grasos parciales previstos mostrados en la mitad inferior de la tabla se basaban en la eficacia de conversión para cada etapa enzimática que se muestra en la mitad superior de la tabla. En la predicción n.º 2, una combinación de Δ 12-desaturación a un 75 % de eficacia, Δ 15-desaturación a un 75 %, Δ 6-desaturación a un 35 %, Δ 6-elongación a un 80 %, Δ 5-desaturación a un 90 %, Δ 5-elongación a un 90 % y Δ 4-desaturación a un 90 % podría dar lugar a la producción de aproximadamente el 10 % de DHA en una semilla transgénica de colza típica. Estas eficacias eran todas inferiores o aproximadamente iguales a las eficiencias individuales observadas en *Arabidopsis*, por lo que la predicción n.º 2 representaba una estimación conservadora. Las eficiencias de conversión enumerados en el n.º 3 eran aproximaciones basadas en las conversiones eficaces observadas en *A. thaliana* transformada con pJP3416-GA7. Se predijo que el DHA sería producido en aproximadamente el 15 % del contenido total de ácidos grasos en el

aceite de la semilla producido en las semillas de *B. napus*, un resultado que refleja los niveles de producción más eficaces observados en *A. thaliana*. Se espera que la inserción de múltiples T-ADN en el estado homocigoto para elevar el nivel de DHA al 20 % en *B. napus*.

- 5 **Tabla 20.** Composición de ácidos grasos prevista para los ácidos grasos seleccionados como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos en el aceite de la semilla de *Brassica napus* transformada con una construcción de vía de DHA, basada en las eficiencias enzimáticas observadas en *Arabidopsis* transgénica. Las enzimas se enumeran en orden en la vía para la producción de DHA a partir de ácido oleico. des = desaturasa, elo = elongasa. Las composiciones de ácidos grasos previstos n.º 1, n.º 2 y n.º 3 se basan en las eficacias en la mitad superior de la

10

Tabla.

Enzima		n.º 1	n.º 2	n.º 3
d12-des		70 %	75 %	80 %
d15-des		70 %	75 %	80 %
d6-des (ω 3)		30 %	35 %	40 %
d6-elo		80 %	80 %	90 %
d5-des		80 %	90 %	90 %
d5-elo		80 %	90 %	90 %
d4-des		80 %	90 %	90 %
Ácido graso	Tipo salvaje	n.º 1	n.º 2	n.º 3
18:1d9	59 %	26 %	22 %	18 %
18:2 ω 6	20 %	19 %	17 %	14 %
18:3 ω 6		1 %	2 %	3 %
18:3 ω 3	8 %	30 %	32 %	34 %
18:4 ω 3		3 %	3 %	2 %
20:4 ω 3		2 %	1 %	2 %
20:5 ω 3		2 %	1 %	2 %
22:5 ω 3		1 %	1 %	2 %
22:6 ω 3		5 %	10 %	15 %

Ejemplo 9. Expresión estable de una vía de EPA transgénico en una hoja de la planta

15 Construcción del vector binario

Un vector binario, pORE04+11ABGBEC_caupí_EPA_inserto (SEQ ID NO:8) fue diseñado para la introducción de un ADN-T en las plantas para la síntesis de EPA en los tejidos de la hoja. Contenía genes quiméricos que codificaban las enzimas: Δ 6-desaturasa de *M. pusilla* (SEQ ID NO:16), Δ 6-elongasa de *P. cordata* (SEQ ID NO:25) y Δ 5-desaturasa de *P. salina* (SEQ ID NO:30), cada una bajo el control de CaMV 35S y promotores de la pequeña subunidad de rubisco de *A. thaliana* (SSU) (Figure 9). El vector binario se construyó sintetizando la región 199-10878 de SEQ ID 2 en el vector binario receptor pORE04 (Coutu et al., 1997) en los sitios BsiWI y KasI. Los tres genes de biosíntesis de ácidos grasos codificados para las enzimas requeridas para convertir ALA, 18:3 ^{Δ 9,12,15} en EPA, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}.

25

Expresión transitoria de la construcción EPA en las células de las hojas de *N. benthamiana*

Para probar que la construcción era correcta y expresaría los genes eficazmente en los tejidos de las hojas, el vector quimérico pORE04+11ABGBEC_caupí_EPA_insertado se introdujo en la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. También se introdujo un vector quimérico 35S:p19 a la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* tal como se describe en el Ejemplo 1. Las células de los cultivos de estos infiltrados en los tejidos de las hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* en una habitación de cultivo a 24 °C. Varias comparaciones directas se infiltraron con las muestras que se comparan situadas a ambos lados de la misma hoja. Los experimentos se realizaron por triplicado. Después de la infiltración, las plantas se cultivaron durante otros cinco días antes de que se tomaran discos de hojas para el perfil de ácido graso por análisis de CG como se describe en el Ejemplo 1. El análisis por CG reveló que el vector de EPA estaba funcionando para producir EPA en la hoja de *Nicotiana benthamiana* (Tabla 21) con el mayor nivel de EPA encontrado del 10,7 % de los lípidos totales de las hojas.

35

Transformación estable de *Nicotiana tabacum*

El vector quimérico pORE04+11ABGBEC_caupí_EPA_inserto se usó para transformar de manera estable la *Nicotiana tabacum*. El vector se introdujo a la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de electroporación convencional. Las células transformadas se cultivaron en un medio LB sólido complementado con kanamicina (50 mg/l) y rifampicina (25 mg/l) y se incubaron a 28 °C durante dos días. Una sola colonia se usó para iniciar el cultivo fresco. Después de 48 h de cultivo vigoroso, las células se recogieron por centrifugación a 2,000xg y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en solución fresca que contenía un 50 % de LB y un 50 % de un medio de EM en la densidad de DO600 = 0,5.

Tabla 21. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales de hoja de los eventos de *Nicotiana benthamiana* (transitoria) y *Nicotiana tabacum* (transformante primario estable) transgénicas con los más altos niveles de EPA de cada experimento.

		<i>N. benthamiana</i>	<i>N. tabacum</i>
	14:0	0,1	0,1
	16:0	18,5	17,8
	16:1w13t	2,2	3,8
	16:1d9	0,1	0
	16:3	6,2	5,7
	18:0	3,4	3,2
	18:1d11	0,3	0,3
	20:0	0,5	0,5
	22:0	0,2	0,3
	24:0	0,1	0,4
	18:1	2,9	1,6
	18:2ω6	12,6	14,5
Omega-6	18:3ω6	2,3	2,9
	20:2ω6	0,0	0,0
	20:3ω6	0,1	0,0
	20:4ω6	0,3	0,7
Omega-3	18:3ω3	37,1	32,4
	18:4ω3	1,6	1,9
	20:3ω3	0,1	0,3
	20:4ω3	0,3	1,1
	20:5ω3	10,7	12,1
	22:5ω3	0,3	0,4

- 15 Las muestras de hojas de la variedad *N. tabacum* W38 cultivada in vitro fueron extirpadas y cortadas en secciones cuadradas de aproximadamente el 0,5-1 cm² de tamaño con un bisturí afilado mientras estaban inmersas en la solución de *A. tumefaciens*. Los trozos de hojas de *N. tabacum* heridos sumergidos en *A. tumefaciens* se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de ser secados en un papel de filtro estéril y se transfirieron a placas de EM y sin complemento. Tras un período de cocultivo de dos días a 24 °C, los explantes se lavaron tres veces con un medio estéril, líquido EM, después se secaron con papel de filtro estéril y se colocaron en el agar de selección EM complementado con 1,0 mg/l de bencilaminopurina (BAP), 0,25 mg/l de ácido indolacético (IAA), 50 mg/l de kanamicina y 250 mg/l de cefotaxima. Las placas se incubaron a 24 °C durante dos semanas para permitir el desarrollo de los brotes de los trozos de hojas de *N. tabacum* transformadas.
- 20
- 25 Para establecer plantas transgénicas enraizadas in vitro, brotes verdes saludables se cortaron y se transfirieron a macetas de cultivo de tejidos de 200 ml que contenían un medio agar EM suplementado con 25 g/l de IAA, 50 mg/l de kanamicina y 250 mg/l de cefotaxima. Brotes transgénicos se transfirieron a suelo después de enraizamiento y se cultivaron hasta la madurez en el invernadero. Se tomaron discos de hojas fuicientemente grandes de 21 plantas

transgénicas maduras y se analizaron para obtener el perfil de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 1. Se encontró que todas las muestras transgénicas contenían EPA (Tabla 21) con el mayor nivel de EPA en un transformante primario hemocigotos que se encontró que era del 12,1 % de los lípidos totales de las hojas. Las muestras de hojas también contenían una pequeña cantidad (< 0,5 %) de la DPA en su lípido, que resultó de la elongación de la EPA por un bajo nivel de actividad de $\Delta 5$ -elongación de la $\Delta 6$ elongasa. La relación del total de FA $\omega 3$ (incluido ALA) con respecto a FA $\omega 6$ (incluido LA) fue de 2,7. Se calculó que las eficacias de conversión generales fueron: OA en EPA = 18,4 %, LA en EPA = 18,9 %, ALA en EPA = 25,9 %. La producción del 12 % de EPA es notable especialmente puesto que los eventos eran transformantes primarios hemocigotos. La eficacia de ALA en EPA en particular es parecida a la observada en los transformantes de semillas estables. Vale la pena señalar que la construcción no contenía una 12 o 15 desaturasa para aumentar la conversión de OA y LA en ALA. Se esperaba el aumento de la eficacia con la adición de estas actividades.

Las semillas de transformantes hemocigotos están siendo cosechadas y sembradas para generar plantas homocigotas.

Las semillas en las estirpes superiores de la EPA parecían normales y las semillas de las estirpes n.º 10 y n.º 17 se germinaron para establecer la generación T2. La relación de EPA con respecto a las estirpes nulas (no hay EPA) indicó que el evento n.º 28 era de un solo locus y por lo tanto se estableció también la generación T3 de esta estirpe. El análisis del perfil de ácidos grasos de la población T3 indicó que los transgenes eran homocigotos sin eventos nulos encontrados y una cantidad estable de EPA. Se encontró que la cantidad promedio de EPA en los lípidos totales de la hoja en toda la población T3 era 9,4 % \pm 0,3 (Tabla 22).

Tabla 22. Perfiles representativos del ácido graso del total de lípidos de la hoja a partir del tipo silvestre (WT) y de las estirpes transgénicas independientes o transformadas temporalmente (EPA). Las especies son *Nicotiana benthamiana* (transformación temporal), *N. tabacum* (una población T3 transformada de manera estable), *Vigna unguiculata* (caso T1 transformado de manera estable). Los errores representan la desviación típica de múltiples muestras. Las eficacias de conversión aparentes que se muestran en la parte inferior describen la vía $\omega 3$ y se calculan como el total del producto de FA / total de sustrato + producto de FA.

	<i>N. benthamiana</i>		<i>N. tabacum</i>		<i>V. unguiculata</i>	
	WT	EPA	WT	EPA	WT	EPA
16:0	17,7 \pm 0,1	18,7 \pm 0,2	15,0 \pm 0,6	16,5 \pm 0,5	18,0	18,2 \pm 0,2
16:1 ω 13t	3,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0	3,5 \pm 0,1	3,0 \pm 0,3	3,8	2,0 \pm 0,9
16:3	6,8 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	5,2 \pm 0,5	5,4 \pm 0,3	–	–
18:0	3,1 \pm 0	3,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	1,8	4,5 \pm 0,4
Menor	1,4 \pm 0	1,4 \pm 0,1	3,1 \pm 0,4	2,5 \pm 0,3	2,3	2,5 \pm 0,4
OA	1,7 \pm 0,1	2,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3	2,0	4,3 \pm 1,3
LA	12,5 \pm 0,4	12,7 \pm 0,2	17,0 \pm 1,1	18,0 \pm 0,9	13,4	18,2 \pm 3,0
ALA	53,3 \pm 0,2	37,2 \pm 0,2	52,2 \pm 1,9	34,0 \pm 0,6	58,6	38,2 \pm 0
GLA	–	2,3 \pm 0,1	–	2,3 \pm 0,3	–	0,6 \pm 0,2
20:2 ω 6	0,1 \pm 0	–	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	–	0,1 \pm 0
DGLA	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	–	–	–	–
ARA	–	0,3 \pm 0	–	0,7 \pm 0,1	–	0,2 \pm 0
SDA	–	1,5 \pm 0,1	–	1,6 \pm 0,1	–	1,5 \pm 0
20:3 ω 3	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,3 \pm 0	0,1 \pm 0	1,5 \pm 0,1
ETA	–	0,4 \pm 0	–	1,1 \pm 0,1	–	0,3 \pm 0,2
EPA	–	10,2 \pm 0,5	–	9,4 \pm 0,3	–	7,1 \pm 0,2
DPA	–	0,3 \pm 0,1	–	0,4 \pm 0	–	0,8 \pm 0,1
Conversión de omega-3	$\Delta 6$ -des	25 %		27 %		20 %
	$\Delta 6$ -elo	88 %		87 %		85 %
	$\Delta 5$ -des	97 %		90 %		96 %

Δ5-elo

3 %

4 %

10 %

Las muestras de hojas de plantas *N. tabacum* T3 homocigotas se sometieron a análisis bioquímicos adicionales. Los lípidos totales se extrajeron a partir de material de hojas secadas por congelamiento y se fraccionaron mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se encontró que EPA estaba presente en el *N. tabacum* TAG en más de un 30,1 % así como en los lípidos polares a en un 6,3 % (Tabla 23). Fue interesante destacar que el EPA producido por la vía transgénica estaba presente en todas las fracciones de lípido evaluadas incluidos TAG, MGDG, DGDG, SQDG, PG, PC, PE, PI y PS. Todos los grupos de lípidos contenían bajos niveles de nuevos intermedios o ácidos grasos LC-PUFA ω6 siendo la relación de TAG de los ácidos grasos ω3 nuevos con respecto a los ω6 10:1.

10 Transformación estable de caupí

El vector químérico pORE04+11ABGBEC-caupí-EPA-inserto se transformó en caupí (*Vigna unguiculata*) tal como sigue. Las semillas secas maduras son el material de partida preferido aunque las semillas cosechadas de vainas inmaduras a un peso fresco máximo de las semillas también pueden usarse. Las semillas secas se desgranar a mano para evitar la fractura de la cubierta de las semillas y de esta forma se reduce la contaminación con microorganismos.

Las semillas secas o las vainas inmaduras se sumergen en etanol al 70 % durante 2 min y luego se tratan durante 30 min en lejía comercial al 20 % (8,4 g/l de concentración final de hipoclorito de sodio). Después, estas semillas se lavan varias veces con agua estéril. Las semillas inmaduras se eliminan asépticamente de las vainas mientras que las semillas maduras se embeben durante la noche. Dos explantes diferentes pueden usarse para la producción múltiple de brotes, es decir, el eje embrionario y el cotiledón en sí mismo, preferentemente el cotiledón con el eje embrionario bisecado unido. Las puntas de los brotes y las semillas se eliminan del eje antes de lesionar el nodo de cotiledones, es decir, el punto de unión del eje al cotiledón. A partir de una comparación inicial de 19 cultivos y estirpes, está claro que la mayoría de las estirpes de caupí pueden transformarse, siendo la única salvedad que diferentes condiciones de cultivo de tejido necesitan ser optimizadas para cada estirpe.

Tabla 23. Análisis de fracciones del lípido de hojas jóvenes y maduras (joven | madura) de triacilglicerol (TAG), lípido polar total (PL), monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG), sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) a partir de muestras de hojas de *Nicotiana tabacum*. Los errores representan la desviación típica de múltiples muestras. Se observó hasta un 30 % de EPA en el TAG de la hoja con EPA también distribuido a través de los lípidos polares. Las diferencias entre los perfiles de las hojas jóvenes y maduras también se observaron por varios ácidos grasos.

			Cloroplastídico			Extracloroplastídico					
	TAG	PL	MGDG	DGDG	SQDG	PG	PC	PE	PI	PS	
16:0	9,8 18,3	17,8 23,8	3,1 3,2	18,0 16,8	48,3 50,0	21,0 26,4	22,9 30,0	24,0 30,5	38,7 43,3	31,9 36,2	
16:1ω1 3t	0 0	3,4 3,1	0 0	0 0	0 0	34,0 32,0	0 0	0 0	0 0	1,0 1,4	
16:3	0,2 0,9	5,6 6,4	14,8 19,4	1,2 1,8	0,4 1,2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
18:0	7,3 3,7	2,9 3,9	1,1 1,2	3,5 3,5	5,4 7,1	4,7 6,9	6,6 9,1	11,0 11,4	9,4 9,3	20,2 19,4	
Menor	2,5 2,9	1,4 2,4	1,0 0,4	0,8 1,0	1,9 2,1	1,0 1,5	1,4 1,6	4,9 4,1	6,5 7,7	2,5 3,7	
OA	5,5 0,8	2,8 1,1	0,8 0,3	1,8 1,0	2,7 1,3	5,3 4,9	8,1 2,9	2,5 1,1	2,5 0,8	4,9 2,3	
LA	27,7 13,7	17,3 12,3	8,0 6,8	9,2 10,5	11,7 8,9	17,1 13,2	39,2 25,2	37,9 28,5	22,0 13,4	24,4 17,1	
ALA	9,6 17,2	39,0 34,4	60,3 51,9	61,2 58,6	23,7 21,5	15,7 14,1	7,3 18,2	5,5 10,5	7,6 10,0	4,8 10,5	
Omega-6	GLA	2,5 3,0	1,5 2,1	2,1 3,0	1,1 1,8	1,4 1,9	0,2 0	1,8 2,5	1,7 2,7	0,8 0,9	1,1 1,3
	20:2ω6	0 0	0,1 1,1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0,5 0	0 0	0 0
	DGLA	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
	ARA	0,6 0,9	0,1 0,2	0,2 0,4	0 0	0 0	0 0	0,3 0,3	0,4 0,4	0,4 0,6	0 0,2
Omega-3	SDA	4,0 7,6	1,6 2,0	1,7 2,0	0,6 0,7	1,2 1,2	0 0	2,1 3,6	1,3 2,0	0,8 0,8	0,9 1,6
	20:3ω3	0,2 0,3	0,1 0,2	0 0	0,2 0,3	0 0	0 0,1	0,2 0	0,3 0,4	0 0	0 0
	ETA	0,9 0,2	0,2 0,3	0 0,2	0 0,3	0 0	0 0	0,2 0	0,4 0,2	0,1 0,2	0 0

EPA	28,8 30,1	6,1 6,3	6,9 11,2	2,3 3,6	3,4 4,6	1,0 0,8	9,7 6,4	9,1 7,8	11,2 12,8	8,4 6,2
DPA	0,4 0,5	0 0	0 0,1	0 0	0 0	0 0	0,3 0,4	0,5 0,4	0 0,2	0 0,1

Los genes marcadores de selección, bar o NptII pueden usarse para la transformación. La cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* es la cepa preferida para la transformación de caupí. El *Agrobacterium* que contiene el vector insertado pORE04+11ABGBEC-caupí-EPA se cultiva durante la noche a 28 °C en un agitador a 180 rpm y la suspensión se centrifuga a 8000 g durante 10 min y se resuspende en un medio 1 (medio básico EM diluido uno en diez y que contiene 30 g/l de sacarosa, 20 mM de 2- MES, se ajusta a un pH de 5,6 antes de la autoclave, se complementó con vitaminas de EM esterilizadas filtradas, 100 mg/l de mio-inositol, 1,7 mg/l de BAP, 0,25 mg/l de GA3, 0,2 mM de acetosiringona, 250 mg/l de Na-tiosulfato, 150 mg/l de ditiotreitól y 0,4 g/l de L-cisteína). Los explantes se sumergen sin agitación en la suspensión bacteriana durante una hora seguido de la lesión en las regiones meristemáticas con un bisturí. Los explantes tratados se seca, luego en papel de filtro estéril y se transfieren a un Medio sólido 2 (medio 1 que contiene 0,8 % de agar) superpuesto a papel de filtro. Después de cuatro días de cocultivo, los explantes se transfieren al Medio 3 (medio de EM funcionando plenamente, complementado con 100 mg/l de mio-inositol, 150 mg/l de timentina, 30g/l de sacarosa, 3mM de MES, 1,7 mg/l de BAP, 5 mg/l de PPT o 25-50 mg/l de geneticina o 150 mg/l de kanamicina, 0,8 g/l de agar y se ajusta el pH a 5,6) para la iniciación de los brotes y la selección de los brotes transformados. Después de dos semanas los primeros brotes son visibles. Los cotiledones se eliminan de la región del nodo de cotiledones y los cultivos se transfieren al Medio fresco 3. Los cultivos se transfieren al Medio fresco 3 cada dos semanas seguido de la eliminación del tejido muerto y moribundo. Los primeros cuatro subcultivos están en la selección de kanamicina seguido de la alternación con geneticina y kanamicina. Después de seis subcultivos, los brotes verdes sobrevivientes se transfieren al Medio 4 (Medio 3 sin BAP pero complementado con 0,5 mg/l de GA3, 50 mg/l de asparagina, 0,1 mg/l de ácido 3-indoleacético (IAA), 150 mg/l de timentina, y PPT (10 mg/l), geneticina (50 mg/l) o kanamicina (150 mg/l), para la elongación del brote. Los brotes se subcultivan cada dos semanas hasta que los brotes simples miden más de 1 cm. Estos brotes más largos son transferidos de las placas de Petri a recipientes de cultivo (80 mm de altura) para un crecimiento adicional bajo selección.

La mayoría de los brotes regenerados pueden ser enraizados in vitro, y las plantas enraizadas se transfieren a tierra y se permite que se establezcan en una cámara de gran humedad durante 14-21 días antes de la transferencia a las condiciones ambientales del invernadero.

Para potenciar la transferencia de genes al caupí, los medios de cocultivo se complementan con compuestos de tiol. La adición de L-cisteína, ditiotreitól, y tiosulfato de sodio reduce el oscurecimiento del tejido herido.

Un gran número de explantes de caupí se pueden procesar en un protocolo simplificado. En resumen, el protocolo consta de los siguientes pasos: imbibición de semillas maduras esterilizadas durante la noche en agua, los explantes se derivan de bisecar longitudinalmente la semilla como resultado de lo cual, el eje embrionario split (con los ápices de brotes y raíces eliminados) todavía está unido al cotiledón, la infección con la cepa AGL1 de *Agrobacterium* ayudado por la herida local en las regiones meristemáticas, cocultivo en un medio que contiene compuestos de tiol durante 4 días a 25 °C a la luz, iniciación del brote y elongación en un medio que contiene agentes selectivos, los brotes se enraizan in vitro y se transfieren a condiciones de invernadero para la configuración de la floración y las semillas, análisis de PCR o la enzima de plantas transgénicas putativas, y el análisis de la progenie de la próxima generación mediante PCR o actividad enzimática.

La progenie de las plantas T₀ transgénicas son normales en el fenotipo. Los transgenes se transmiten a la progenie y las plantas T₂ homocigóticas se identifican mediante el análisis de su progenie T₃ para la actividad enzimática o mediante PCR.

Usando este sistema de transformación se producen aproximadamente el 10 plantas transgénicas cada 1000 explantes, que es similar a la frecuencia de transformación para otras legumbres. Dependiendo de la variedad o la estirpe a ser transformada, este protocolo requiere 5-8 meses a partir de la preparación del explante hasta las semillas T₁ cosechadas.

El sistema de transformación se utiliza para introducir el vector binario pORE04+11ABGBEC-caupí-EPA-inserto en plantas de caupí transformadas regeneradas.

Las modificaciones al vector binario pORE04+11ABGBEC-caupí-EPA-inserto se hacen en los genes en los que se codifican una Δ5-elongasa y Δ4-desaturasa, para proporcionar una construcción genética que confiere la capacidad de convertir adicionalmente la EPA producida en DHA. La construcción se transforma en las plantas para la producción de DHA en tejidos vegetativos.

Se encontró EPA presente en el número pequeño de eventos que sobrevivieron a la selección química. La estirpe más elevada contenía el 7,1 %±0,2 de EPA en el total de los lípidos de la hoja. La velocidad de transformación fue más baja que la experimentada por lo general para el caupí con solo seis estirpes transgénicas confirmadas. Es, hasta ahora, desconocida la causa de este efecto aunque es interesante notar que una proporción de eventos

transgénicos más grande que la habitual contenían regiones de ADN-T incompletas. Es posible que el tamaño grande de la construcción contribuyó a la reducción de la eficacia. También se calcularon las eficacias de conversión aparentes de cada una de las tres enzimas transgénicas (Tabla 22). Los resultados fueron ampliamente similares en las tres especies con una buena conversión en EPA después de la $\Delta 6$ -desaturación inicial del ALA nativo. Alguna $\Delta 5$ -elongación de EPA en DPA se notó a pesar de la ausencia de una $\Delta 5$ -elongasa específica. Se ha demostrado previamente que la $\Delta 6$ -elongasa de *P. cordata* tiene un nivel bajo de actividad de $\Delta 9$ -elongasa (es decir, una conversión de 18:3 ^{$\Delta 9,12,15$} en 20:3 ^{$\Delta 11,14,17$}) aunque no se detectó actividad de $\Delta 5$ -elongasa en un ensayo de levadura.

Ejemplo 10. Pruebas de variaciones de genes de $\Delta 12$ -Desaturasa

Construcción del vector binario

En un intento de probar y comparar una serie de genes quiméricos de $\Delta 12$ -desaturasa, se realizaron varios vectores binarios para transformar *A. thaliana* y *B. napus*. Los vectores binarios pJP3365, pJP3366, pJP3367, pJP3368 y pJP3369 cada uno contenían genes que codificaban las enzimas $\omega 3$ -desaturasa de *P. pastoris* (SEQ ID NO:12) y $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* (SEQ ID NO:16), y una de una serie de $\Delta 12$ -desaturassas. Las $\Delta 12$ -desaturassas eran de *Cryptococcus neoformans* (N.º de acceso. XP_570226 en pJP3365), una versión de la $\Delta 12$ -desaturasa de *Cryptococcus neoformans* que contenía una mutación de L151M en un intento de aumentar la actividad génica (en pJP3366), *Lachancea kluyveri* (SEQ ID NO:10 in pJP3367), *Synechocystis* PCC6803 (N.º de acceso BAA18169 en pJP3368) y *Crepis palaestina* (N.º de acceso CAA76157, Lee et al., 1998, en pJP3369). La desaturasa de *Crepis* fue la única desaturasa vegetal en la serie; las otras eran enzimas fúngicas. Los vectores se realizaron mediante la inserción de una región de codificación de proteínas optimizada por un codón vegetal, excepto para la *Crepis* palestina $\Delta 12$ -desaturasa, que era de tipo silvestre, para cada $\Delta 12$ -desaturasa en el sitio *NotI* del vector pJP3364 (véase la Figura 12), en la orientación unida de manera operativa al promotor FP1 para obtener la expresión específica de la semilla de cada desaturasa. El vector de pJP3364 ya contenía los genes quiméricos que codifican la $\omega 3$ -desaturasa de *P. pastoris* y $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla*, cada uno bajo el control de promotores específicos de la semilla (Figura 12). La combinación de las tres enzimas de la biosíntesis del ácido graso, a saber, $\Delta 12$ -desaturasa, $\omega 3$ -desaturasa y $\Delta 6$ -desaturasa, fue diseñada para ensamblar una vía para convertir el ácido oleico (18:1 ^{$\Delta 9$}) en SDA (18:4 ^{$\Delta 6,9,12,15$}). Por tanto, se realizaron para medir el nivel de producción de SDA en semillas transformadas.

Transformación de *A. thaliana* y *B. napus*

Los vectores quiméricos se introdujeron en la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* y en células de cultivos de *Agrobacterium* transformado usado para transformar plantas *A. thaliana* mutantes *fad2* usando el método de inmersión floral para la transformación (Clough y Bent, 1998). Después de la maduración, las semillas T1 de las plantas tratadas se cosecharon y se colocaron en placas de EM que contenían kanamicina para seleccionar las plántulas que tenían el gen marcador de selección *NptII* presente en el ADN-T de cada vector quimérico. Las plántulas sobrevivientes T1 se transfirieron al suelo. Después de permitir que las plantas se autofertilizar y de cultivarlas hasta la madurez, las semillas T2 a partir de estas plantas fueron cosechadas y la composición del ácido graso de los lípidos de la semilla se analizó mediante CG.

El vector quimérico pJP3367 también se utilizó para transformar *B. napus* por el método descrito en el Ejemplo 4 para generar 12 eventos transgénicos. Se encontró que el SDA variaba entre el 0,6 % y el 2,2 % en las semillas agrupadas de las plantas, y nueve semillas individuales de la planta transgénica con el nivel de SDA más elevado se analizaron para obtener la composición del ácido graso. Los datos de la composición del ácido graso de dicho análisis se muestran en la Tabla 24.

Los datos de la actividad de la $\Delta 12$ -desaturasa expresada a partir de cada uno de los ADN-T tanto en *A. thaliana* como en *B. napus* fueron inesperadamente bajos, proporcionando una eficiencia de conversión enzimática de aproximadamente el 20 % más que el 70-80 % visto con el mismo casete de expresión en la construcción GA7 (Ejemplos 2 y 3). La razón de esta relativamente pobre expresión de los genes de la $\Delta 12$ -desaturasa de estos vectores no es clara, pero puede estar relacionada con la posición de los genes en la construcción como un todo.

En contraste, el análisis de expresión TI-PCR demostró que los genes de $\omega 3$ -desaturasa de *P. pastoris* y $\Delta 6$ -desaturasa de *M. pusilla* en el ADN-T se expresaron relativamente bien en la semilla transformada. La Tabla 24 incluye las eficiencias de conversión de la $\Delta 6$ -desaturasa en las semillas transformadas, que variaban entre aproximadamente el 11 % y aproximadamente el 25 % en la estirpe de *B. napus* transformada. Esta era considerablemente más elevada que la eficiencia de conversión de la $\Delta 6$ -desaturasa de aproximadamente el 7 % observada en las semillas de *B. napus* transformadas con la construcción GA7 (Ejemplo 4).

Tabla 24. Composición del ácido graso como un porcentaje del total de ácidos grasos en el aceite de la semilla a partir de semillas simples de una planta de *Brassica napus* T1 transformada con el ADN-T de pJP3367. SDA (18:4 $\omega 3$) se muestra en negrita.

Muestra	CT110-3n.º 1	CT110-3n.º 2	CT110-3n.º 3	CT110-3n.º 4	CT110-3n.º 5	CT110-3n.º 6	CT110-3n.º 7	CT110-3n.º 8	CT110-3n.º 9
C14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:0	4,3	4,2	4,1	4,5	3,8	4,3	4,0	5,0	4,7
16:1d7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:1d9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
16:3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C18:0	1,9	1,9	1,3	1,8	2,1	1,8	2,4	3,1	2,2
C18:1	58,1	59,4	55,5	59,1	62,1	56,0	57,2	52,0	53,2
C18:1d11	3,5	3,6	3,0	3,2	2,9	3,6	3,2	4,4	3,5
C18:2	18,4	17,1	19,2	17,3	17,4	18,7	19,0	20,3	20,2
C18:3 ω 6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C18:3 ω 3	8,2	9,0	11,1	8,6	7,5	10,2	9,8	9,3	9,8
C20:0	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6
18:4ω3	2,4	2,0	2,8	2,5	1,4	2,6	1,3	2,4	3,2
C20:1d11	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1
20:1iso	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02
C20:2 ω 6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
C24:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
C24:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
% de Δ 6-des	22,9	17,9	20,3	22,8	15,8	20,2	11,7	20,9	24,9

Por tanto, para beneficiarse de la ventaja de las eficacias de conversión más elevadas de la Δ 6-desaturasa conferidas por el ADN-T a partir de pJP3367, se cruzaron plantas de *B. napus* transformadas con este ADN-T con plantas transformadas con el ADN-T a partir de pJP3416-GA7 (Ejemplo 4) para producir plantas y semillas progenie que contengan los dos ADN-T. La composición de ácido graso del aceite extraído de las semillas F1 se analiza mediante CG para obtener el contenido de DHA y los contenidos de otros ácidos grasos. Se observa un aumento del nivel de DHA como consecuencia del aumento en la expresión de la Δ 6-desaturasa. Se producen plantas que son homocigotas para ambos ADN-T y deberían producir niveles de DHA más elevados.

10 **Ejemplo 11 Aumento de la acumulación de ácidos grasos mediante el uso de proteínas supresoras del silenciamiento**

Construcción del vector binario:

15 El documento WO 2010/057246 describe el uso de proteínas supresoras del silenciamiento (SSP) para aumentar la expresión del transgén en las semillas de las plantas. Para demostrar que el uso de dichas proteínas puede potenciar y estabilizar la producción de LC-PUFA en las oleaginosas en varias generaciones, se seleccionaron varias SSP para someterlas a prueba, a saber, V2 (N.º de acceso GU178820.1), p19 (N.º de acceso AJ288943.1), p38 (N.º de acceso DQ286869.1) y POPE (N.º de acceso L04573.1). p19 es una proteína supresora del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) que se une a ARNip con una longitud de 21 nucleótidos antes de que guíen la escisión guiada por argonauta de ARN (Voynet et al., 2003) homólogo. V2, una proteína supresora del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), se une a la proteína vegetal SGS3 (Glick et al., 2008), una proteína que se creía necesaria para la producción de intermedios del ARN de cadena doble a partir de sustratos de ARN monocatenario negativo (Beclin et al., 2002), o se une a estructuras de ARN bicatenario que tienen un excedente en el extremo 5' (Fukunaga et al., 2009). p38 es una proteína supresora del virus del arrugado del nabo (TCV) que interfiere con los mecanismos de silenciamiento vegetal uniéndose a las proteínas Dicer and Argonauta (Azevedo et al., 2010). Las proteínas P0 tales como POPE y RPV-P0, a partir poliovirus, proteínas Argonauta objetivo para la degradación potenciada (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007; Fusaro et al., 2012). Por tanto, las construcciones genéticas se prepararon para la expresión de estas SSP en las semillas vegetales en combinación con un conjunto de genes de la biosíntesis de ácidos grasos para la producción de ARA (20:4 ^{Δ 5,8,11,14}) a partir de LA (18:1 ^{Δ 9,12}), como sigue.

Los genes de la biosíntesis de ácidos grasos que codifican la $\Delta 9$ -elongasa de *Isochrysis galbana* y la $\Delta 8$ - y $\Delta 5$ -desaturasas de *Pavlova salina* y el marcador de selección bacteriana se obtuvieron en un solo fragmento de ADN de pJP3010 por digestión con PmeI y AvrII dando lugar a un fragmento de 9560 pb. La región de codificación $\Delta 9$ -elongasa en este fragmento se unió a un promotor FAE1 de *A. thaliana* (pAtFAE1) y una región de terminación de transcripción conlinina/poliadenilación (LuCnl2-3'). Cada una de las regiones codificadoras de desaturasa estaban unidas a un promotor FP1 de napina truncado (pBnFP1) y una región de terminación de transcripción/poliadenilación nos3'. Los tres genes de la biosíntesis de ácidos grasos en este fragmento se orientaron y se espaciaron de la misma manera que en el pJP107 (Petrie et al., 2012) y codificaban las mismas proteínas que pJP107. El fragmento de ADN también comprendía un gen pFP1:GFIP:nos3' a partir de pCW141 (véase el documento WO2010/057246) que codificaba una proteína verde fluorescente (GFP). Este gen marcador detectable se utilizó como un marcador visual específico de la semilla, permitiendo la identificación simple y no destructiva y por lo tanto la selección de semilla transgénica que comprende y que expresa el gen.

El fragmento PmeI-AvrII se insertó en el sitio PmeI-AvrII de cada una de las series de cinco vectores, conteniendo cada uno un gen de SSP diferente (documento WO2010/057246), lo que resulta en las construcciones genéticas denominadas pFN045, pFN046, pFN047, pFN048 y pFN049. Estas comprenden genes que codifican las SSP P0PE, p38, p19, 35S:V2 y V2, respectivamente. Cada uno de los genes de SSP estaba bajo el control del promotor FP1 y región de terminación de la transcripción/poliadenilación ocs3' excepto en la construcción pFN048 en la que la región de codificación V2 estaba bajo el control del promotor constitutivo de CaMV 35S. El gen de SSP en cada caso era dentro de la región de ADN-T de las construcciones, adyacentes al borde derecho (RB) del ADN-T. Una sexta construcción, pFN050 que carecía de cualquier secuencia de codificación SSP, se realizó digiriendo pFN045 con AhdI y NheI seguido de recircularización con ADN ligasa para eliminar el gen FP1:P0PE. Cada una de las seis construcciones comprendía un gen marcador de selección NptII en el ADN-T y adyacente al borde izquierdo del ADN-T. Todas las construcciones tenían un origen en RK2 de replicación para el mantenimiento de los plásmidos en *Agrobacterium*.

Transformación de *A. thaliana* con vectores de expresión ARA en combinación con SSP

Para transformar el genotipo MC49 de *Arabidopsis*, que es un doble mutante fad2/fae1 con niveles elevados de ácido linoleico en el lípido de sus semillas, las plantas se trataron por el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998) con la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* transformada con separado cada una de las seis construcciones pFN045-pFN050. Las plantas tratadas fueron cultivadas hasta la madurez y semillas T1 cosechadas de ellas se colocaron en un medio de EM que contenía kanamicina para seleccionar las plantas T1 transformadas. La detección de la expresión de GFP en la semilla también fue utilizada como un marcador visual para semillas T1 transformadas. Las plántulas que sobrevivieron en placas de EM/Kan o que se obtuvieron a partir de semillas positivas para GFP fueron trasladadas a tierra y se cultivaron hasta la madurez de las semillas T2. El número de plantas transformadas obtenidas fueron 5, 14, 32, 8, 23 y 24 para las transformaciones con pFN045, pFN046, pFN047, pFN048, pFN049 y pFN050, respectivamente. Se descubrió en esta etapa que el gen que codifica p38 en pFN046 no era funcional y por lo tanto las plantas transformadas con el vector pFN046 se consideraron como controles adicionales, es decir, esencialmente lo mismo que para pFN050.

Aproximadamente 100 semillas T2 agrupadas fueron tomadas de cada planta transformada para la determinación de la composición de ácidos grasos de los lípidos de las semillas mediante preparación FAME y análisis CG. También se cultivaron seis plántulas T2 de cada estirpe transgénica para producir semillas T3.

La composición de ácidos grasos en el lípido total extraído de las semillas T2 se determinó mediante CG. El análisis mostró diversos niveles de ARA y los intermedios de EDA (20:2w6) y DGLA (20:2w6) en las poblaciones T2. Los datos para ARA se muestran en las Figuras 13 y 14.

La Figura 13 muestra un análisis de diagrama de caja del nivel ARA en el lípido de las poblaciones de las semillas T2. Era evidente que el nivel medio (percentil 50) de ARA en las poblaciones de semillas que contenían los genes FP1:p19 y 35S:V2, además de los genes de la biosíntesis de ARA fue significativamente mayor que en las semillas que contenían el gen defectuoso FP1:p38 o el ADN-T de control de pFP050 que no contenía un gen de SSP. Los niveles promedio de ARA para las semillas transformadas con genes que codifican p19 y V2 fueron mayores que para las semillas transformadas con el gen p38 o aquellas sin una SSP (Figura 14). Una estirpe FP1:p19 y dos FP1:V2 presentaron aproximadamente el 19 %, el 20 % y el 23 % de ARA, respectivamente. Estos fueron los valores extremos y por lo tanto no se incluyen en los cálculos para el análisis de diagrama de caja. Sobrevivieron menos plantas transformadas con el ADN-T que comprendía los genes FP1:P0PE y 35S:V2 en comparación con las otras construcciones; se cree que estos genes podrían ser perjudiciales para salud de las plantas en el fondo MC49.

No solo los niveles de ARA eran significativamente diferentes entre las construcciones, se observó que los niveles de lípidos en la semilla del primer intermedio de la vía de LA en ARA, a saber EDA (20:2w6), eran menores en las estirpes que expresaban V2 o p19 que en semillas que carecían de una SSP o que contenían la construcción p38 (Figura 15). En las semillas T3, una población que contenía la construcción que expresaba p19 exhibió el 38 % de ARA como un porcentaje del total de ácidos grasos en el lípido de la semilla.

Diversas estirpes T3 transgénicas se avanzó a la generación T4. Los niveles de ARA en las semillas T4 que expresaban V2 fueron o bien los mismos en comparación con la generación anterior, o de hecho exhibieron un aumento de los niveles en comparación con sus parentales T3 (Figura 16). Las estirpes que expresaban p19 mostraron niveles más variados de ARA. El nivel de ARA disminuyó en algunas estirpes, mientras que en otras era igual o aumentó en comparación con las parentales de T3. En contraste, las estirpes que contenían el gen p38 defectuoso o que carecían de una SSP generalmente mostraron una disminución en el nivel de ARA y un aumento en los niveles de los intermedios (Figura 18). En algunas de estas estirpes, ARA disminuyó a aproximadamente el 1 % y los niveles de EDA habían aumentado a aproximadamente el 20 %. Los niveles promedio de ARA en las semillas T4 fueron mayores para las estirpes que expresaban p19 y V2 en comparación con las estirpes que expresaban p38 o que carecían de una SSP (Figura 17).

Este experimento demostró que la expresión de una SSP en las semillas de una planta transgénica junto con genes adicionales para una vía biosintética LC-PUFA no solo aumentó el nivel de producción del ácido graso deseado en la primera generación de progenie, sino que también estabilizó el nivel de la producción de ácidos grasos en las generaciones posteriores como la tercera o cuarta generación de progenie. El aumento de la producción de ácidos grasos fue acompañada por la disminución en los niveles de ácidos grasos intermedios en la vía biosintética. Se prefirieron los P19 y V2 de SSP expresados a partir de los promotores específicos de la semilla. La construcción diseñada para expresar la SSP p38 era defectuosa y no se obtuvieron datos útiles con esta construcción. Se cree que la SSP V2 y sus homólogos de otros virus son particularmente preferidos porque permiten la máxima expresión de los genes de la vía de biosíntesis y el silenciamiento simultáneo de otros genes en las mismas células en la semilla en desarrollo.

Ejemplo 12. Ensayo de contenido de esteroides y composición en aceites

Los fitosteroles a partir de 12 muestras de aceite vegetal adquiridas de fuentes comerciales en Australia se caracterizaron mediante CG y el análisis CG-EM como derivados de éter de O-trimetilsililo (OTMSi-éter) tal como se describe en el Ejemplo 1. Los esteroides se identificaron mediante los datos de retención, la interpretación de los espectros de masas y la comparación con la bibliografía y los datos espectrales de masas convencionales de laboratorio. Los esteroides se cuantificaron mediante el uso de un patrón interno 5(H)-Colan-24-ol. La estructura de fitosterol básica y las estructuras químicas de algunos de los esteroides identificados se muestran en la Figura 19 y la Tabla 25.

Los aceites vegetales analizados eran de: sésamo (*Sesamum indicum*), oliva (*Olea europaea*), girasol (*Helianthus annuus*), ricino (*Ricinus communis*), colza (*Brassica napus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), lino (*Linum usitatissimum*) y soja (*Glycine max*). En abundancia relativa decreciente, a través de todas las muestras de aceite, los fitosteroides principales fueron: -sitosterol (intervalo del 28-55 % del contenido total de esteroides), 5-avenasterol (isofucosterol) (3-24 %), campesterol (2-33 %), 5-stigmasterol (0,7-18 %), 7-stigmasterol (1-18 %) y 7-avenasterol (0,1-5 %). Se encontraron varios otros esteroides menores, estos fueron: colesterol, brasicasterol, calinasterol, campestanol y eburicol. También se detectaron cuatro esteroides C29:2 y dos C30:2, pero se requiere más investigación para completar la identificación de estos componentes menores. Además, varios otros esteroides no identificados estaban presentes en algunos de los aceites, pero debido a su muy baja abundancia, los espectros de masa no fueron lo suficientemente intensos como para permitir la identificación de sus estructuras.

Los contenidos de esteroides expresados como mg/g del aceite en cantidad decreciente fueron: aceite de colza (6,8 mg/g), aceite de sésamo (5,8 mg/g), aceite de lino (4,8-5,2 mg/g), aceite de girasol (3,7-4,1 mg/g), aceite de cacahuete (3,2 mg/g), aceite de cártamo (3,0 mg/g), aceite de soja (3,0 mg/g), aceite de oliva (2,4 mg/g), aceite de ricino (1,9 mg/g). El % de las composiciones de esteroles y el contenido total de esteroles se presentan en la Tabla 26.

Tabla 25. Nombres sistemáticos/IUPAC de esteroides identificados.

Esterol N.º	Nombre o nombres comunes	Nombre sistemático / IUPAC
1	colesterol	colest-5-en-3 β -ol
2	brasicasterol	24-metilcolesta-5,22E-dien-3 β -ol
3	calinasterol / 24-metileno colesterol	24-metilcolesta-5,24(28)E-dien-3 β -ol
4	campesterol / 24-metilcolesterol	24-metilcolest-5-en-3 β -ol
5	campestanol / 24-metilcolestanol	24-metilcolestan-3 β -ol
7	Δ 5-estigmasterol	24-etilcolesta-5,22E-dien-3 β -ol
9	ergost-7-en-3 β -ol	24-metilcolest-7-en-3 β -ol
11	eburicol	4,4,14-trimtilergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol
12	β -sitosterol / 24-etilcolesterol	24-etilcolest-5-en-3 β -ol
13	D5-avenasterol / isofucosterol	24-etilcolesta-5,24(28)Z-dien-3 β -ol
19	D7-stigmasterol / stigmast-7-en-3 β -ol	24-etilcolest-7-en-3 β -ol
20	D7-avenasterol	24-etilcolesta 7,24(28)-dien-3 β -ol

Entre todas las muestras de semillas, el principal fitosterol fue en general -sitosterol (intervalo del 30-57 % del contenido total de esteroles). Había una gran variedad entre los aceites en las proporciones de los otros esteroides

principales: campesterol (2-17 %), 5-estigmasterol (0,7-18 %), 5-avenasterol (4-23 %), 7-estigmasterol (1-18 %). Los aceites de distintas especies tenían un perfil de esteroles diferentes y algunos tenían perfiles muy distintos. En el caso del aceite de colza, que tenía la mayor proporción de campesterol (33,6 %), mientras que las otras muestras de especies generalmente tenían niveles más bajos, por ejemplo, hasta 17 % en el aceite de cacahuete. El aceite de cártamo tenía una proporción relativamente alta de 7-estigmasterol (18 %), mientras que este esteroles fue generalmente bajo en los aceites de otras especies, hasta 9 % en el aceite de girasol. Como fueron distintos para cada especie, los perfiles de esteroles, pueden ser utilizados, por lo tanto, para ayudar en la identificación de los aceites vegetales o de plantas específicas y para verificar su autenticidad o la adulteración con otros aceites.

Tabla 26. Contenido de esteroles y composición de aceites vegetales ensayados.

Número de esteroles*	Nombre común del esteroles	Sésamo	Oliva	Girasol	Girasol prensado en frío	Ricino	Colza	Cártamo	Cártamo prensado en frío	Cacahuete	Lino (linaza)	Lino (linaza)	Soja
1	colecsterol	0,2	0,8	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2
2	brassicasterol	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
3	calinasterol /24-metileno colecsterol	1,5	0,1	0,3	0,1	1,1	2,4	0,2	0,1	0,9	1,5	1,4	0,8
4	campesterol /24-metilcolecsterol	16,2	2,4	7,4	7,9	8,4	33,6	12,1	8,5	17,4	15,7	14,4	16,9
5	campestanol /24-metilcolecstanol	0,7	0,3	0,3	0,1	0,9	0,2	0,8	0,8	0,3	0,2	0,2	0,7
6	C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0	1,2	1,3	0,1
7	Δ^5 -estigmasterol	6,4	1,2	7,4	7,2	18,6	0,7	7,0	4,6	6,9	5,1	5,8	17,6
8	desconocido	0,5	1,3	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	1,3	0,4	0,7	0,6	1,3
9	ergost-7-en-3 β -ol	0,1	0,1	1,9	1,8	0,2	0,4	2,7	4,0	1,4	1,4	1,4	1,0
10	desconocido	0,0	1,3	0,9	0,8	1,2	0,9	1,8	0,7	1,2	0,7	0,5	0,7
11	eburicol	1,6	1,8	4,1	4,4	1,5	1,0	1,9	2,9	1,2	3,5	3,3	0,9
12	β -sitosterol /24-etilcolecsterol	55,3	45,6	43,9	43,6	37,7	50,8	40,2	35,1	57,2	29,9	28,4	40,2
13	avenasterol /isofucosterol	8,6	16,9	7,2	4,1	19,3	4,4	7,3	6,3	5,3	23,0	24,2	3,3
14	alcohol triterpénico	0,0	2,4	0,9	1,1	0,0	0,0	1,6	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9
15	alcohol triterpénico	0,0	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	2,8	1,8	0,0	0,0	0,3	0,0
16	C29:2*	0,0	0,5	0,7	0,7	1,5	1,2	2,8	1,9	2,0	1,0	0,7	0,5
17	C29:2*	1,0	0,9	2,3	2,4	0,6	0,4	1,3	1,9	0,9	1,0	1,0	1,0
18	C30:2*	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	Δ^7 -	2,2	7,1	9,3	10,9	2,3	0,9	10,5	18,3	1,1	7,9	8,7	5,6

Dos muestras de cada una de girasol y cártamo se compararon, en cada caso uno fue producido por presión en frío de las semillas y sin refinar, mientras que el otro no fue prensado en frío y refinado. Aunque se observaron algunas diferencias, las dos fuentes de aceites tuvieron composiciones de esteroles y contenido total de esteroles similares, lo que sugiere que el procesamiento y la refinación tuvieron poco efecto en estos dos parámetros. El contenido de esteroides entre las muestras varió tres veces con un intervalo de 1,9 mg/g a 6,8 mg/g. El aceite de colza tiene el mayor contenido de esteroles y del aceite de ricino el más bajo.

Ejemplo 13. Aumento de la acumulación de DHA en la posición de TAG sn-2

Los presentes inventores consideraron que la acumulación de DHA en la posición sn-2 en el TAG podría aumentarse mediante la coexpresión de una 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT) junto con la vía de biosíntesis del DHA tal como se confiere por la construcción o GA7 variaciones de la misma. Las LPAAT preferidas son aquellas que pueden actuar sobre acil-CoA graso C22 poliinsaturado como sustrato, resultando en una mayor inserción de la cadena de C22 poliinsaturada en la posición sn-2 de LPA para formar PA, con relación a la LPAAT endógena. Las enzimas LPAAT citoplasmáticas muestran con frecuencia variadas preferencias de sustrato, en particular cuando la especie sintetiza y acumula ácidos grasos inusuales en el TAG. Se demostró que una LPAAT2 de *Limnanthes douglasii* utiliza erucoil-CoA (C22:1-CoA) como sustrato para la síntesis de PA, en contraste con una LPAAT1 de la misma especie que no podía utilizar el sustrato C22 (Brown et al., 2002).

Se consideraron las LPAAT conocidas y se seleccionaron una serie para someterlas a pruebas, incluyendo algunas que no se esperaba que aumentarían la incorporación de DHA en la posición sn-2, como controles. Las LPAATs conocidos incluyen: LPAAT2 de *Arabidopsis thaliana*: (SEQ ID NO: 63, N.º de acceso ABG48392, Kim et al., 2005), LPAAT de *Limnanthes alba* (SEQ ID NO: 64, N.º de acceso AAC49185, Lassner et al., 1995), Slc1p de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 65, N.º de acceso NP_010231, Zou et al., 1997), LPAAT1 de *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 67, N.º de acceso AED33305; US Patent No. 7879591) y LPAAT de *Brassica napus* (SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69, N.º de acceso ADC97479 y ADC97478 respectivamente). Estas se eligieron para abarcar tres grupos de enzimas LPAAT: 1. semillas vegetales de control de LPAAT, normalmente con actividad baja en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (incluidas las LPAAT de *Arabidopsis* y *Brassica*), 2. LPAAT que habían demostrado previamente que actuaban en ácidos grasos C22 usando C22 acil-CoA como sustrato, en este caso ácido erúxico C22:1 (incluidas las LPAAT de *Limnanthes* y *Saccharomyces*), 3. LPAAT que los inventores consideraban probables de ser capaces de utilizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tales como EPA y DHA como sustratos (incluida la LPAAT de *Mortierella*).

La LPAAT2 de *Arabidopsis* (también denominada LPAT2) es una enzima localizada en el retículo endoplasmático que demostró tener actividad sobre los sustratos C16 y C18, sin embargo la actividad sobre los sustratos C20 o C22 no fue probada (Kim et al., 2005). La LPAAT2 de *Limnanthes alba* demostró insertar una cadena de acilo C22:1 en la posición sn-2 de PA, aunque la capacidad de utilizar DHA como un sustrato no se probó (Lassner et al., 1995). La LPAAT Slc1p *S. cerevisiae* seleccionada ha demostrado tener actividad usando 22:1-CoA además de 18:1-CoA como sustratos, lo que indica una amplia especificidad del sustrato con respecto a la longitud de la cadena (Zou et al., 1997). Nuevamente, DHA-CoA y otros LC-PUFA no se sometieron a ensayo como sustratos. La LPAAT de *Mortierella* había mostrado previamente tener actividad en los sustratos de ácidos grasos de EPA y DHA en la *Yarrowia lipolytica* transgénica (documento US 7879591).

Los inventores encontraron LPAAT adicionales. *Micromonas pusilla* es una microalga que produce y acumula DHA en el aceite, aunque la distribución posicional del DHA en el TAG en esta especie no se ha confirmado. Las LPAAT de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO. 66, N.º de acceso XP_002501997) se identificó mediante la búsqueda de la secuencia genómica de *Micromonas pusilla* usando la LPAAT2 de *Arabidopsis* como una secuencia de consulta BLAST. Surgieron varias secuencias candidatas y la secuencia XP_002501997 se sintetizó para someterla a ensayo como una enzima LPAAT probable con actividad en C22 LC-PUFA. Se registró la LPAAT de *Ricinus communis* como una LPAAT posible en la secuencia del genoma de ricino (Chan et al., 2010). Cuatro LPAAT candidatas del genoma de ricino se sintetizaron y se ensayaron en lisados de hojas crudas de tejido de la hojas de *N. benthamiana* infiltrada. La secuencia candidata descrita aquí mostró actividad de LPAAT.

Un número de LPAAT candidatas fueron alineadas con LPAAT conocidas en un árbol filogenético (Figura 20). Se señaló que la LPAAT de *Micromonas* putativa no se agrupaba con las LPAAT C22 putativas, pero era una secuencia divergente.

Como una prueba inicial de varias LPAAT por su capacidad para utilizar DHA-CoA como sustrato, se realizan construcciones genéticas quiméricas para obtener la expresión constitutiva de las LPAAT exógenas en hojas de *N. benthamiana*, cada una bajo el control del promotor 35S, como sigue: 35S:Arath-LPAAT2 (*Arabidopsis* ER LPAAT); 35S:Ricco-LPAAT2; 35S:Limal-LPAAT (*Limnanthes alba* LPAAT); 35S:Sacce-Slc1p (*S. cerevisiae* LPAAT); 35S:Micpu-LPAAT (*Micromonas pusilla* LPAAT); 35S:Moral-LPAAT1 (*Mortierella alpina* LPAAT). Una construcción 35S:p19 que carece de una LPAAT exógena se usa como control en el experimento. Cada una de estas construcciones se introduce a través de *Agrobacterium* en hojas de *N. benthamiana* como se describe en el Ejemplo 1, y 5 días después de la infiltración, las zonas de hoja tratadas se escindieron y enterraron para hacer lisados de las hojas. Cada lisado incluye la LPAAT exógena, así como las enzimas endógenas para la síntesis de LPA. Las

reacciones in vitro se realizan mediante la adición de 14C-etiquetado-OA, -LA o -ALA (sustratos C18), -ARA (un sustrato C20) y -DHA (C22) a los lisados, en triplicado. Las reacciones son incubadas a 25 °C y el nivel de incorporación de los ácidos grasos etiquetados 14C en PA se determinó por CCF. Se calculó la capacidad de cada LPAAT para su uso el DHA relacionado con ARA y los ácidos grasos C18. Se encontró que las LPAAT de hierba de la pradera, *Mortierella* y *Saccharomyces* tienen actividad sobre el sustrato DHA, con PA radiomarcado que aparece para estos, pero no las otras LPAAT. Todos LPAAT fueron confirmados activos por una alimentación de ácido oleico similar.

Para someter a ensayo la actividad de LPAAT en las semillas, varias secuencias que codifican la proteína o LPAAT que se insertan en un vector binario bajo el control de un promotor de conlinina (pLuCn1). Las construcciones genéticas resultantes que contienen los genes quiméricos, Cn1:Arath-LPAAT (control negativo), Cn1:Limal-LPAAT, Cn1:Sacce-Slc1p, y Cn1:Moral-LPAAT, respectivamente, se utilizan después para transformar plantas de *B. napus* y *A. thaliana* para generar transformantes estables que expresan las LPAAT de una manera específica de la semilla. Las plantas transformadas que tienen las construcciones CNL1:LPAAT se cruzan con plantas que expresan la construcción GA7 o variaciones de la misma (Ejemplo 5) que producen DHA en la semilla para dar lugar a un aumento de la incorporación de DHA en la posición *sn-2* del TAG. Las construcciones también se utilizan para transformar plantas de *B. napus*, *C. sativa* y *A. thaliana* que ya contienen la construcción GA7 y variantes de este (Ejemplos 2 a 5) para generar progenie que lleve tanto las construcciones genéticas parentales como la LPAAT. Se espera un aumento en la incorporación de DHA en la posición *sn-2* del TAG con respecto a la incorporación en las plantas que carecen de las LPAAT que codifican transgenes. El contenido de aceite también se ha mejorado en las semillas, en particular para las semillas que producen niveles más elevados de DHA, contrarrestando la tendencia observada en las semillas de *Arabidopsis* como se describe en el Ejemplo 2.

Los expertos en la materia podrán apreciar que numerosas variaciones y/o modificaciones se pueden hacer a la invención como se muestra en las realizaciones específicas sin apartarse del espíritu o alcance de la invención tal como se ha descrito ampliamente. Las presentes realizaciones serán, por lo tanto, consideradas en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

La presente solicitud reivindica la prioridad de US 61/660.392 presentada el 15 de junio 2012, US 61/663.344 presentada el 22 de junio de 2012, US 61/697.676 presentada el 6 de septiembre de 2012 y US 61/782.80 presentada el 14 de marzo de 2013.

Cualquier descripción de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se incluya en la presente entrada tiene únicamente los fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe considerarse como admitido que cualesquiera o todas estas materias formen parte de la técnica previa o fueran de conocimiento general en el campo pertinente a la presente invención ya que existían antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

REFERENCIAS

- Abbadi et al. (2004) *Plant Cell* 16: 2734-2748.
 Abbott et al. (1998) *Science* 282:2012-2018.
 Abdullah et al. (1986) *Biotech.* 4:1087.
 Agaba et al. (2004) *Marine Biotechnol.* (NY) 6:251-261.
 Alvarez et al. (2000) *Theor Appl Genet* 100:319-327.
 Armbrust et al. (2004) *Science* 306:79-86.
 Attila Kereszt et al. (2007) *Nature Protocols* 2:948 – 952.
 Baumberger et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1609-1614.
 Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
 Baumlein et al. (1992) *Plant J.* 2:233-239.
 Beaudoin et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6421-6426.
 Beclin et al. (2002) *Curr. Biol.* 12:684-688.
 Berberich. et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 36:297-306.
 Bortolamiol et al. (2007) *Curr. Biol.* 17:1615-1621.
 Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
 Brown et al. (2002) *Biochem J.* 364:795-805.
 Chapman et al. (2004) *Gen. Dev.* 18:1179-1186.
 Chen et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1302-1313.
 Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
 Cheng et al. (2010) *Transgenic Res* 19: 221-229.
 Chikwamba et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11127-11132.
 Cho et al. (1999a) *J. Biol. Chem.* 274:471-477.
 Cho et al. (1999b) *J. Biol. Chem.* 274:37335-37339.
 Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16:735-43.
 Coutu et al. (2007) *transgenic Res.* 16: 771-781.
 Damude et al. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9446-9451.

- Denic y Weissman (2007) *Cell* 130:663-677.
 Domergue et al (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
 Domergue et al. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4105-4113.
 Domergue et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 35115-35126.
 5 Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 389: 483-490.
 Dunoyer et al. (2004) *The Plant Cell* 16:1235-1250.
 Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
 Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Lett.* 2:74.
 Fukunaga (2009) *EMBO J.* 28:545-55.
 10 Gamez et al. (2003) *Food Res International* 36: 721-727.
 Garcia-Maroto et al. (2002) *Lipids* 37:417-426.
 Girke et al. (1998) *Plant J.* 15:39-48.
 Glick et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 105-157-161.
 Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
 15 Hall et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9320-9324
 Hamilton y Baulcombe (1999) *Science* 286:950-952.
 Hamilton et al. (1997) *Gene* 200:107-16.
 Harayama (1998). *Trends Biotechnol.* 16: 76-82.
 Hastings et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:14304-14309.
 20 Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.
 Hoffmann et al. (2008) *J Biol. Chem.* 283:22352-22362.
 Hong et al. (2002a) *Lipids* 37:863-868.
 Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
 Horvath et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1914-1919.
 25 Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.
 Inagaki et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:613-621.
 Johansen y Carrington (2001) *Plant Physiol.* 126-930-938.
 Kajikawa et al. (2004) *Plant Mol. Biol.* 54:335-52.
 Kajikawa et al. (2006) *FEBS Lett* 580:149-154.
 30 Kim et al. (2005) *Plant Cell.* 2005 1073-89.
 Knutzon et al. (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.
 Koziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
 Lassner (1995) *Plant Physiol.* 109:1389-94.
 Leonard et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
 35 Leonard et al. (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.
 Leonard et al. (2002) *Lipids* 37:733-740.
 Lewsey et al. (2007) *Plant J.* 50:240-252.
 Lo et al. (2003) *Genome Res.* 13:455-466.
 Lu y Kang (2008) *Plant Cell Rep.* 27:273-8.
 40 Mallory et al. (2002) *Nat. Biotech.* 20:622-625.
 Marangoni et al. (1995) *Trends in Food Sci. Technol.* 6: 329-335.
 Meesapyodsuk et al. (2007) *J Biol Chem* 282: 20191-20199.
 Meng et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89:2349-2358.
 Meyer et al. (2003) *Biochem.* 42:9779-9788.
 45 Meyer et al. (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.
 Michaelson et al. (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
 Michaelson et al. (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.
 Murashige y Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
 Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330:611-614.
 50 Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
 Niedz et al. (1995) *Plant Cell Reports* 14:403.
 Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859.
 Parker-Barnes et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8284-8289.
 Pereira et al. (2004a) *Biochem. J.* 378:665-671.
 55 Pereira et al. (2004b) *Biochem. J.* 384:357-366.
 Perrin et al. (2000) *Mol Breed* 6:345-352.
 Petrie et al. (2010a) *Metab. Eng.* 12:233-240.
 Petrie et al. (2010b) *Plant Methods* 11:6:8.
 Petrie et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.
 60 Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol – Plant* 40:1-22.
 Prasher et al (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:31-36.
 Qi et al. (2002) *FEBS Lett.* 510:159-165.
 Qi et al. (2004) *Nat. Biotech.* 22: 739-745.
 Qiu et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566.
 65 Reddy y Thomas (1996) *Nat. Biotech.* 14:639-642.
 Reddy et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:293-300.

- Robert et al. (2005) *Func. Plant Biol.* 32:473-479.
 Robert et al. (2009) *Marine Biotech* 11:410-418.
 Ruiz-Lopez et al. (2012) *transgenic Res.* 21:139-147.
 Saha et al. (2006) *Plant Physiol.* 141:1533-1543.
 5 Saito et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:1813-1818.
 Sakuradani et al. (1999) *Gene* 238:445-453.
 Sato et al. (2004) *Crop Sci.* 44: 646-652.
 Sakuradani et al. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:648-654.
 Sayanova et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 36533-36541.
 10 Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4211-4216.
 Sayanova et al. (2003) *FEBS Lett.* 542:100-104.
 Sayanova et al. (2006) *Planta* 224:1269-1277.
 Sayanova et al. (2007) *Plant Physiol* 144:455-467.
 Singh et al. (2005) *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8:197-203.
 15 Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry* (In Press).
 Sperling et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:3801-3811.
 Sperling et al. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* 388:293-8.
 Sprecher et al. (1995) *J. Lipid Res.* 36:2471-2477.
 Spychalla et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1142-1147.
 20 Stalker et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314.
 Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem* 263:12500-12508.
 Tonon et al. (2003) *FEBS Lett.* 553:440-444.
 Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
 Trautwein (2001) *European J. Lipid Sci. and Tech.* 103:45-55.
 25 Tvrđik (2000) *J. Cell Biol.* 149:707-718.
 Venegas-Caleron et al. (2010) *Prog. Lipid Res.* 49:108-119.
 Voinnet et al. (2003) *Plant J.* 33:949-956.
 Wallis y Browse (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365:307-316.
 Watts y Browse (1999b) *Arch. Biochem. Biophys.* 362:175-182.
 30 Weiss et al. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95:106.
 Whitney et al. (2003) *Planta* 217:983-992.
 Winans (1988) *J. Bacteriol.* 170:4047-54.
 Wood (2009) *Plant Biotechnol J.* 7:914-24.
 Wu et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1013-1017.
 35 Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.
 Zank et al. (2002) *Plant J.* 31:255-268.
 Zank et al. (2005) WO 2005/012316
 Zhang et al. (2004) *FEBS Lett.* 556:81-85.
 Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.
 40 Zhang et al. (2007a) *FEBS Letters* 581: 315-319.
 Zhang et al. (2008) *Yeast* 25: 21-27.
 Zhou et al. (2007) *Phytochem.* 68:785-796.
 Zhou et al. (2008) *Insect Mol Biol* 17: 667-676.
 Zou et al. (1997) *Plant Cell.* 9:909-23.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nuseed Pty Ltd
 Grain Research and Development Corporation
 50 Commonwealth Scientific and Industrial Research
 Organisation

<120> PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN CÉLULAS
 VEGETALES

55 <130> B11119-CA

<140> EP 13803782.5
 <141> 14-06-2013

60 <150> US 61/660.392
 <151> 15-05-2012

<150> US 61/663.344
 65 <151> 22-06-2012

ES 2 636 487 T3

<150> US 61/697.676
 <151> 06-09-2012

5 <150> US 61/782.680
 <151> 14-03-2013

<160> 72

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 21527
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia nucleotídica pJP3416-GA7.

20 <400> 1

tcctgtggtt	ggcatgcaca	tacaaatgga	cgaacggata	aaccttttca	cgccctttta	60
aatatccgat	tattctaata	aacgctcttt	tctcttaggt	ttaccgccca	atatatcctg	120
tcaaacactg	atagtttaaa	ctgaaggcgg	gaaacgacaa	tctgctagtg	gatctcccag	180
tcacgacggt	gtaaaacggg	cgccccgcgg	aaagcttgcg	gccgcccgat	ctagtaacat	240
agatgacacc	gcgcgcgata	atztatccta	gtttgcgcgc	tatattttgt	tttctatcgc	300
gtattaaatg	tataattgcg	ggactcta	cataaaaacc	catctcataa	ataacgtcat	360
gcattacatg	ttaattatta	cgtgcttaac	gtaattcaac	agaaattata	tgataatcat	420
cgcaagaccg	gcaacaggat	tcaatcttaa	gaaactttat	tgccaaatgt	ttgaacgatc	480
ggcgcgcctc	attagtgagc	cttctcagcc	tttccgttaa	cgtagtagtg	ctgtcccacc	540
ttatcaaggt	tagagaaagt	agccttccaa	gcaccgtagt	aagagagcac	cttgtagttg	600
agtccccact	tcttagcgaa	aggaacgaat	cttctgctaa	cctcaggctg	tctgaattga	660
ggcatatcag	ggaagagggtg	gtggataacc	tgacagttaa	ggtatcccat	aagccagttc	720

ES 2 636 487 T3

acgtatcctc	tagaaggatc	gatatcaacg	gtgtgatcaa	cagcgtagtt	aacccaagaa	780
aggtgcttat	cagatggaac	aacagggagg	tgagtatgag	aagtagagaa	gtgagcgaaa	840
aggtacatgt	aagcgatcca	gtttccgaaa	gtgaaccacc	agtaagcaac	aggccaagag	900
tatccagtag	caagcttgat	aacagcggtt	ctaacaacat	gagaaacgag	catccaagaa	960
gcctcttcgt	agttcttctt	acggagaact	tgtctagggt	ggagaacgta	gatccagaaa	1020
gcttgaacaa	gaagtccaga	ggtaacagga	acgaaagtcc	aagcttgaag	tctagcccaa	1080
gctctagaga	atcctctagg	tctgttatcc	tcaacagcag	tgttgaagaa	agccacagca	1140
ggagtggat	caagatccat	atcgtgtcta	accttttgag	gggtagcatg	gtgcttgta	1200
tgcatctggt	tccacatctc	accagaagta	gaaagtccga	atccacaagt	catagcctga	1260
agtctcttgt	ccacgtaaac	agatccggta	agagagttat	gtccaccctc	atggtgaacc	1320
catccacatc	tagctccgaa	gaaagcaccg	taaacaacag	aagcaatgat	agggtatcca	1380
gcgtacataa	gagcagttcc	aagagcgaat	gtagcaagaa	gctcgagaag	tctgtaagcc	1440
acatgggtga	tagaaggctt	gaagaatcca	tctctctcaa	gctcagcacg	ccatctagcg	1500
aaatcctcaa	gcataggagc	atcctcagac	tcagatctct	tgatctcagc	aggtctagaa	1560
ggcaaagctc	taagcatctt	ccaagccttg	agagaacgca	tgtggaattc	tttgaagcc	1620
tcagtagcat	cagcaccagt	gtagcaagc	atgtagaaga	tcacagatcc	accaggggtgc	1680
ttgaagttag	tcacatcgta	ctcaacgtcc	tcaactctaa	cccatctagt	ctcgaaagta	1740
gcagcaagct	catgaggctc	aagagtctta	agatcaacag	gagcagtaga	agcatcotta	1800
gcatcaagag	cctcagcaga	agatttagac	ctggtaagtg	gagatctagg	agaagatctt	1860
ccatcagtct	taggagggca	catggtatgg	taattgtaaa	tgtaattgta	atggtgtttg	1920
ttgtttgttg	ttgttggtaa	ttgttgtaaa	agatcctcgt	gtatgttttt	aatcttgttt	1980
gtatcgatga	gttttggttt	gagtaaagag	tgaagcggat	gagttaattt	ataggctata	2040
aaggagattt	gcatggcgat	cacgtgtaat	aatgcatgca	cgcagtgat	tgatgtgtg	2100
tgctgtgaga	gagaagctct	taggtgtttg	aagggagtga	caagtggcga	agaaaaacaa	2160
ttctccgcg	ctgcatgcta	tgtgtaacgt	gtagctaattg	ttctggcatg	gcatcttatg	2220
aacgattctt	tttaaaaaa	aggtaaaaa	ttaacttcat	aaaattaaaa	aaaaaacgt	2280
ttactaagtt	ggtttaaag	gggatgagac	tagtagattg	gttggttgg	ttccatgtac	2340
cagaaggctt	accctattag	ttgaaagttg	aaactttggt	ccctactcaa	ttcctagttg	2400
tgtaaagtga	tgtatatgta	atgtgtataa	aacgtagtac	ttaaagtact	aggagtggtt	2460
cttgagaccg	atgagagatg	ggagcagaac	taaagatgat	gacataatta	agaacgaatt	2520
tgaaaggctc	ttaggtttga	atcctattcg	agaatgtttt	tgtcaaagat	agtggcgatt	2580

ES 2 636 487 T3

ttgaacccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccgggta cgttcatgca aatagaaaagt 2640
 ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg 2700
 tgtacaaaaac tacaaataat atatttttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat 2760
 tatttactga ggtagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga 2820
 tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt 2880
 taatgcacat gtaatcatag ttttagcaca ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa 2940
 attttagac ttttttttg cgtaaaga agactaagtt tatacgtaca tttatttta 3000
 agtgaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg 3060
 tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattaca tgtgtatgga 3120
 tgcattgagt tgagtataca catgtctaaa tgcattgctt gtaaacgta acggaccaca 3180
 aaagaggatc catacaata catctcatag ctctctccat tttttccga cacaacaga 3240
 gcattttaca acaattacca acaacaaca acaacaaca acattacaat tacatttaca 3300
 attaccatac catggaattc gccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgtg 3360
 ctatcgatgc tgttgttgc cctgctatct tctctgctac tgattctatc ggatggggac 3420
 ttaagcctat ctctctgct actaaggact tgctcttgt tgagtctcct acacctctca 3480
 tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt 3540
 tccttagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg ctgctcaca 3600
 acgtgttctt tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggcttacg 3660
 ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg 3720
 ttatctggat ctcttaoctg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc 3780
 tcaaggghaa tgtaaccag gttagcttcc ttcaogttta ccatcacgga tctatctctg 3840
 gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc tctgctgctc 3900
 ttaactcttg ggttcaogtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc gtgcttccta 3960
 aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga 4020
 tgttccagtt ctcatgaac ctctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt 4080
 accctaagtt tatcgtcag ctctcgtgg tgtacatggt tactcttctc atgctttctg 4140
 gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccc gccgcgccc 4200
 atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcaactactc atcgtatgtg 4260
 attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac 4320
 tataacacat taatctact tgtcatatga taacactctc cccattttaa actcttgtca 4380
 atttaaagat ataagattct ttaaagtatt aaaaaaata tattataaat tcaatcactc 4440
 ctactaataa attattaatt attatattt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 4500

ES 2 636 487 T3

tgaatagaat aattagattc tagtctcatc cccttttaaa ccaacttagt aaacgttttt 4560
 ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg ttcataagat 4620
 gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt 4680
 cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata 4740
 caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaactctcc tttatagcct 4800
 ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaaaacaaga 4860
 ttaaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaac aacaacaac 4920
 attacaaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac tcttatgctg 4980
 ctctccttc tgcctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc 5040
 ttgttatcgg agatagggtt tacgatgta ccaacttctg taagagacac cctggtggaa 5100
 agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgta 5160
 gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctctccttc tgcctcgtt cacaagggat 5220
 actctccaag aagggtgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag caacttgagg 5280
 ctgagggaaat gttcgagcct tctctcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg 5340
 ctatgcatgt tgcctgctgct gctcttatct ggcatggata cacttctgct ggaatcgcta 5400
 tgcttgaggt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc 5460
 tcaactggaaa cattgcttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg 5520
 gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc 5580
 ttcagcacga tgttgatctt gataccctc ctctcgttg tttccatgag agaatcgctg 5640
 ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag ctttctgctc 5700
 ctgttaccac tcttctgtt gctcttgat ggagcttta ccttcatcct agacacatgc 5760
 tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgcctggaaat cagatacggga cttgttgat 5820
 accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgttg ttaccttctt tacgttcagc 5880
 ttggagctat gtacatctc tgcaacttgc ctgtttctca tactcacctc cctgttggtg 5940
 agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc 6000
 catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccacctt 6060
 accttctat gcctcaatc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagctttctg 6120
 agaagcacgg acttactac gatgttagag gatacttoga ggctatggct gatactttcg 6180
 ctaaccttga taacgttgc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa 6240
 acatttgca ataaagttc ttaagattga atcctgttg cggctcttgc atgattatca 6300
 tataattct gttgaattac gttaagcac taataattaa catgtaatgc atgacgttat 6360

ES 2 636 487 T3

ttatgagatg ggTTTTtATG attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa 6420
 acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag 6480
 atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 6540
 aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagTTTTtAT atatatgcct ttaagacttt 6600
 ttatagaatt ttcttttaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 6660
 ttcgttaaAT atgaagtGct ccatttttAT taacttttaa taattggttg tacgatcact 6720
 ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt ctccatatt catatgtcaa 6780
 aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaa 6840
 attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat 6900
 ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 6960
 tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 7020
 aaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 7080
 taaaataata ttcactaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccg ggcaaaaccg 7140
 aaccaatcca aaccgatata gttggtttg gttgattttg atataaaccg aaccaactcg 7200
 gtccatttgc acccctaate ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt 7260
 tgtcaatate ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 7320
 aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 7380
 tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 7440
 agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaata 7500
 cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tttttttgt tcttaaaaaa gcatcccctc 7560
 taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct ccttcgta caaaaatttt 7620
 ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt 7680
 ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct 7740
 ttttattacg gttaatgact taaaacacat ctattatcc catccttaac acctagcagt 7800
 gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg 7860
 agctggcacc ggctaggctg ggtgccgcac tgtccggaa ggtccctagc gacttgttta 7920
 gattgatggg accacctctc aacttctctc tgctgtccct gctgctggat gtctgcctc 7980
 atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcaact cgctcctcaa ttgcttaaga 8040
 tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttggttgtag 8100
 tagtagctgc cgcgcctt ctggactttt tcccacagga accgcgaat aattcgatag 8160
 aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaacca gaaacataca taacatttca 8220
 tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttta 8280

ES 2 636 487 T3

ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta ttatccatcc 8340
 ttaacaccta gcagtgctct tgtacgatct cataatcgat caccocctca tcaggatcc 8400
 ttaggcttca ctccaacggt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc atggttctca 8460
 acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaacco acatgttctc atcgggtgtgt 8520
 ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat 8580
 gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctoga tgatgtcatg gaagatgatt 8640
 ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct 8700
 tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc 8760
 cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa 8820
 accttgtaag cgggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg 8880
 atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag 8940
 aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta aagagaaagt 9000
 cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtctc ctcagcgata 9060
 tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcgggtga aggaacgaaa 9120
 accatatctc tggatcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga gaacttccag 9180
 ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaaccocat caacggatc gttaaccat 9240
 ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg 9300
 aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcggttaggg 9360
 agaagagggg tgtaggtgta tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatatctctc 9420
 accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca 9480
 aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg 9540
 gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacggtt ccagaacgcc taacggctct agtagatccc 9600
 tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggttaatt gtaaatgtaa 9660
 ttgtaatggt gtttgttggt tgttgttggt ggtaattggt gtaaaatctt tgggtggtgat 9720
 tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg 9780
 atggtgggtt tatatagtg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac tttgcatggg 9840
 ctacacgtgg gttcttttg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca 9900
 tatacggtat ttaataatg tgtgggaata caatatgcc agtattttac taattttggc 9960
 aatgacaagt gtacatttg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt 10020
 tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg 10080
 gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa 10140

ES 2 636 487 T3

ggaaaatact gattctctca agcatacggga caagggtaaa taacatagtc accagaacat 10200
 aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata 10260
 ttggaaacat cattatccta gtcttctgac catctctcct cctgctctag ttgagaggcc 10320
 ttgggactaa cgagagggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta gcctttctgg 10380
 tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct 10440
 tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggtctgcaa 10500
 tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt gctgatttag 10560
 agctcccggg tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt 10620
 tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact 10680
 cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat ttttttcaa 10740
 cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac 10800
 aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga 10860
 catccataac gaccogaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt 10920
 catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaaat 10980
 attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt 11040
 gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtgggtgtca gcaaaccaat gaccgaaatc 11100
 catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag 11160
 agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag 11220
 agatatgttg aggcagacc atctgtgcca ctctgacaat tacgagagtt gtttttttg 11280
 tgattttcct agtttctcgt tgatgggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac 11340
 gtcgtttcct gtcactgat atcccgatc ttgcatccac gtgcgcgcgc tcccggtcca 11400
 agtccctagg tgtcatgcac gccaaattgg tgggtgtgag ggctgccctg tgcttcttac 11460
 cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg 11520
 tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat 11580
 tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag 11640
 ttacatctct taagaaataa tgtaaccctt ttagacttta tataatttga attaaaaaaa 11700
 taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt 11760
 tataatgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggattgtg tttacagaac 11820
 ctataatcaa ataactaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg 11880
 ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat 11940
 atcatogccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgact 12000
 tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aaccatgca tccatgcaa ctgaagaatg 12060

ES 2 636 487 T3

gcgcaagaac ccttccoctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctccogc 12120
 tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa 12180
 gataccctact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca 12240
 tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg 12300
 ttcattgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatggtgct gatagacctg 12360
 atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaagge tttcagatct gagcatcctg 12420
 gtgggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcattggaat 12480
 accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga tctcttgctt 12540
 ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta 12600
 agatgggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctctgcttc ttactgggtt aaggctggac 12660
 ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga aagagacttc 12720
 tcccttctat cgttcttggga tggctttctg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg 12780
 ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttggga ctttgtcagg 12840
 attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttggtatg caccacctcc 12900
 acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cgggtgctctt agactcaagc 12960
 ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttaccttttg cctggtgaga 13020
 ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttggtatg tggcgttggg 13080
 aggggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg cttctcaagc 13140
 ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttaoct tgctccttct gttcatactg 13200
 ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgcttc ttcttcttca 13260
 tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga 13320
 ctagagggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt ggaggacctc 13380
 ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag 13440
 ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgtaa ggctgagctt gaggctagag 13500
 gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctccagacata 13560
 tgtacgctct tggagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt 13620
 gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg 13680
 aggggaagg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggg gctaattttg tatcgattg 13740
 tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgtttttt aaatcatgaa ttttaaat 13800
 tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga tgtttcttta 13860
 cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa 13920

ES 2 636 487 T3

aagctttaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata 13980
ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga 14040
ttcctattaa ctacaagcct tgttgccggc ggagaagtga tcggcgccgc gagaagcagc 14100
ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt 14160
cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca 14220
ttcaattctg tcttgccctt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa 14280
taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc 14340
caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat accgtatatg 14400
tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaacct acgtgtagcc 14460
catgcaaagt taacactcac gaccccatc ctcagtctcc actatataaa cccaccatcc 14520
ccaatctcac caaaccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat 14580
caccaccaa aattttaca caattacaa caacaacaaa caacaacaa cattacaatt 14640
acatttaca ttaccatacc atgagcgtg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca 14700
gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa 14760
acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt 14820
gttacgagag aagattggct acctctctc actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc 14880
ttaccaccg ataccttacc cataagatcc tttaccctc cctcatctc tacacctca 14940
acagcatcat caagttcact ttctggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa 15000
ccggaatctg ggttctcgt catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg 15060
tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga 15120
agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg 15180
ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctgctgagt 15240
actctgagga ttctcactt agaaccctt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat 15300
ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatggt ccttcttgg 15360
aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct 15420
tcctttctga tcttggaatc ctcaccagg gaatcgttct tactcttgg tacaagaaat 15480
tcggaggatg gtccctttc atcaactggt tcgttcotta catctgggtt aaccactggc 15540
tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg 15600
aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcacggac 15660
ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccaactactgt tctaggatcc 15720
cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca 15780
ggtctagcga cgagaacatg tggaaagtc tttggaagtc tttcaggtct tgccaatagc 15840

ES 2 636 487 T3

ttgacggtga taacggtggt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg 15900
 ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtaac aaagacactg ctaggtgtta 15960
 aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta 16020
 ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg 16080
 atgaaatggt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg ctctgtgtgt 16140
 tctatcgaat tattcggcgg ttctctgtgg aaaaagtcca gaagggccgc cgcagctact 16200
 actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg 16260
 atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga 16320
 tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat 16380
 ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc 16440
 tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtgtgga tcgatgagat cgtataaaga 16500
 cactgctagg tgtaaggtat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa 16560
 aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg 16620
 gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttggtctaa 16680
 tttagtttg tattgagtaa aacaaattog aaccaaacca aaatataaat atatagtttt 16740
 tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatattt 16800
 gcgactcttc tggcatgtaa tatttogtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt 16860
 aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgctt caatctcttt 16920
 gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg 16980
 aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatctc attatttagg tatcatattg 17040
 atttttatc ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta 17100
 gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata 17160
 ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta 17220
 tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct acaaaaaaaaa aaaccagaaa 17280
 atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaacgat atagttggtt tggtttgatt 17340
 ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccocct atcataatag ctttaatatt 17400
 tcaagatatt attaagtaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc 17460
 ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcagatgtg gtggtaatat gtaatttact 17520
 tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga 17580
 tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag 17640
 gaacaaatat ttttaaaaa atacgcaatg acttggaaaca aaagaaagtg atatattttt 17700

ES 2 636 487 T3

tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat 17760
 gctcccttgc ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg 17820
 caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa 17880
 agttgaaact ttgttccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 17940
 tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 18000
 agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct 18060
 attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 18120
 atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggctc aggatctgat tgtaatttta 18180
 gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 18240
 ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcaattttt actgaggtta gagaatagac 18300
 ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc 18360
 caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 18420
 cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgta 18480
 aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg 18540
 aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 18600
 tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 18660
 ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 18720
 catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 18780
 aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 18840
 tatccctgct gctcttgcctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 18900
 tatcccagct tctgagaaag ttctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac 18960
 tatcggaact attggatacc tctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 19020
 atctcaacct ttoggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 19080
 caacagctac tgcactacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 19140
 gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggta tctggcttca 19200
 ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt 19260
 cgaccagctt totttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 19320
 tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttctg 19380
 gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 19440
 gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 19500
 caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttcttac cttcaactct gggttatggt 19560
 gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa 19620

ES 2 636 487 T3

gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 19680
 actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 19740
 aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgatcat atgataacac 19800
 tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 19860
 aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 19920
 aaaaactact atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 19980
 cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac 20040
 tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa 20100
 catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatac aaagatacag tctcagaaga 20160
 ccaaaggcca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 20220
 ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtgga aaggaaggtg gctcctacaa 20280
 atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccc acagtggtcc 20340
 caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 20400
 ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatact cactgacgta agggatgacg cacaatccca 20460
 ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 20520
 ggggactgaa ttaaataatga gccctgagag gcgtcctggt gaaatcagac ctgctactgc 20580
 tgctgatatg gctgctggtt gtgatatact gaaccactac atcgagactt ctaccgtaa 20640
 cttcagaact gagcctcaaa ctctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 20700
 tagataccct tggcttgttg ctgaggttga ggggtgtggt gctggaatcg cttacgctgg 20760
 accttggag gctagaaacg cttacgattg gactggtgag tctaccggtt acgtttcaca 20820
 cagacatcag agacttgac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 20880
 agctcagga ttcaagtctg ttgttgctgt tatoggactc cctaacgatc cttctgttag 20940
 acttcatgag gctcttgat aactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 21000
 cggtgatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttctcg ctctcctag 21060
 acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 21120
 agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgogatga ttatcatata atttctgtg 21180
 aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 21240
 tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 21300
 gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 21360
 acggttaaaa ccacccagc acattaacaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420
 cgtcaatttg ttacaccac aatatactct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480

 gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtc 21527

ES 2 636 487 T3

5 <210> 2
 <211> 23512
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia nucleotídica pGA7- mod_B

10 <400> 2

tcctgtggtt	ggcatgcaca	tacaaatgga	cgaacggata	aaccttttca	cgccctttta	60
aatatccgat	tattctaata	aacgctcttt	tctcttaggt	ttacccgcca	atatatcctg	120
tcaaactctg	atagtttaaa	ctgaaggcgg	gaaacgacaa	tctgctagtg	gatctcccag	180
tcacgacgtt	gtaaaaacgg	cgccccgcgg	aaagcttgcg	gccgcggtac	cgcccgttcg	240
actcagatct	tccaaggcct	cgtctccgag	tccgctgctt	ctcgcgcgcg	cgatcacttc	300
tccgccgcca	acaaggcttg	tagttaatag	gaatcattca	gggattgtga	ttccgggcag	360
tagtaattaa	taatatagta	ttagtataga	taatatgttt	cgtttgggat	ctttggaacg	420
ttgctctggt	ccttgttggt	cattttaaag	cttttgaggg	atagttgcag	aactgttcgg	480
tgatgcttca	tcctctcaag	aactagatct	gggtaaagaa	acatccatgc	atggatatgg	540
aatgttgctt	ttccgattgg	agattatctt	ataaaaattt	aaattcatga	tttaaaaaaa	600
cacataaaaa	ccacaaaatt	catgatttat	tgacaatacg	atacaaaatt	agcaccaccg	660
gctactggct	cattacacat	ttccccttcc	cctcattctc	actttgtggc	tttattatta	720
ttattattac	atatatttta	ccgttattat	ttcacgtcac	ataagcttgt	taattaatca	780
ttagtgagcc	ttctcagcct	ttccgttaac	gtagtagtgc	tgtcccacct	tatcaagggt	840
agagaaaagta	gccttccaag	caccgtagta	agagagcacc	ttgtagttga	gtccccactt	900
cttagcgaaa	ggaacgaatc	ttctgctaac	ctcaggctgt	ctgaattgag	gcatatcagg	960
gaagaggtgg	tggataacct	gacagttaag	gtatcccata	agccagttca	cgatcctctc	1020
agaaggatcg	atatcaacgg	tgtgatcaac	agcgtagtta	acccaagaaa	ggtgcttatt	1080
agatggaaca	acagggaggt	gagtatgaga	agtagagaag	tgagcgaaaa	ggtacatgta	1140
agcgatccag	tttccgaaa	tgaaccacca	gtaagcaaca	ggccaagagt	atccagtagc	1200
aagcttgata	acagcggttc	taacaacatg	agaaacgagc	atccaagaag	cctcttcgta	1260
gttcttctta	cggagaactt	gtctaggggtg	gagaacgtag	atccagaaa	cttgaacaag	1320
aagtccagag	gtaacaggaa	cgaaagtcca	agcttgaagt	ctagcccaag	ctctagagaa	1380
tcctctaggt	ctgttatcct	caacagcagt	gttgaagaaa	gccacagcag	gagtggatc	1440
aagatccata	tcgtgtctaa	ccttttgagg	ggtagcatgg	tgcttggtat	gcatctggtt	1500
ccacatctca	ccagaagtag	aaagtccgaa	tccacaagtc	atagcctgaa	gtctctgttc	1560

ES 2 636 487 T3

cacgtaaaca gatccggtaa gagagttatg tccaccctca tgttgaaccc atccacatct 1620
 agctccgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag 1680
 agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat 1740
 agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctcagcacgc catctagcga aatcctcaag 1800
 cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct 1860
 aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920
 agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccaggggtgct tgaagttagt 1980
 cacatcgtac tcaacgtcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc 2040
 atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcacacctag catcaagagc 2100
 ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagctct 2160
 aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgtttgt tgtttgttgt 2220
 tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggatcttt tggatggata agcaagtagt 2280
 gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg 2340
 tcgccacata agaaatggag ggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc 2400
 atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc 2460
 agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt 2520
 gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttgccg ttaatccctt caattaactg 2580
 cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt 2640
 ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaacttag 2700
 ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattatth ttttaattgc aaatatataa 2760
 agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaaac tgacttaatc 2820
 cgtctcatca ctctggtttc cagttctaat ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg 2880
 aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccaactacat 2940
 cgccgcggag acccccacac tcaacctcca cccatcggtg agaagcacag ggcagcccg 3000
 accaccacca atttggcgtg catgacacct agggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg 3060
 gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagaccat acgatgtaga 3120
 atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacia aaaaaacaac tctcgtat 3180
 gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgcccaa 3240
 cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cacgactctg aaagataggc gcttctctgt 3300
 tegtteget caccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgctga 3360
 caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg 3420

ES 2 636 487 T3

gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg 3480
gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagttcttc 3540
cctaattgctt tcatgaggct tcgggtcgtt atggatgtog gaaaaccctt cttgaaggaa 3600
cgagacgtta ttatgcatga cggttaagact attacttgtc agtataagta tgaaagatta 3660
cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaatg tgcaacttoga 3720
tttcaatact cagagatoga ctccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca 3780
tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct 3840
aaactgaaat cgaagtcaaa tcaccaaac gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct 3900
ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggatttg caagccagggt attgcaagct 3960
aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcacttca gacctaatgg 4020
agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa 4080
ggatctgcta tcccaactga cctctcgtta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg 4140
aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct 4200
aattttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctggtgac tatgttattt 4260
acccttgtcc gtatgcttga gggtagccta gtagattggt tggttggtt ccatgtacca 4320
gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagttgtg 4380
taaagtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aatgactag gagtgttct 4440
tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg 4500
aaaggctcct aggtttgaat cctattcagag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt 4560
gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcattgcaaa tagaaagtgg 4620
tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg 4680
tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccaactatta 4740
tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taacacatt cccgagaaat actcatgatc 4800
ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta 4860
atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat 4920
ttgtagactt ttttttgcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt ttattttaag 4980
tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt ctgcaatgta 5040
ctattttgct attttgcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg 5100
catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa 5160
agaggatcca tacaataca tctcatagct tctccatta tttccgaca caaacagagc 5220
attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaaac attacatta cattacaat 5280
taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgetcttg ctggaactct tggatacgtt 5340

ES 2 636 487 T3

acctacaatg tggctaacc tcatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg 5400
 cagggtgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc 5460
 ggaaagcgtat tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt 5520
 tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct accttttcgt tacttctcat 5580
 agggctcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga 5640
 atctctcagg ttatctggct tcactacaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc 5700
 ttcattggtga tgaggaagaa gttcgaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact 5760
 cttctcatct ggtcatggtt cgttgttatg aagcttgagc ctggttgaga ttgctacttc 5820
 ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct 5880
 cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcaccaga tccagatgct tcagttctgt 5940
 atctgtgctt ctactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgctt ctggcttcct 6000
 taccttcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctct tcgccaactt ctaccgtaag 6060
 aggtacaagt ctaagggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggcccgcg 6120
 ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgtataaagacgac tctcactact cgatcgctag 6180
 tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcacia cttatcgtaa tgcattgtgaa 6240
 actataacac attaatccta cttgtcatat gataaacctc tccccattta aaactcttgt 6300
 caatttaaag atataagatt ctttaaataa ttaaaaaaaaa tatattataa attcaatcac 6360
 tcctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag 6420
 tctgaataga ataattagat tctagtctca tcccccttta aaccaactta gtaaactgtt 6480
 ttttttttaa ttttatgaag ttaagttttt acctgtttt taaaaagaat cgttcataag 6540
 atgccatgcc agaacattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgg agaattgttt 6600
 ttcttcgcca cttgtcactc cttcaaaca octaagagct tctctctcac agcacacaca 6660
 tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatgcc atgcaaatct cttttatagc 6720
 ctataaatta actcatccgc ttcactctt actcaaacca aaactcatcg atacaaaca 6780
 gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaaca acaacaaca 6840
 acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc 6900
 tgctcctcct tctgctcaac ttcacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga 6960
 gcttgttatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gtttaagagac acctggtgg 7020
 aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt 7080
 tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttcct tctcgtcctg ttcacaaggg 7140
 atactctcca agaagggtc atcttatcgc tgatttcaa gagttcacca agcaacttga 7200

ES 2 636 487 T3

ggctgagga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat 7260
 cgctatgcat gttgctggg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc 7320
 tatgcttga gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc 7380
 tctcaactga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttgttacg gacttggatg 7440
 tggaatgtct ggtgcttggg ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctctcaaaa 7500
 gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tctctctggt gctttccatg agagaatcgc 7560
 tgctaaggtt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc 7620
 tctgttacc actcttcttg ttgctcttgg atggcagctt taccttcac ctagacacat 7680
 gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcggg atcagatacg gacttgttgg 7740
 ataccttgc gctaactacg gtgctggata cgttctcgcg tgttaccttc tttacgttca 7800
 gcttggagct atgtacatct tctgcaactt cgctgtttct catactcacc tccctgttgt 7860
 tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgctgct aaccacacta ctaactgttc 7920
 tccatcttgg tgggtgtgatt ggtggatgct ttacctaac taccagatcg agcaccacct 7980
 ttaccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt 8040
 cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt 8100
 cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc 8160
 aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat 8220
 catataaatt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataaatt aacatgtaat gcatgacgtt 8280
 atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga 8340
 aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact 8400
 agatcggctg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaatt ttagtttggg attgagtaaa 8460
 acaaatcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 8520
 ttttatagaa ttttcttta aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcattgtaat 8580
 atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggg tgtacgatca 8640
 ctttcttacc aagtgttact aaaatcgcgc aatctctttg ttcttcata ttcatatgct 8700
 aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 8760
 aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 8820
 atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 8880
 aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 8940
 taaaaaaaaa taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaaagtaag 9000
 attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 9060
 cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact 9120

ES 2 636 487 T3

cgggccattt gcaccocctaa tcataatagc tttaatatth caagatatta ttaaghtaac 9180
 gttgtcaata tcctggaat tttgcaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 9240
 ttaaaagcag ctogatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 9300
 agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 9360
 aaagaacctat aaagtgattg aagctcgaat tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa 9420
 tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatthttt gttcttaaac aagcatcccc 9480
 tctaaagaat ggcagthttc cthtgcatgt aactattatg ctcccttctg taaaaaatt 9540
 ttggactact attggaact tcttctgaaa atagtgatag aaccacacag agcatgtgct 9600
 tccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctc 9660
 cthtttatta cggthaatga cthaaaacac atcttattat cccatctta acacctagca 9720
 gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaaacca tgcagactgc tgctgcccc 9780
 ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccg aaggtcccta gcgacttgth 9840
 tagattgatg ggaccacctc tcaacttctc gctgctgtcc ctgctgctgg atgtctgcc 9900
 tcatctggcc gattgcacgc tccagtccc tgcattgca ctgctctc aattgctta 9960
 gatcatcgca gcagctatcg aagtgtggc tctgttccc tctccacgg ccttggtgt 10020
 agtagtagct gccgcccgc tctgtgactt tttccacag gaaccgcca ataattgat 10080
 agaaccacac gagcatgtgc tttcattat tttaaaaacc aagaaacata cataacatt 10140
 catcagctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc 10200
 tattacagct gttacactaa cthaaaacac atcatctca ttattattat tattatccat 10260
 ccttaacacc tagcagtgc tttgtacgat ctcataatcg atcaccctt catcaggtat 10320
 ccttaggctt cactccaacg ttgttgcagt tacggaacat gtacacaoca tcatggtct 10380
 caacgaactg gcaagatctc caagthttc aaaggctaac ccacatgtt tcatcggtgt 10440
 gtctgtagtg ctctccata actthcttga tgcactcgg agcttctcta gcatggtaga 10500
 atgggatct tgaacgtag tgatggagca catgagtctc gatgatgtca tgaagatga 10560
 ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact 10620
 cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cgggtgtctg aaggaaggta acgaaaacaa 10680
 gccagtggth aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga 10740
 aaacctgtat agcgggtgta acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa 10800
 cgatgtacca gtatctctc ttatcgaaaa cagggttaga aggccagtag tgagacttga 10860
 agaacttaga aacaccagg taaggttctc cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa 10920
 gtctccaag ctgthggaac aagagagcga aacagagta gataggagth tctcagcga 10980

ES 2 636 487 T3

tatcgtgaag gctggtaact tgggtccttct ctttgaattc ctggcggtg taaggaacga 11040
aaaccatata tctgggtcatg tgtccagtag ccttatgggtg cttagcatga gagaacttcc 11100
agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaaccca tccaacggta tcgttaaccc 11160
atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc 11220
cgaaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgttag 11280
ggagaagagg gatgtaggta agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc 11340
tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgctta gggatagcgt 11400
caaggatata cttgatgggtg taatctggca ccttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag 11460
cggctcttttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc 11520
cctcaaggat ctcatagcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaattg 11580
aattgtaattg ttgtttggtg tttgttggtg ttggtaattg ttgtaaaatt tttgggtggtg 11640
attggttctt taagggtgga gagtgagttg tgagttgtgt ggtggggttg gtgagattgg 11700
ggatgggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgta actttgcatg 11760
ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaata gcagccaata 11820
catatacggg attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg 11880
gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tottgcttta atttggatta 11940
tttttattct cttaccttgg ccgttcatat tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa 12000
tgggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg 12060
aaggaaaata ctgattctct caagcatagc gacaagggtg aataacatag tcaccagaac 12120
ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca 12180
tattggaaac atcattatcc tagtcttgtg accatccttc ctctgctct agttgagagg 12240
ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct 12300
gggttttcag agtcttcgtg ccgocgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact 12360
cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc 12420
aatacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt 12480
agagctcccg gttgggtgat ttgacttoga tttcagttta ggcttgttga aatttttcag 12540
gttccattgt gaagccttta gagcttgagc ttcttccat gttaatgcct tgatcgaata 12600
ctcctagaga aaagggaggt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac attttttttc 12660
aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg 12720
acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc 12780
gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt 12840
gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa 12900

ES 2 636 487 T3

atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta 12960
 ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa 13020
 tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc 13080
 agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt 13140
 agagatatgt tgaggcagac ccatctgtgc cactcgtaca attacgagag ttgttttttt 13200
 tgtgattttc ctagtttctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggctctctca 13260
 acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcaccc acgtgcgccg cctcccgtgc 13320
 caagtcacct ggtgtcatgc acgccaatt ggtggtggtg cgggctgcc tgtgcttctt 13380
 accgatgggt ggaggtttag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt 13440
 ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca 13500
 attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag 13560
 agttacatct cttaagaaat aatgtaacc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa 13620
 aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta 13680
 tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga 13740
 acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac 13800
 ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca 13860
 atatcatcgc ogttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca 13920
 cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa 13980
 tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc 14040
 gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atocatcaa 14100
 aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaac attacaatta 14160
 catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg 14220
 tgttcattgt ggtgttactg actctctctg ttcaccaga aaggatggtg ctgatagacc 14280
 tgatctcacc atcgttggag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc 14340
 tgggtgggtc catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga 14400
 ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc 14460
 ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc 14520
 taagatggtg ctttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg 14580
 acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact 14640
 tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttacc ggtcttaaca tccagcatga 14700
 tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca 14760

ES 2 636 487 T3

ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catggttgta tgcaccacot 14820
 ccacactaac gatggtgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa 14880
 gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgcctgggta 14940
 gactatgtac gctttcaagc ttttgttctt cgacatctct gagcttgta tgtggcgttg 15000
 ggagggtgag cctatcteta agcttgctgg atacctcttt atgccttctt tgcttctcaa 15060
 gcttaccttc tgggctagat tcggttcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac 15120
 tgctgtgtgt atcgcctgeta ctgttatgac tggatctttc tacctcgtt tcttcttctt 15180
 catctcccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttgacct gatggatcta tcacttctat 15240
 gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc 15300
 tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccctag 15360
 agttcaccat ggattctacc ctgacttgc tcctcttgtt aaggctgagc ttgaggctag 15420
 agaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgctteta ccctcagaca 15480
 tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac 15540
 gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa 15600
 tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat 15660
 tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt ttaaatacatg aattttaaat 15720
 tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt 15780
 taccocaaatc tagttcttga gaggatgaag catcacccaa cagttctgca actatccctc 15840
 aaaagcttta aatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaaaca 15900
 tattatctat actaacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat 15960
 gattcctatt aactacaagc cttggtggog gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca 16020
 gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtogaac gggcagaatc agtatcttcc 16080
 ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttggccac 16140
 cattcaattc tgtcttgctt ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggtg agagaataaa 16200
 aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgtcatt 16260
 gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata 16320
 tgtattggct gcatttgcatt gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag 16380
 cccatgcaaa gttaacactc acgaccccat tcctcagtct ccactatata aaccaccat 16440
 cccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaaactcac tctcacacct taagaacca 16500
 atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaac aacattacaa 16560
 ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa 16620
 cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg 16680

ES 2 636 487 T3

aaacgtgttc tctgttctctg atttcacccat caaggacatc ottggageta tccctcatga 16740
 gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat 16800
 gcttaccacc ggatacctta cccataagat cctttaccct ctcctcatct cttacacctc 16860
 taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cctttacact tacgttcaag gacttttcgg 16920
 aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat 16980
 cgtgaacgat ttcgttggat ggacccttca ctcttacctt atggttcctt acttcagctg 17040
 gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt 17100
 cgttctgccc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcgta acctcgtga 17160
 gtactctgag gattotccac ttagaacctt ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg 17220
 atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg 17280
 gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat 17340
 cttcctttct gatcttggaa tctcacccta gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa 17400
 attcggagga tggtcctttt tcatcaactg gttcgttctt tacatctggg ttaaccactg 17460
 gctcgttttc atcacattcc ttcagcacac tgatcctact atgcctcatt acaacgctga 17520
 ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagttcg gattcatcgg 17580
 acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat 17640
 cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagttatgg gaaagcacta 17700
 caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaaata 17760
 cgttgacggg gataacgggt ttctcatggt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc 17820
 tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt 17880
 taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg 17940
 taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagggc 18000
 tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg 18060
 gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta 18120
 ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga 18180
 tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggcca 18240
 gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca 18300
 atctaaacaa gtcgctaggg accttcggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca 18360
 gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtgtt gatcgtatgag atcgtataaa 18420
 gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata 18480
 aaaagagaga gaggtgatg gaatgttatg tatgtatggt tcttggtttt taaaattaaa 18540

ES 2 636 487 T3

tggaagcac	atgctcgtgt	gggttctatc	tcgattaaaa	atcccaatta	tatttggctct	18600
aathtagttt	ggtattgagt	aaaacaaatt	cgaaccaaac	caaaatataa	atatatagtt	18660
tttatatata	tgcccttaag	actttttata	gaattttctt	taaaaaatat	ctagaaatat	18720
ttgogactct	tctggcatgt	aatatttctg	taaatatgaa	gtgctccatt	tttattaact	18780
ttaaataatt	ggttgtacga	tcactttctt	atcaagtgtt	actaaaatgc	gtcaatctct	18840
ttgttcttcc	atattcatat	gtcaaaatct	atcaaaattc	ttatatatct	ttttcgaatt	18900
tgaagtgaaa	tttcgataat	ttaaaattaa	atagaacata	tcattattta	ggtatcatat	18960
tgatTTTTAT	acttaattac	taaatttgg	taactttgaa	agtgtacatc	aacgaaaaat	19020
tagtcaaacg	actaaaataa	ataaatatca	tgtgttatta	agaaaattct	cctataagaa	19080
tattttaata	gatcatatgt	ttgtaaaaaa	aattaatttt	tactaacaca	tatatattact	19140
tatcaaaaat	ttgacaaagt	aagattaaaa	taatattcat	ctaacaaaaa	aaaaaccaga	19200
aaatgctgaa	aaccggcaa	aaccgaacca	atccaaaccg	atatagttgg	tttggtttga	19260
ttttgatata	aaccgaacca	actcgggtcca	tttgcacccc	taatcataat	agctttaata	19320
tttcaagata	ttattaagtt	aacgttgtca	atatacctgga	aattttgcaa	aatgaatcaa	19380
gcctatatgg	ctgtaatatg	aatttaaaag	cagctcgtatg	tggtggtaat	atgtaattta	19440
cttgattcta	aaaaaatatc	ccaagtatta	ataatttctg	ctaggaagaa	ggttagctac	19500
gatttacagc	aaagccagaa	tacaaagaac	cataaagtga	ttgaagctcg	aaatatacga	19560
aggaacaaat	atTTTTAAAA	aaatacgcga	tgactttgaa	caaaagaaag	tgatatattt	19620
tttgttctta	aacaagcatc	ccctctaaag	aatggcagtt	ttcctttgca	tgtaactatt	19680
atgctccctt	cgttacaaaa	atTTTGGACT	actattggga	acttcttctg	aaaatagtcc	19740
tgcaaggctag	tagattgggt	ggttggtttc	catgtaccag	aaggcttacc	ctattagttg	19800
aaagtTgaaa	ctttgttccc	tactcaattc	ctagttgtgt	aatgtatgt	atatgtaatg	19860
tgtataaaac	gtagtactta	aatgactag	agtggttctt	gagaccgatg	agagatggga	19920
gcagaactaa	agatgatgac	ataattaaga	acgaatttga	aaggctctta	ggtttgaatc	19980
ctattcgaga	atgtTTTTGT	caaagatagt	ggcgattttg	aaccaaagaa	aacatttaaa	20040
aaatcagtat	cgggttacgt	tcatgcaaat	agaaagtgg	ctaggatctg	attgtaattt	20100
tagacttaaa	gagtctctta	agattcaatc	ctggctgtgt	acaaaactac	aaataatata	20160
ttttagacta	tttggcctta	actaaacttc	cactcattat	ttactgaggt	tagagaatag	20220
acttgcgaa	aaacacattc	ccgagaaata	ctcatgatcc	cataattagt	cagagggtat	20280
gccaatcaga	tctaagaaca	cacattccct	caaattttaa	tgcacatgta	atcatagttt	20340
agcacaattc	aaaaataatg	tagtattaaa	gacagaaatt	tgtagacttt	tttttggcgt	20400
taaaagaaga	ctaagtttat	acgtacattt	tattttaagt	ggaaaaccga	aattttccat	20460

ES 2 636 487 T3

cgaaatatat gaatttagta tatatatattc tgcaatgtac tatttttgcta ttttggcaac 20520
 tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 20580
 gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat 20640
 ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 20700
 acaacaaaca acaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct 20760
 caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 20820
 gctatcttct ctgctaccga ctctattgga tggggactca agcctatctc ttctgctact 20880
 aaggatctcc ctctcgttga atctcctacc cctcttatcc tttctctcct cgottacttc 20940
 gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag 21000
 gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gtcacaaacg ttttccttat cggactcagc 21060
 ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttaoctga acaagtactc cttctgggga 21120
 aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaagggtga tctggatctt ctacgtgtcc 21180
 aagatctacg agttcatgga caccttcac c atgcttctca agggaaacgt taaccagggt 21240
 tccttctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctgggtggat gatcacttat 21300
 gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc 21360
 atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag 21420
 tacctttggt ggggaagata ccttaccocag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt 21480
 ctccaggctg tttacctoct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgetcaactc 21540
 ctogttgttt acatggttac cctcctcatg cttttoggaa acttctacta catgaagcac 21600
 caogcttcta agtgataaagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtaata 21660
 agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct 21720
 ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat 21780
 aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtaa tttaaagata taagattctt taaatgatta 21840
 aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg 21900
 attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcag 21960
 gcggccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgcgta 22020
 aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc 22080
 gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 22140
 gaagacaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccgaaa cctcctcgg 22200
 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 22260
 taaaaatgcc atcattgcga taaaggaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 22320

ES 2 636 487 T3

ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 22380
 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa 22440
 tccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga 22500
 acacggggga ctgaattaaa tatgagcoct gagaggcgtc ctggtgaaat cagacctgct 22560
 actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatoga gacttctacc 22620
 gttaacttca gaactgagcc tcaaaactct caagagtgga tcgatgatct tgagagactc 22680
 caagatagat acccttggct tgttgctgag gttgagggtg ttggtgctgg aatcgcttac 22740
 gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacggt 22800
 tcacacagac atcagagact tggacttga tctacccttt aactcacct tctcaagtct 22860
 atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatog gactcoctaa cgatcctct 22920
 gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagago tgctggatac 22980
 aagcacggtg gatggcatga tgttgattc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct 23040
 cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc 23100
 aataaagttt cttaagattg aatcctgttg cgggtcttgc gatgattatc atataatttc 23160
 tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgta tttatgagat 23220
 gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 23280
 agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta gatcactagt 23340
 gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 23400
 ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc 23460
 gaccggcagc toggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc 23512

<210> 3
 <211> 25787
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia nucleotídica pGA7- mod_C

10

<400> 3

tcctgtgggt ggcattgcaca taaaaatgga cgaacggata aaccttttca cgcctttta 60
 aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccggcca atatatcctg 120
 tcaaactctg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
 tcacgacggt gtaaacggg cgcctcgatc tagtaacata gatgacacog cgcgcgataa 240
 tttatcctag tttgcgcgct atatcttgtt ttctatcgcg tattaatgt ataattggg 300
 gactctaatc ataaaaacc atctcataaa taacgtcatg cattacatgt taattattac 360
 gtgcttaacg taattcaaca gaaattatat gataatcacc gcaagaccgg caacaggatt 420

ES 2 636 487 T3

caatcttaag aaactttatt gccaaatggt tgaacgatct gcccggaagc ggccaactcg 480
 aaaatttaat taatcatcag tgagccttct cagcctttcc gttaacgtag tagtgctgtc 540
 caactttgtc gaggttgctg aaagtagcct tccaagcacc gtagtaagag agcaccttgt 600
 agttgagtcc ccacttctta gcgaaagggg cgaatcttct tgacacctca ggctgtctga 660
 attgagcat atcaggggaag agatggtgga taacctggca gttaaggat ccataagcc 720
 agttaacgta tccacgagaa ggatcgatgt caacggtgtg atcaacagcg tagttaacc 780
 agctaagggtg cttgtcagat ggaacaacag ggaggtgagt gtgagaagta gagaagtgag 840
 cgaagaggta catgtaagcg atccagttc cgaagtgaa ccaccagtaa gcaacaggcc 900
 aagagtatcc ggtagcaagc ttgataacag cggttctaac aacgtgagaa acgagcatcc 960
 aagaagcttc ctctagttc ttcttctga gcacctgtct aggatggaga acgtagatcc 1020
 agaaagcctg aacgagaagt ccagaagtaa caggaacgaa ggtccaagct tgaagtctag 1080
 cccaagctct agagaatccc ctaggctat tatcctccac agcgggtgtg aagaaagcca 1140
 cagcaggagt ggtatcaaga tccatgtcgt gtctaacttt ctgaggggta gcatggtgct 1200
 tgttatgcat ctggttccac atctctccgc tggtagaaag tccgaatccg caagtcatag 1260
 cctgaagtct cttatccacg tacacagatc cggtaaagaga gttgtgtcca ccctcatggt 1320
 gaaccatcc acatctagct ccgaagaaag caccgtacac aacgctagca atgatagggt 1380
 atccagcgta cataagagcg gttccaagag cgaagtagc aagaagctcc aaaagacggt 1440
 aagcaacatg ggtgatagaa ggcttgaaga atccgtccct ctcaagttca gctctccacc 1500
 tagcgaatc ctcaagcata ggagcatcct cagactcaga tctcttgatc tcagcaggtc 1560
 tagaaggcaa agctctaagc atcttccaag ccttgaggct acgcatgtga aattctttga 1620
 aagcctcagt agcatcagca ccagtgttag caagcatgta gaagatcacg cttccaccag 1680
 gatgtttga gttggtcacg tcgtactcaa catcctcaac cctaaccat ctagtctcga 1740
 aggtagcagc aagttcatga ggtcaaggg tcttaagatc aacaggagcg gtagaagcat 1800
 ccttagcatc aagagcctca gcagatgact tagacctggt gagaggagat ctaggagaag 1860
 atcttccatc ggtcttagga ggacacatgg cgcgccgatt ttcgagatgg taattgtaaa 1920
 tgtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa attcaggttg 1980
 gccgcttccg gggatcctcg tgtatgtttt taatcttgtt tgtatcgatg agttttggtt 2040
 tgagtaaaga gtgaagcgga tgagttaatt tataggctat aaaggagatt tgcattggca 2100
 tcacgtgtaa taatgcatgc acgcatgtga ttgtatgtgt gtgctgtgag agagaagctc 2160
 ttaggtgttt gaagggagtg acaagtggcg aaaaaaaca attctccgcg gctgcatgct 2220
 atgtgtaacg tgtagctaat gttctggcat ggcatttat gaacgattct ttttaaaaac 2280

ES 2 636 487 T3

aaggtaaaaa cttaacttca taaaattaaa aaaaaaaacg ttactaagt tggtttaaaa 2340
ggggatgaga ggcgccccgc ggaaagcttg ctagccaatt ggggcccaac gttctcgagt 2400
ttttctagaa ggaaactgaa ggcgggaaac gacaatctgc tagtggatct cccagtcacg 2460
acgttgtaaa acgggcgccc cgcggaagc ttgcggccgc ggtaccgccc gttcgactca 2520
gatcttccaa ggctctgtct ccgagtcgct tgcttctcgc cgcgccgac acttctccgc 2580
cgccaacaag gcttgtagtt aataggaatc attcagggat tgtgattccg ggcagtagta 2640
attaataata tagtattagt atagataata tgtttcgttt gggatctttg gaacgttgct 2700
ctgttccttg ttgttcattt taaagctttt gagggatagt tgcagaactg ttcggtagt 2760
cttcactctc tcaagaacta gatttgggta aagaaacatc catgcatgga tatggaatgt 2820
tgttcttccg attggagatt attttataaa atttaaaatt catgatttaa aaaaacacat 2880
aaaaaccaca aaatcatga tttattgaca atacgatata aaattagcac caccggctac 2940
tggctcatta cacatttccc cttcccctca ttctcacttt gtggctttat tattattatt 3000
attacatata ttttaccggt attatttcac gtcacataag cttgttaatt aatcattagt 3060
gagccttctc agcctttccg ttaacgtagt agtgctgtcc caccttatca aggttagaga 3120
aagtagcctt ccaagcaccg tagtaagaga gcaccttgta gttgagtccc cacttcttag 3180
cgaaaggaac gaatcttctg ctaacctcag gctgtctgaa ttgaggcata tcagggaaga 3240
ggtggtggat aacctgacag ttaaggtatc ccataagcca gttcacgtat cctctagaag 3300
gatcgatatc aacggtgtga tcaacagcgt agttaaccca agaaagggtc ttatcagatg 3360
gaacaacagg gaggtgagta tgagaagtag agaagtgagc gaaaagggtac atgtaagcga 3420
tccagtttcc gaaagtgaac caccagtaag caacaggcca agagtatcca gtagcaagct 3480
tgataacagc ggttctaaca acatgagaaa cgagcatcca agaagcctct tctagattct 3540
tcttacggag aacttgtcta ggggtggagaa cgtagatcca gaaagcttga acaagaagtc 3600
cagaggtaac aggaacgaaa gtccaagctt gaagtctagc ccaagctcta gagaatctc 3660
taggtctgtt atctcaaca gcagtgttga agaaagccac agcaggagtg gtatcaagat 3720
ccatctctg tctaacctt tgaggggtag catggtgctt gttatgcatc tggttccaca 3780
tctcaccaga agtagaaagt ccgaatccac aagtcatagc ctgaagtctc ttgtccacgt 3840
aaacagatcc ggtaagagag ttatgtccac cctcatgttg aaccoatcca catctagctc 3900
cgaagaaagc accgtaaaca acagaagcaa tgatagggtg tccagcgtac ataagagcag 3960
ttccaagagc gaatgtagca agaagctcga gaagtctgta agccacatgg gtgatagaag 4020
gcttgaagaa tccatctctc tcaagctcag cacgccatct agcgaatcc tcaagcatag 4080
gagcatctc agactcagat ctcttgatct cagcaggctc agaaggcaaa gctctaagca 4140
tcttccaagc cttgagagaa cgcatgtgga attctttgaa agcctcagta gcacagcac 4200

ES 2 636 487 T3

cagtgttagc aagcatgtag aagatcacag atccaccagg gtgcttgaag ttagtcacat 4260
 cgtactcaac gtcctcaact ctaaccocatc tagtctcgaa agtagcagca agctcatgag 4320
 gctcaagagt cttaagatca acaggagcag tagaagcatc cttagcatca agagcctcag 4380
 cagaagattt agacctggta agtggagatc taggagaaga tcttccatca gtcttaggag 4440
 ggcacatggt atggtaattg taaatgtaat tgtaatggtg tttgttgttt gttgttggtg 4500
 gtaattggtg taaaattaat taagtgggta tcttttggtg ggataagcaa gtagtgatga 4560
 tgttctaggt gaagtgatgg ggggtgttta tagcgggaga tggtgaaatg gatggctgcc 4620
 acataagaaa tggaggggaa gggttcttgc gccattcttc agtttgcatg gatgcatggg 4680
 tttcattttg taacacgtaa taaggacaat gaagtgcagg tgtctctcaa gtttcagagg 4740
 ggatatgtgg acagaagaag aacggcgatg atattgatgg aaatggccat ctagtgtgaa 4800
 tctattcggg tgataaact agtgcatttt ggcggttaat cccttcaatt aactgcacaa 4860
 acttcagttg agtattgatt atttgattat aggttctgta aacacaatac caagtttatt 4920
 tagaggggag acatacaaat agtttcgata taaataatag agtgggttaa cttagttatt 4980
 aaaactatat ataaagtcta aaagttaaat tattttttta attgcaaata tataaagtct 5040
 aaaggggtta cattatttct taagagatgt aactctggtg gaatctgact taatccgtct 5100
 catcaactctg gtttccagtt ctaatcta at gaattgtttt ctgccaaaga atttgaagca 5160
 agaagtaaat tgatcaatgc cgtcaacca caccaaaccg tcaaccact accatcgccg 5220
 cggagacccc caaactcaac ctccaccat cggtagaag cacagggcag cccgcaccac 5280
 caccaatttg gcgtgcatga cacctagga cttggcacgg gagggggcgc acgtggatgc 5340
 aaatgacggg atatcagatg acaggaaacg acgttgagag accatacgat gtagaatatg 5400
 agctcaccat caacgagaaa ctaggaaaat cacaaaaaaa acaactctcg taattgtacg 5460
 agtggcacag atgggtctgc ctcaacatat ctctaatacg gcgaagcctg cccaacacgt 5520
 agttgcogga atccggtgtg gagctcacga ctctgaaaga taggcgcttc ctgtttcgtt 5580
 tcgctcacc actggacgtc cgtcatgtga tggatttcgg tcattggttt gctgacaacc 5640
 acattctgaa gctccatgag atgagtcttc acaataggtc ctgctcaata ccgtggagtt 5700
 atggttgcaa gtccataact tgccgttcga atattttgcg gagccagtcg gacgggaatt 5760
 ggcgagctcg gctgacacct ataaaggcca tgacaagaag aaccaaaagt tcttccctaa 5820
 tgctttcatg aggcttcggg tcgttatgga tgtcggaaaa cccctcttga aggaacgaga 5880
 cgttattatg catgacggta agactattac ttgtcagtat aagtatgaaa gattacctgt 5940
 cttctgcttt gtttgtggat tgattggaca cgttgaaaaa aaatgtgcac ttcgatttca 6000
 atactcagag atcgacttcc cttttctcta ggagtattcg atcaaggcat taacatggaa 6060

ES 2 636 487 T3

ggaagctcaa gctctaaagg cttcacaatg gaacctgaaa aatttcaaca agcctaaact 6120
 gaaatcgaag tcaaatcacc caaccgggag ctctaaatca gcaaactc ctcccccaca 6180
 gtatccaatc atcgtgcacg atgctccagc tattgcaagc caggtattgc aagctaggag 6240
 taggatagag accttaaacg tcggttggtg gaagagtcac cttcagacct aatggagata 6300
 gatgtagacg gcggcacgaa gactctgaaa caccagaaag gctagtccag gataaggatc 6360
 tgctatccca actgacctct cgttagtccc aaggcctctc aactagagca ggaggaagga 6420
 tggtcacaag actaggataa tgatgtttcc aatatgaacc tgaatgtcca tagctaattt 6480
 ttttagtctt gcttctgcac tttttgttta ttatgttctg gtgactatgt tatttacct 6540
 tgtccgtatg cttgagggta ccctagtaga ttggttggtt ggtttccatg taccagaagg 6600
 cttacctat tagttgaaag ttgaaacttt gttccctact caattcctag ttgtgtaaat 6660
 gtatgtatat gtaatgtgta taaaacgtag tacttaaatg actaggagtg gttcttgaga 6720
 ccgatgagag atgggagcag aactaaagat gatgacataa ttaagaacga atttgaaagg 6780
 ctcttaggtt tgaatcctat tcgagaatgt ttttgtaaaa gatagtggcg attttgaacc 6840
 aaagaaaaca tttaaaaaat cagtatccgg ttacgttcat gcaaatagaa agtggctctag 6900
 gatctgattg taattttaga cttaaagagt ctcttaagat tcaatcctgg ctgtgtacaa 6960
 aactacaaat aatatatttt agactatttg gccttaacta aacttccact cattatttac 7020
 tgaggttaga gaatagactt gcgaataaac acattcccga gaaatactca tgatcccata 7080
 attagtccga gggtagcaca atcagatcta agaacacaca ttccctcaaa ttttaatgca 7140
 catgtaatca tagtttagca caattcaaaa ataatgtagt attaaagaca gaaatttgta 7200
 gacttttttt tggcggttaa agaagactaa gtttatacgt acattttatt ttaagtggaa 7260
 aaccgaaatt ttccatcgaa atatatgaat ttagtatata tatttctgca atgtactatt 7320
 ttgctatatt ggcaactttc agtggactac tactttatta caatgtgtat ggatgcatga 7380
 gtttgagtat acacatgtct aaatgcatgc tttgtaaaac gtaacggacc acaaaagagg 7440
 atccatacaa atacatctca tagcttctc cattattttc cgacacaaac agagcatttt 7500
 acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt acaattacca 7560
 taccatggcc tctatcgcta tccctgctgc tcttgctgga actcttgat acgttaccta 7620
 caatgtggct aaccctgata tcccagcttc tgagaaagtt cctgcttact tcatgcaggt 7680
 tgagtactgg ggacctacta tcggaactat tggatacctc ctcttcatct acttcggaaa 7740
 gcgtatcatg cagaacagat ctcaaccttt cggactcaag aacgctatgc tcgtttacaa 7800
 cttctaccag accttcttca acagctactg catctacctt ttctgtactt ctcatagggc 7860
 tcagggactt aaggtttggg gaaacatccc tgatagact gctaactctt ggggaatctc 7920
 tcaggttacc tggcttctact acaacaacaa gtacgttgag cttctcgaca cttcttcat 7980

ES 2 636 487 T3

ggtgatgagg aagaagttcg accagctttc tttccttcac atctaccacc acactcttct 8040
 catctggtea tggttcgttg ttatgaagct tgagcctggt ggagattgct acttcggatc 8100
 ttctgttaac accttcgtgc acgtgatcat gtactcttac tacggacttg ctgctcttgg 8160
 agttaactgt ttctggaaga agtacatcac ccagatccag atgcttcagt tctgtatctg 8220
 tgcttctcac tctatctaca ccgcttacgt tcagaatacc gctttctggc ttccttacct 8280
 tcaactctgg gttatggtga acatggtcgt tctcttcgcc aacttctacc gtaagaggta 8340
 caagtctaag ggtgctaaga agcagtgata aggcgcgcgg cgcgcggggc cgccgccatg 8400
 tgacagatcg aaggaagaaa gtgtaataag acgactctca ctactcgatc gctagtgatt 8460
 gtcattgtta tatataataa tgttatcttt cacaacttat cgtaatgcat gtgaaactat 8520
 aacacattaa tcctacttgt catatgataa cactctcccc atttaaaact cttgtcaatt 8580
 taaagatata agattcttta aatgattaaa aaaaatatat tataaattca atcactccta 8640
 ctaataaatt attaattatt atttattgat taaaaaata cttatactaa tttagtctga 8700
 atagaataat tagattctag tctcatcccc ttttaaacca acttagtaaa cgtttttttt 8760
 ttttaatttta tgaagttaag tttttacctt gtttttaaaa agaatcgttc ataagatgcc 8820
 atgccagaac attagctaca cgttacacat agcatgcagc cgcggagaat tgtttttctt 8880
 cgccaactgt cactcccttc aaacaccta gagcttctct ctcacagcac acacatacaa 8940
 tcacatgcgt gcatgcatta ttacacgtga togccatgca aatctccttt atagcctata 9000
 aattaactca tccgcttcac tctttactca aacccaaaact catcgataca aacaagatta 9060
 aaaacataca cgaggatctt ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt 9120
 acaattacat ttacaattac cataccatgc ctccaagga ctcttactct tatgctgctc 9180
 ctcttctgc tcaacttcac gaagttgata ctctcaaga gcacgacaag aaagagcttg 9240
 ttatcggaga tagggcttac gatgttacca acttcgtaa gagacacct ggtggaaaga 9300
 tcattgctta ccaagttgga actgatgcta ccgatgctta caagcagttc catgtagat 9360
 ctgetaaggc tgacaagatg ctttaagtctc ttccttctcg tctgttcac aagggatact 9420
 ctccaagaag ggctgatctt atcgctgatt tccaagagtt caccaagcaa cttgaggctg 9480
 agggaatggt cgagccttct cttcctcatg ttgcttacag acttgcagag gttatcgcta 9540
 tgcattgtgc tgggtgctgct cttatctggc atggatacac tttcgtgga atcgctatgc 9600
 ttggagttgt tcaggaaga tgtggatggc ttatgcatga ggtggacat tactctctca 9660
 ctggaacat tgcttctgac agagctatcc aagttgcttg ttacggactt ggatgtggaa 9720
 tgtctggtgc ttggtggcgt aaccagcata acaagcacca tgctactcct caaaagcttc 9780
 agcacgatgt tgatcttgat acccttctc tcggttcttt ccatgagaga atcgctgcta 9840

ES 2 636 487 T3

aggttaagtc tcctgctatg aaggcttggc tttctatgca agctaagctt ttcgctcctg 9900
 ttaccactct tcttggtgct cttggatggc agctttacct tcacccctaga cacatgctca 9960
 ggactaagca ctacgatgag cttgctatgc tcggaatcag atacggactt gttggatacc 10020
 ttgctgctaa ctacgggtgct ggatacgttc tcgcttgcta ccttctttac gttcagcttg 10080
 gagctatgta catcttctgc aacttcgctg tttctcatac tcacctccct gttggtgagc 10140
 ctaacgagca tgctacttgg gttgagtacg ctgctaacca cactactaac tgttctccat 10200
 cttggtggtg tgattgggtg atgtcttacc ttaactacca gatcgagcac cacctttacc 10260
 cttctatgoc tcaattcaga caccctaaga tcgctcctag agttaagcag cttttcgaga 10320
 agcacggact tcactacgat gttagaggat acttcgaggc tatggctgat actttcgcta 10380
 accttgataa cgttgcccat gctcctgaga agaaaatgca gtaatgagat cgttcaaaaa 10440
 tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctggtgcccg tcttgcgatg attatcatat 10500
 aatttctggt gaattacggt aagcacgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta 10560
 tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaa 10620
 aatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggg gtcactctatg ttactagatc 10680
 ggtcgattaa aaatcccaat tatatttggg ctaatttagt ttggtattga gtaaaaacaa 10740
 ttcgaaccaa accaaaaat ataatatag tttttatata tatgccttta agacttttta 10800
 tagaattttc tttaaaaaat atctagaat atttgcgact cttctggcat gtaatatttc 10860
 gttaaatatg aagtgtcca tttttattaa ctttaataa ttggtgtac gatcactttc 10920
 ttatcaagtg ttactaaaat gcgtcaatct ctttgttctt ccatattcat atgtcaaaat 10980
 ctatcaaaat tcttatatat ctttttcgaa tttgaagtga aatttcgata atttaaaat 11040
 aatagaaca tatcattatt taggtatcat attgatTTTT atacttaatt actaaatttg 11100
 gttactttg aaagtgtaca tcaacgaaaa attagtcaa cgactaaaat aaataaatat 11160
 catgtgttat taagaaaatt ctctataag aatatttta tagatcatat gtttgtaaaa 11220
 aaaattaatt tttactaaca catatattta cttatcaaaa atttgacaaa gtaagattaa 11280
 aataatattc atctaacaaa aaaaaacca gaaaatgctg aaaaccggc aaaaccgaac 11340
 caatccaaac cgatatagtt ggtttggtt gattttgata taaaccgaac caactoggtc 11400
 catttgcacc cctaatacata atagctttaa tatttcaaga tattattaag ttaacgttgt 11460
 caatatcctg gaaattttgc aaaatgaatc aagcctatat ggctgtaata tgaatttaa 11520
 agcagctoga tgtggtggtg atatgtaatt tacttgattc taaaaaata tcccaagtat 11580
 taataatttc tgctaggaag aaggttagct acgatttaca gcaaagccag aatacaaaaga 11640
 accataaagt gattgaagct cgaatatata gaaggaacaa atatttttaa aaaaatcgc 11700
 aatgacttgg aacaaaagaa agtgatatat ttttgttct taaacaagca tcccctctaa 11760

ES 2 636 487 T3

agaatggcag ttttcctttg catgtaacta ttatgctccc ttcgttacaa aaatthttgga 11820
 ctactattgg gaacttcttc tgaaaatagt gatagaacct acacgagcat gtgctttcca 11880
 ttttaatttta aaaaccaaga aacatacata cataacattc catcagcctc tctctctttt 11940
 tattacggtt aatgacttaa aacacatctt attatcccat ccttaacacc tagcagtgtc 12000
 tttatacgat ctcatcgatc accacttcaa aacctatgag actgctgctg cccttgagc 12060
 tggcatcggc taggctgggt gccgcactgt cccggaaggt ccctagcgac ttgtttagat 12120
 tgatgggacc acctctcaac ttctgctgc tgtccctgct gctggatgtc ctgcctcatc 12180
 tggccgattg cacgctccag tcccctgcat gtgcactcgc tctcaattg ctttaagatca 12240
 tcgcagcagc tategaagtg ctggtctgtg tgcctcctc cacggccttg gttgtagtag 12300
 tagctgccgc cggcctctg gactttttcc cacaggaacc gccgaataat tcgatagaac 12360
 cacacgagca tgtgctttca tttattttaa aaaccaagaa acatacataa catttcatca 12420
 gcctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctttatta 12480
 cagctgttac actaacttaa aacacattca tctcattatt attattatta tccatcctta 12540
 acacctagca gtgtctttgt acgatctcat aatcgatcac cccttcatca ggtatcctta 12600
 ggcttcactc caacgttgtt gcagttacgg aacatgtaca caccatcatg gttctcaacg 12660
 aactggcaag atctccaagt tttccaaagg ctaaccaca tgttctcctc ggtgtgtctg 12720
 tagtgctctc ccataacttt cttgatgcac tcggtagctt ctctagcatg gtagaatggg 12780
 atccttgaaa cgtagtgatg gagcacatga gtctcgatga tgtcatggaa gatgattccg 12840
 aggattccga actctctatc gatagtagca gcagcaccct tagcgaaagt ccactcttga 12900
 gcatcgtaat gaggcataga agaatcgggtg tgctgaagga aggtaacgaa aacaagccag 12960
 tggttaacaa ggatccaagg acagaacctat gtgatgaaag taggccagaa tccgaaaacc 13020
 ttgtaagcgg tgtaaacaga agtgagggtg gcaaggattc caagatcaga aagaacgatg 13080
 taccagtagt ccttcttctc gaaaacaggg ctagaaggcc agtagtgaga cttgaagaac 13140
 ttagaaacac cagggttaagg ttgtccagta gcgtagtag caaggtaaag agaaagtcct 13200
 ccaagctgtt ggaacaagag agcgaacaaca gagtagatag gagtttctc agcgatatcg 13260
 tgaaggctgg taacttgggtg cttctctttg aattcctcgg cgggtgaagg aacgaaaacc 13320
 atatctctgg tcatgtgtcc agtagcctta tgggtgcttag catgagagaa cttccagctg 13380
 aagtaaggaa ccataacaag agagtggaga acctatccaa cggtatcgtt aacctatccg 13440
 tagttagaga aagcagaatg tccacactca tgtccaagga tccagattcc gaatccgaaa 13500
 caagagatag agaacacgta agcagaccaa gcagcgaatc taaggaattc gtttagggaga 13560
 agagggatgt aggtaagtcc aacgtaagcg atagcagaga tagccacgat atctctcacc 13620

ES 2 636 487 T3

acgtaagaca tagacttcac gagagatctc tcgtaacagt gcttagggat agcgtcaagg 13680
 atatccttga tgggtgaatc tggcaccttg aaaacgtttc cgaaggtatc gatagcggtc 13740
 ttttgctgct tgaagatgc aacgtttcca gaacgcctaa cggctcttagt agatccotca 13800
 aggatctcag atccagacac ggtaacctta gacatgggat ggtaattgta aatgtaattg 13860
 taatgttgtt tgttgtttgt tgttgttggg aattgttgta aaatTTTTGG tggtgattgg 13920
 ttctttaagg tgtgagagt agttgtgagt tgtgtgggtg gtttgggtgag attggggatg 13980
 gtgggtttat atagtggaga ctgaggaatg gggtcgtgag tgttaacttt gcatgggcta 14040
 cacgtgggtt cttttgggct tacacgtagt attattcatg caaatgcagc caatacatat 14100
 acggtatTTT aataatgtgt ggaatacaa tatgccgagt atTTTactaa ttttggcaat 14160
 gacaagtga catttggatt atcttacttg gcctctcttg ctTTaatttg gattatTTT 14220
 attctcttac ctTggccgtt catattcaca tccctaaagg caagacagaa ttgaatggTg 14280
 gccaaaaatt aaaacgatgg atatgaccta catagtgtag gatcaattaa cgtcgaagga 14340
 aaatactgat tctctcaagc atacggacaa gggtaaataa catagtcacc agaacataat 14400
 aaacaaaaag tgcagaagca agactaaaa aattagctat ggacattcag gttcatattg 14460
 gaaacatcat tctctagtc ttgtgaccat ccttctctct gctctagttg agaggccttg 14520
 ggactaacga gaggtcagtt gggatagcag atccttatcc tggactagcc tttctggTgt 14580
 ttcagagtct tcgtgccgcc gtctacatct atctccatta ggtctgaaga tgactcttca 14640
 caccaacgac gTTtaaggTc tctatcttac tcttagcttg caatacctgg ctTgcaatac 14700
 ctggagcatc gtgcacgatg attggatact gtggaggagg agtgtttgct gatttagagc 14760
 tcccgttgg gtgatttgac ttogatttca gTTtagctt gttgaaattt ttcaggttcc 14820
 attgtgaagc ctTtagagct tgagcttctt tccatgTtaa tgccttgatc gaatactctt 14880
 agagaaaagg gaagtcgatc tctgagtatt gaaatogaag tgcacatttt ttttcaacgt 14940
 gtccaatcaa tccacaaaca aagcagaaga caggtaatct ttcatactta tactgacaag 15000
 taatagtctt accgtcatgc ataataacgt ctcttctctt caagaggggt tttccgacat 15060
 ccataacgac ccgaagcctc atgaaagcat tagggaagaa cttttggTtc ttcttgtcat 15120
 ggcttttata ggtgtcagcc gagctcgcca attcccgtcc gactggctcc gcaaaatatt 15180
 cgaacggcaa gttatggact tgcaaccata actccacggg attgagcagg acctattgtg 15240
 aagactcatc tcatggagct tcagaatgtg gttgtcagca aaccaatgac cgaaatccat 15300
 cacatgacgg acgtccagtg ggtgagcga aCGaaacagg aagcgcctat ctttcagagt 15360
 cgtgagctcc acaccggatt ccggcaacta cgtgttgggc aggettcgcc gtattagaga 15420
 tatgttgagg cagaccatc tgtgccactc gtacaattac gagagttgtt tttttgtga 15480
 ttttctagt ttctcgttga tggtgagctc atattctaca tcgtatggTc tctcaacgTc 15540

ES 2 636 487 T3

gtttcctgtc atctgatatc ccgtcatttg catccaogtg egccgcctcc cgtgccaaagt 15600
 ccctaggtgt catgcacgcc aaattggtgg tggcgogggc tgcctgtgc ttcttaccga 15660
 tgggtggagg ttgagtttg gggctccgc ggcgatggta gtgggttgac ggtttggtgt 15720
 gggttgaocg cattgatcaa ttacttctt gcttcaaatt ctttggcaga aaacaattca 15780
 ttagattaga actggaacc agagtgatga gacggattaa gtcagattcc aacagagtta 15840
 catctcttaa gaaataatgt aaccocctta gactttatat atttgcaatt aaaaaataa 15900
 tttaactttt agactttata tatagtttta ataactaagt ttaaccactc tattatttat 15960
 atcgaaacta tttgtatgtc tcccctctaa ataaacttgg tattgtgttt acagaacctc 16020
 taatcaaata atcaatactc aactgaagtt tgtgcagtta attgaaggga ttaacggcca 16080
 aatgcacta gtattatcaa ccgaatagat tcacactaga tggccatttc catcaatc 16140
 atcgccgttc ttcttctgtc cacatatccc ctctgaaact tgagagacac ctgcacttca 16200
 ttgtccttat tacgtgttac aaaatgaaac ccatgcatcc atgcaaactg aagaatggcg 16260
 caagaaccct tcccctccat ttcttatgtg gcgaccatcc atttcacat ctcccgctat 16320
 aaaacacccc catcacttca cctagaacat catcactact tgcttatcca tccaaaagat 16380
 acccactttt acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt 16440
 acaattacca taccatgcca cctagcgctg ctaagcaaat gggagcttct actggtgttc 16500
 atgctggtgt tactgactct totgctttca ccagaaagga tgttctgat agacctgatc 16560
 tcaccatcgt tggagattct gtttacgatg ctaaggcttt cagatctgag catcctggtg 16620
 gtgctcattt cgtttctttg ttcgaggaa gagatgctac tgaggctttc atggaatacc 16680
 atagaagggc ttggcctaag tctagaatgt ctagattcca cgttggatct cttgcttcta 16740
 ctgaggaacc tgttctgct gatgagggat accttcaact ttgtctagg atcgttaaga 16800
 tggcgcttc tgttcttct ggattcgctc ctgcttctta ctgggttaag gctggactta 16860
 tccttgatc tgctatcgt cttgaggctt acatgcttta cgctggaag agacttctcc 16920
 cttctatcgt tcttgatgg ctttctgctc ttatcggctc taacatccag catgatgcta 16980
 accatggtgc tttgtctaag tctgcttctg ttaaccttgc tcttgactt tgtcaggatt 17040
 ggatcgagg atctatgatc ctttggcttc aagagcatgt tgttatgcac cacctccaca 17100
 ctaacgatgt tgataaggat cctgatcaaa aggctcacgg tgctcttaga ctcaagccta 17160
 ctgatgcttg gtcacctatg cattggcttc agcatcttta ccttttgcct ggtgagacta 17220
 tgtacgcttt caagcttttg ttctcgaca tctctgagct tgttatgtgg cgttgggagg 17280
 gtgagcctat ctctaagctt gctggatacc tctttatgcc ttctttgctt ctcaagctta 17340
 ccttctgggc tagattcgtt gctttgcctc ttaaccttgc tccttctggt catactgctg 17400

ES 2 636 487 T3

tgtgtatcgc	tgctactggt	atgactggat	ctttctacct	cgctttcttc	ttcttcatct	17460
cccacaactt	cgaggggtgtt	gcttctgttg	gacctgatgg	atctatcact	tctatgacta	17520
gaggtgctag	cttccttaag	agacaagctg	agacttcttc	taacggtgga	ggacctcttc	17580
ttgtactctc	taacggtgga	ctcaactacc	aaattgagca	tcaacttggtc	cctagagttc	17640
accatggatt	ctaccctaga	cttgctcctc	ttgttaaggc	tgagcttgag	gctagaggaa	17700
tcgagtacaa	gcactaccct	actatctggg	ctaaccctgc	ttctaccctc	agacatatgt	17760
acgctcttgg	aagaaggcct	agatctaagg	ctgagtaatg	acaagcttat	gtgacgtgaa	17820
ataataacgg	taaaatatat	gtaataataa	taataataaa	gccacaaagt	gagaatgagg	17880
ggaaggggaa	atgtgtaatg	agccagtagc	cggtgggtgct	aattttgtat	cgtattgtca	17940
ataaatcatg	aattttgtgg	tttttatgtg	tttttttaa	tcatgaattt	taaattttat	18000
aaaataatct	ccaatcggaa	gaacaacatt	ccatatccat	gcatggatgt	ttctttacc	18060
aaatctagtt	cttgagagga	tgaagcatca	ccgaacagtt	ctgcaactat	ccctcaaaag	18120
ctttaaaatg	aacaacaagg	aacagagcaa	cgttccaaag	atcccaaacg	aaacatatta	18180
tctatactaa	tactatatta	ttaattacta	ctgccgggaa	tcacaatccc	tgaatgattc	18240
ctattaacta	caagccttgt	tggcggcgga	gaagtgatcg	gcgcggcgag	aagcagcgga	18300
ctcggagacg	aggccttgga	agatctgagt	cgaacgggca	gaatcagtat	ttccttctga	18360
cgttaattga	tctacacta	tgtaggtcat	atccatcggt	ttaatttttg	gccaccattc	18420
aattctgtct	tgcccttagg	gatgtgaata	tgaacggcca	aggtaagaga	ataaaaaata	18480
tccaaattaa	agcaagagag	gccaagtaag	ataatccaaa	tgtacacttg	tcattgccaa	18540
aattagtaaa	atactcggca	tattgtattc	ccacacatta	ttaaaatacc	gtatatgtat	18600
tggctgcatt	tgcatgaata	atactacgtg	taagcccaaa	agaaccacg	tgtagcccat	18660
gcaaagttaa	cactcaccgac	ccattcctc	agtctccact	atataaacc	accatcccca	18720
atctocccaa	accaccaca	caactcaca	ctcactctca	caccttaaag	aaccaatcac	18780
caccaaaaat	tttacaacaa	ttaccaacaa	caacaacaa	caaacaacat	tacaattaca	18840
tttacaatta	ccataccatg	agcgtgtgta	ccgttactgg	atctgatcct	aagaacagag	18900
gatcttctag	caacaccgag	caagaggttc	caaaagttgc	tatcgatacc	aacggaaacg	18960
tgttctctgt	tcttgatttc	accatcaagg	acatccttgg	agctatccct	catgagtgtt	19020
acgagagaag	attggctacc	tctctctact	acgtgttcag	agatatcttc	tgcatgctta	19080
ccaccggata	ccttaccat	aagatccttt	accctctcct	catctcttac	acctctaaca	19140
gcatcatcaa	gttcactttc	tgggcccctt	acacttacgt	tcaaggactt	ttcggaaccg	19200
gaatctgggt	tctcgtcat	gagtgtggac	atcaagcttt	ctctgattac	ggaatcgtga	19260
acgatttcgt	tggatggacc	cttcaactct	accttatggg	tccttacttc	agctggaagt	19320

ES 2 636 487 T3

actctcatgg aaagcaccat aaggctactg gacacatgac cagagatatg gttttcgttc 19380
ctgccaccaa agaggaattc aagaagtcta ggaacttctt cggtaacctc gctgagtact 19440
ctgaggatgc tccacttaga accctttacg agcttcttgt tcaacaactt ggaggatgga 19500
tcgcttacct ctctgttaac gttacaggac aaccttaccg tgatgttctt tcttggaat 19560
ggaaccactt ctggcttacc tctocacttt tcgagcaaag agatgctctc tacatcttcc 19620
tttctgatct tggaatcctc acccagggaa tcgttcttac tctttgttac aagaaattcg 19680
gaggatggtc ccttttcatc aactggttcg ttccttacat ctgggttaac cactggctcg 19740
ttttcatcac attccttcag cacactgatc ctactatgcc tcattacaac gctgaggaat 19800
ggactttcgc taaggggtgct gctgctacta tcgatagaaa gttcggattc atcggacctc 19860
acatcttcca tgatatcctc gagactcatg tgcttcacca ctactgttct aggatcccat 19920
tctacaacgc tagacctgct tctgaggcta tcaagaaagt tatgggaaag cactacaggt 19980
ctagcgacga gaacatgtgg aagtcacttt ggaagtcttt caggtcttgc caatacgttg 20040
acgggtgataa cgggtgttctc atgttccgta acatcaacaa ctgcggagtt ggagctgctg 20100
agaagtaatg aaggggtgat cgattatgag atcgtacaaa gacactgcta ggtgttaagg 20160
atggataata ataataataa tgagatgaat gtgttttaag ttagtgtaac agctgtaata 20220
aagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaggctgatg 20280
aatgttatg tatgtttctt ggtttttaa ataaatgaaa gcacatgctc gtgtggttct 20340
atcgaattat tcggcgggtc ctgtgggaaa aagtccagaa gggccgcgcg agctactact 20400
acaaccaagg ccgtggagga gggcaacaga gccagcactt cgatagctgc tgcgatgatc 20460
ttaagcaatt gaggagcgag tgcacatgca ggggactgga gcgtgcaatc ggcagatga 20520
ggcaggacat ccagcagcag ggacagcagc aggaagtga gaggtggtcc catcaatcta 20580
aacaagtcgc tagggacctt ccgggacagt ggggcaccca gcctagccga tgccagctcc 20640
aggggcagca gcagtctgca tggttttgaa gtggtgatcg atgagatcgt ataaagacac 20700
tgctaggtgt taaggatggg ataataagat gtgttttaag tcattaaccg taataaaaag 20760
agagagaggc tgatggaatg ttatgtatgt atgtttcttg gtttttaaaa ttaaatggaa 20820
agcacatgct cgtgtgggtt ctatctcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt 20880
agtttggtat tgagtaaac aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat 20940
atatatgcct ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg 21000
actcttctgg catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaa 21060
taattggttg tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt 21120
cttccatatt catatgtcaa aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag 21180

ES 2 636 487 T3

tgaaatttcg ataattttaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt 21240
 tttatactta attactaaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc 21300
 aaacgactaa aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt 21360
 taatagatca tatgtttgta aaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca 21420
 aaaatttgac aaagtaagat taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg 21480
 ctgaaaaccg ggcaaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttg tttgattttg 21540
 atataaaccg aaccaactcg gtccatttgc acccctaate ataatagctt taatattttca 21600
 agatattatt aagttaacgt tgtcaatate ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta 21660
 tatggctgta atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga 21720
 ttctaaaaaa atatcccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggta gctacgattt 21780
 acagcaaagc cagaatacaa agaaccataa agtgattgaa gctcgaataa tacgaaggaa 21840
 caaatatttt taaaaaata cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tattttttgt 21900
 tcttaaaaaa gcatccctc taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct 21960
 cccttcgta caaaaatttt ggactactat tgggaacttc ttctgaaat agtctgcag 22020
 gctagtagat tggttggtg gtttccatgt accagaaggc ttaccctatt agttgaaagt 22080
 tgaaactttg ttccctactc aattcctagt tgtgtaaatg tatgtatatg taatgtgat 22140
 aaaaactagt acttaaatga ctaggagtgg ttcttgagac cgatgagaga tgggagcaga 22200
 actaaagatg atgacataat taagaacgaa tttgaaaggc tottaggttt gaatcctatt 22260
 cgagaatggt tttgtcaaag atagtggcga ttttgaacca aagaaaacat taaaaaatc 22320
 agtatccggt tacgttcatg caaatagaaa gtggtctagg atctgattgt aattttagac 22380
 ttaaagagtc tcttaagatt caatcctggc tgtgtacaaa actacaaata atatatttta 22440
 gactatttgg ccttaactaa acttccactc attatttact gaggttagag aatagacttg 22500
 cgaataaaca cattcccgag aaatactcat gatcccataa ttagtcagag ggtatgcaa 22560
 tcagatctaa gaacacacat tccctcaaat tttaatgcac atgtaatcat agtttagcac 22620
 aattcaaaaa taatgtagta ttaaagacag aaattttagt actttttttt ggcgttaaaa 22680
 gaagactaag tttatacgtc cattttattt taagtggaaa accgaaattt tccatcgaaa 22740
 tatatgaatt tagtatatat atttctgcaa tgtactattt tgctattttg gcaactttca 22800
 gtggactact actttattac aatgtgatg gatgcatgag tttgagtata cacatgtcta 22860
 aatgcatgct ttgtaaaacg taacggacca caaaagagga tccatacaaa tacatctcat 22920
 agcttcctcc attattttcc gacacaaaca gagcatttta caacaattac caacaacaac 22980
 aaacaacaaa caacattaca attacattta caattacat accatggaat ttgctcaacc 23040
 tctcgttgct atggctcaag agcagtacgc tgctatcgat gctgttggtg ctctgctat 23100

ES 2 636 487 T3

cttctctgct accgactcta ttggatgggg actcaagcct atctcttctg ctactaagga 23160
 tctccctctc gttgaatctc ctaccctctt tatcctttct ctctctgctt actctgctat 23220
 cgttggttct ggactcgttt accgtaaagt gttccctaga accgttaagg gacaggatcc 23280
 tttccttctc aaggctctta tgctcgtca caacgttttc cttatcggac tcagccttta 23340
 catgtgcctc aagctcgttt acgaggctta cgtgaacaag tactccttct ggggaaacgc 23400
 ttacaaccct gctcaaaccg agatggctaa ggtgatctgg atcttctacg tgtccaagat 23460
 ctacgagttc atggacacct tcatcatgct tctcaaggga aacgttaacc aggtttcctt 23520
 cctccatggt taccaccaag gatctatctc tggaatctgg tggatgatca cttatgctgc 23580
 tccaggtgga gatgcttact tctctgctgc tctcaactct tgggttcatg tgtgcatgta 23640
 cacctactac ttcatggtg ctgttcttcc taaggacgaa aagaccaaga gaaagtacct 23700
 ttggtgggga agatacctta cccagatgca aatgttccag ttcttcatga accttctcca 23760
 ggctgtttac ctctctact cttcttctcc ttaccctaag ttcatgctc aactcctcgt 23820
 tgtttacatg gttaccctcc tcatgctttt cggaacttc tactacatga agcaccacgc 23880
 ttctaagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 23940
 actctcacta ctgatcgtc agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 24000
 aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac 24060
 tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 24120
 aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 24180
 aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 24240
 cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggacct acagaactcg ccgtaaagac 24300
 tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaa tctctgca 24360
 catggtggag cagcacacac ttgtctactc caaaaatctc aaagatacag tctcagaaga 24420
 ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 24480
 ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggtg gctcctacaa 24540
 atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggctc 24600
 caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 24660
 ttcaaagcaa gtggattgat gtgatctctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 24720
 ctatcctctg caagacctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 24780
 ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctggt gaaatcagac ctgctactgc 24840
 tgctgatatg gctgctgttt gtgatctcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 24900
 cttcagaact gagcctcaaa ctctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 24960

ES 2 636 487 T3

tagataccct tggcttggtg ctgagggtga ggggtgtggt gctggaatcg cttacgctgg 25020
 accttggaaag gctagaaacg cttacgattg gactggtgag totaccgttt acgtttcaca 25080
 cagacatcag agacttggac ttgatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 25140
 agctcagga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 25200
 acttcatgag gctcttggat aactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 25260
 cgggtgatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 25320
 acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacad ttggcaataa 25380
 agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgogatga ttatcatata atttctgttg 25440
 aattacgta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 25500
 tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatagcga tagaaaacaa aatatagcgc 25560
 gcaaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 25620
 acggttaaaa ccacccagc acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 25680
 cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 25740
 gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 25787

<210> 4
 <211> 22824
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia nucleotídica pGA7- mod_D

10

<400> 4

tcctgtggtt ggcattgaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgcctttta 60
 aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccggcca atatatcctg 120
 tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
 tcacgacgtt gtaaaacggg cgcctcgatt aaaaatccca attatatttg gtctaattta 240
 gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaacccaaat ataaatatat agtttttata 300
 tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa atatctagaa atatttgoga 360
 ctcttctggc atgtaaatatt tcgttaaata tgaagtgtc catttttatt aactttaaat 420
 aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa atgcgtcaat ctctttgttc 480
 ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat atctttttcg aatttgaagt 540
 gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta tttaggatc atattgattt 600
 ttatacttaa ttactaaatt tggtaactt tgaagtgtg catcaacgaa aaattagtca 660
 aacgactaaa ataaataaat atcatgtggtt attaagaaaa ttctctata agaattttt 720
 aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa cacatatatt tacttatcaa 780

ES 2 636 487 T3

aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca aaaaaaaaaac cagaaaatgc 840
 tgaaaaacccg gcaaaaaccga accaatccaa accgatatag ttggtttggg ttgattttga 900
 tataaaccca accaactcgg tccatttgca cccctaataca taatagcttt aatatttcaa 960
 gatattatta agttaacggt gtcaatatcc tggaaatfff gcaaaatgaa tcaagcctat 1020
 atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtgggtg taatatgtaa tttacttgat 1080
 tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga agaaggtag ctacgattta 1140
 cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctogaaatat acgaaggaac 1200
 aaatattttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat attttttgtt 1260
 cttaaacaag catcccctct aaagaatggc agttttcctt tgcattgtaac tattatgctc 1320
 ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaaacttct tctgaaaata gtggcgcccc 1380
 gcgaaagct tgctagccaa ttggggccca acgtttctga gtttttctag aaggaaactg 1440
 aaggcgggaa acgacaatct gctagtggat ctcccagtcg cgacggtgta aaacgggctc 1500
 cccgcggaaa gcttgccgcc gcccgatcta gtaacataga tgacaccgct cgcgataatt 1560
 tatcctagtt tgcgcgctat attttgtttt ctatcgcgta ttaaattgat aattgcggga 1620
 ctctaatacat aaaaacccat ctcataaata acgtcatgca ttacatgta attattacgt 1680
 gcttaacgta attcaacaga aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca 1740
 atcttaagaa actttattgc caaatgtttg aacgatcggc gcgcctcatt agtgagcctt 1800
 ctacgccttt ccgttaacgt agtagtgctg tcccacctta tcaaggtag agaaagtagc 1860
 cttccaagca ccgtagtaag agagcacctt gtagttgagt cccacttct tagcgaaagg 1920
 aacgaatctt ctgctaact caggctgtct gaattgaggc atatcaggga agagggtgtg 1980
 gataacctga cagttaaggt atcccataag ccagttcacg taccctctag aaggatcgat 2040
 atcaacgggtg tgatcaacag cgtagttaac ccaagaaagg tgcttatcag atggaacaac 2100
 agggaggtga gtatgagaag tagagaagtg agcgaagagg tacatgtaag cgatccagtt 2160
 tccgaaagtg aaccaccagt aagcaacagg ccaagagtat ccagtagcaa gcttgataac 2220
 agcggttcta acaacatgag aaacgagcat ccaagaagcc tcttcgtagt tcttcttacg 2280
 gagaacttgt ctagggtgga gaacgtagat ccagaaagct tgaacaagaa gtccagaggt 2340
 aacaggaacg aaagtccaag cttagagtct agcccaagct ctagagaatc ctctaggtct 2400
 gttatcctca acagcaggtg tgaagaaagc cacagcagga gtggatcaa gatccatctc 2460
 gtgtctaacc ttttgagggg tagcatggtg cttgttatgc atctggttcc acatctcacc 2520
 agaagtagaa agtcccgaatc cacaagtcac agcctgaagt ctcttgcca cgtaaacaga 2580
 tccgtaaga gagttatgtc caccctcatg ttgaacccat ccacatctag ctccgaagaa 2640

ES 2 636 487 T3

agcaccgtaa acaacagaag caatgatagg gtatccagcg tacataagag cagttccaag 2700
 agcgaatgta gcaagaagct cgagaagtct gtaagccaca tgggtgatag aaggcttgaa 2760
 gaatccatct ctctcaagct cagcacgcca tctagcgaaa tcctcaagca taggagcatc 2820
 ctcagactca gatctcttga tctcagcagg tctagaaggc aaagctctaa gcatcttcca 2880
 agccttgaga gaacgcatgt ggaattcttt gaaagcctca gtagcatcag caccagtgtt 2940
 agcaagcatg tagaagatca cagatccacc agggtgcttg aagttagtca catcgtactc 3000
 aacgtcctca actctaacc atctagtctc gaaagtagca gcaagctcat gaggctcaag 3060
 agtcttaaga tcaacaggag cagtagaagc atccttagca tcaagagcct cagcagaaga 3120
 tttagacctg gtaagtggag atctaggaga agatcttcca tcagtcttag gagggcacat 3180
 ggtatggtaa ttgtaaatgt aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg 3240
 ttgtaaaaga tcctcgtgta tgtttttaat ctgtttgta tcgatgagtt ttggtttgag 3300
 taaagagtga agcggatgag ttaatttata ggcataaaag gagatttgca tggcgatcac 3360
 gtgtaataat gcatgcacgc atgtgattgt atgtgtgtgc tgtgagagag aagctcttag 3420
 gtgtttgaag ggagtgaaa gtggcgaaga aaaacaattc tccgoggctg catgctatgt 3480
 gtaacgtgta gctaattgtc tggcatggca tcttatgaac gattcttttt aaaaaaagg 3540
 taaaaactta acttcataaa attaaaaaaa aaaacgttta ctaagttggt ttaaaagggg 3600
 atgagactag tagattgggt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 3660
 aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagtgtgtg aaatgtatgt atatgtaatg 3720
 tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga 3780
 gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 3840
 ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaaaga aacattttaa 3900
 aatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggg ctaggatctg attgtaattt 3960
 tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 4020
 ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 4080
 acttgcgat aaacacattc ccgagaata ctcatgatcc cataattagt cagaggggat 4140
 gccaatcaga tctaagaaca cacattocct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 4200
 agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt thtagacttt tttttggcgt 4260
 taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 4320
 cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 4380
 tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 4440
 gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatatcat 4500
 ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 4560

ES 2 636 487 T3

acaacaaaca acaacaaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaattcgcc 4620
 cagcctcttg ttgctatggc tcaagagcaa tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 4680
 gctatcttct ctgctactga ttctatcgga tggggactta agcctatctc ttctgctact 4740
 aaggacttgc ctcttggtga gtctcctaca cctctcatcc tttctttgct tgcttacttc 4800
 gctatcgttg gatctggact cgtttacaga aaggttttcc ctagaaccgt gaagggacaa 4860
 gatccattcc ttttgaaggc tcttatgctt gctcacaacg tgttccttat cggactttct 4920
 ctttacatgt gcctcaagct tgtgtacgag gcttacgtta acaagtactc tttctgggga 4980
 aacgcttaca accctgctca aactgagatg gctaaggtta tctggatctt ctacgtgagc 5040
 aagatctacg agttcatgga taccttcata atgctcctca agggaaatgt taaccagggt 5100
 agcttccttc acgtttacca tcacggatct atctctggaa tctgggtggat gattacttac 5160
 gctgctcctg gtggtgatgc ttacttctct gctgctctta actcttgggt tcacgtgtgt 5220
 atgtacacct actattttat ggctgccgtg cttcctaagg acgagaaaac taagagaaag 5280
 tacctctggg ggggaagata cttactcaa atgcagatgt tccagttctt catgaacctt 5340
 ctccaggctg tttaccttct ctactcttca tctccttacc ctaagtttat cgtcagctc 5400
 ctctgtggtg acatggttac tcttctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 5460
 cacgctagca agtgatgagg cgcgccgggc cgcgcccatg tgacagatcg aaggaagaaa 5520
 gtgtaataag acgactctca ctactcgatc gctagtgatt gtcattgta tatataataa 5580
 tgttatcttt cacaacttat cgtaatgcat gtgaaactat aacacattaa tctacttgt 5640
 catatgataa cactctcccc atttaaaact cttgtcaatt taaagatata agattcttta 5700
 aatgattaaa aaaaatatat tataaattca atcactccta ctaataaatt attaattatt 5760
 atttattgat taaaaaataa cttatactaa tttagtctga atagaataat tagattctag 5820
 tctcatcccc ttttaaacca acttagtaaa cgtttttttt ttttaatttta tgaagttaag 5880
 tttttacctt gtttttaaaa agaatcgttc ataagatgcc atgccagaac attagctaca 5940
 cgttacacat agcatgcagc cgcggagaat tgtttttctt cgcacttgt cactccctc 6000
 aaacacctaa gagcttctct ctcacagcac acacatacaa tcacatgctg geatgcatta 6060
 ttacacgtga tcgccatgca aatctccttt atagcctata aattaactca tccgcttcac 6120
 tctttactca aaccaaaact catcgataca aacaagatta aaaacataca cgaggatctt 6180
 ttacaacaat taccaacaac acaacaacac aaacaacatt acaattacat ttacaattac 6240
 cataccatgc ctccaaggga ctcttactct tatgctgctc ctcttctgct tcaacttcac 6300
 gaagttgata ctctcaaga gcacgacaag aaagagcttg ttatcggaga tagggcttac 6360
 gatgttacca acttcgttaa gagacacctt ggtggaaga tcattgctta ccaagttgga 6420

ES 2 636 487 T3

actgatgcta ccgatgctta caagcagttc catgttagat ctgctaaggc tgacaagatg 6480
cttaagtctc ttccttctcg tcoctgtcac aagggatact ctccaagaag ggctgatctt 6540
atcgctgatt tccaagagtt caccaagcaa cttgaggctg agggaatggt cgagccttct 6600
cttctctcatg ttgcttacag acttgcctgag gttatcgcta tgcctgttgc tggctgctgt 6660
cttatctggc atggatacac tttcgctgga atcgctatgc ttggagtgtg tcaggaaga 6720
tgtggatggc ttatgcatga ggtggacat tactctctca ctggaaacat tgctttogac 6780
agagctatcc aagttgcttg ttacggactt ggatgtgga tgtctggtgc ttggtggcgt 6840
aaccagcata acaagcacca tgctactcct caaaagcttc agcacgatgt tgatcttgat 6900
acccttcctc tcgttgcttt ccatgagaga atcgctgcta aggttaagtc tcctgctatg 6960
aaggcttggc tttctatgca agctaagctt ttcgctcctg ttaccactct tcttgttgt 7020
cttggatggc agctttacct tcatoctaga cacatgctca ggactaagca ctacgatgag 7080
cttgcctatgc tcggaatcag atacggactt gttggatacc ttgctgctaa ctacggtgct 7140
ggatacgttc tcgcttgcta ccttctttac gttcagcttg gagctatgta catctctgc 7200
aacttcgctg tttctcatac tcacctcct gttgctgagc ctaacgagca tgctacttgg 7260
gttgagtacg ctgctaacca cactactaac tgttctccat cttggtggtg tgattggtgg 7320
atgtcttacc ttaactacca gatcgagcac cacctttacc cttctatgcc tcaattcaga 7380
caccctaaga tcgctcctag agttaagcag cttttcgaga agcacggact tcactacgat 7440
gttagaggat acttcgaggc tatggctgat actttcgcta accttgataa cgttgcccac 7500
gctcctgaga agaaaatgca gtaatgagat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta 7560
agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctggt gaattacggt 7620
aagcacgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt 7680
agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaacatg 7740
gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg ttaactagatc ggtcgattaa aatcccaat 7800
tatatttggc ctaatttagt ttggtattga gtaaaacaaa ttcgaaccaa accaaaatat 7860
aaatatatag tttttatata tatgccttta agacttttta tagaattttc tttaaaaaat 7920
atctagaat atttgcgact cttctggcat gtaatatctc gttaaatatg aagtgcctca 7980
tttttattaa ctttaaataa ttggtgtgac gatcactttc ttatcaagtg ttactaaaat 8040
gcgtcaatct ctttgttctt ccatattcat atgtcaaaat ctatcaaaat tcttatatat 8100
ctttttcgaa tttgaagtga aatttcgata atttaaaatt aaatagaaca tatcattatt 8160
taggtatcat attgattttt atacttaatt actaaatttg gttactttg aaagtgtaca 8220
tcaacgaaaa attagtcaaa cgactaaaat aaataaatat catgtgttat taagaaaatt 8280
ctcctataag aatattttta tagatcatat gtttgtaaaa aaaattaatt tttactaaca 8340

ES 2 636 487 T3

catatatatta cttatcaaaa atttgacaaa gtaagattaa aataatattc atctaacaaa 8400
 aaaaaaacca gaaaatgctg aaaacccggc aaaaccgaac caatccaaac cgatatagtt 8460
 ggtttggttt gattttgata taaaccgaac caactcggtc catttgcacc cctaatcata 8520
 atagctttta tatttcaaga tattattaag ttaacgttgt caatatcctg gaaattttgc 8580
 aaaatgaatc aagcctatat ggctgtaata tgaattttaa agcagctcga tgtggtggtgta 8640
 atatgtaatt tacttgattc taaaaaata tcccaagtat taataatttc tgctaggaag 8700
 aaggttagct acgatttaca gcaaagccag aatacaaaga accataaagt gattgaagct 8760
 cgaaatatac gaaggaacaa atatttttaa aaaaatacgc aatgacttgg aacaaaagaa 8820
 agtgatatat tttttgttct taaacaagca tcccctctaa agaatggcag ttttcctttg 8880
 catgtaacta ttatgctccc ttogttacaa aaattttgga ctactattgg gaacttcttc 8940
 tgaaaatagt gatagaacct acacgagcat gtgctttcca ttttaattta aaaaccaaga 9000
 aacatacata cataacattc catcagcctc tctctctttt tattacggtt aatgacttaa 9060
 aacacatctt attatcccat ccttaacacc tagcagtgtc tttatacgat ctcatcgatc 9120
 accacttcaa aaccatgcag actgctgctg cccctggagc tggcatcggc taggctgggt 9180
 gccgcaactgt cccggaaggt ccctagcgcac ttgttttagat tgatgggacc acctctcaac 9240
 ttctctgctgc tgtccctgct gctggatgtc ctgcctcatc tggccgattg cacgctccag 9300
 tcccctgcat gtgcactcgc tctcaattg ctttaagatca tcgcagcagc tatcgaagtg 9360
 ctggctctgt tgcctctctc cacggccttg gttgtagtag tagctgccgc cgcccttctg 9420
 gactttttcc cacaggaacc gccgaataat tcgatagaac cacacgagca tgtgctttca 9480
 tttattttaa aaaccaagaa acatacataa catttcatca gcctctctct ctctctctct 9540
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctttatta cagctgttac actaacttaa 9600
 aacacattca tctcattatt attattatta tccatcctta acacctagca gtgtctttgt 9660
 acgatctcat aatcgatcac cccttcatca ggtatcctta ggcttcactc caacgttgtt 9720
 gcagttacgg aacatgtaca caccatcatg gttctcaacg aactggcaag atctccaagt 9780
 tttccaaagg ctaaccaca tgttctcatc ggtgtgtctg tagtgctctc ccataacttt 9840
 cttgatgcac tcggtagctt ctctagcatg gtagaatggg atccttgaaa cgtagtgatg 9900
 gagcacatga gtctcgatga tgtcatggaa gatgattccg aggattccga actctctatc 9960
 gatagtagca gcagaccct tagcgaaagt ccaactctga gcatcgtaat gaggcataga 10020
 agaatcggtg tgctgaagga aggtaacgaa aacaagccag tggttaacaa ggatccaagg 10080
 acagaacat gtgatgaaag taggccagaa tccgaaaacc ttgtaagcgy tgtaaacaga 10140
 agtgagggta gcaaggattc caagatcaga aagaacgatg taccagtagt ccttcttctc 10200

ES 2 636 487 T3

gaaaacaggg ctagaaggcc agtagtgaga cttgaagaac ttagaaacac cagggttaagg 10260
ttgtccagta gcgttagtag caaggtaaag agaaagtcct ccaagctggt ggaacaagag 10320
agcgaaaaca gagtagatag gaggttcctc agcgatatcg tgaaggctgg taacttggtg 10380
cttctctttg aattcctcgg cgggtgaagg aacgaaaacc atatctctgg tcatgtgtcc 10440
agtagcctta tggtgcttag catgagagaa cttccagctg aagtaaggaa ccataacaag 10500
agagtggaga acccatccaa cggtatcgtt aacccatccg tagttagaga aagcagaatg 10560
tccacactca tgtccaagga tccagattcc gaatccgaaa caagagatag agaacacgta 10620
agcagaccaa gcagcgaatc taaggaattc gttagggaga agagggatgt aggtaagtcc 10680
aacgtaagcg atagcagaga tagccacgat atctctcacc acgtaagaca tagacttcac 10740
gagagatctc tcgtaacagt gcttagggat agcgtcaagg atatccttga tgggtgtaatc 10800
tggcaccttg aaaacgtttc cgaaggtatc gatagcggtc ttttgcctgt tgaagatgc 10860
aacgtttcca gaacgcctaa cggctcttagt agatccctca aggatctcag atccagacac 10920
ggtaacctta gacatggtat ggtaattgta aatgtaattg taatgttgtt tgttgttgt 10980
tgttgttggt aattgttcta aaattttgg tgggtgattg ttctttaagg tgtgagagt 11040
agttgtgagt tgtgtggtgg gtttggtag attggggatg gtgggtttat atagtggaga 11100
ctgaggaatg gggctgtgag tgtaacttt gcatgggcta cacgtgggtt ctttgggct 11160
tacacgtagt attattcatg caaatgcagc caatacatat acggtatfff aataatgtgt 11220
gggaatacaa tatgccgagt attttactaa ttttggcaat gacaagtgtta catttggtt 11280
atcttacttg gcctctcttg ctttaatttg gattatffff attctcttac cttggcogtt 11340
catattcaca tccctaaagg caagacagaa ttgaatggtg gccaaaaatt aaaacgatgg 11400
atatgacctt catagtgtag gatcaattaa cgtcgaagga aaatactgat tctctcaagc 11460
atacggacaa gggtaaataa catagtcacc agaacataat aaacaaaaag tgcagaagca 11520
agactaaaaa aattagctat ggacattcag gttcatattg gaaacatcat tatcctagtc 11580
ttgtgaccat ccttctcctc gctctagttg agaggccttg ggactaacga gaggtcagtt 11640
gggatagcag atccttatcc tggactagcc tttctggtgt ttcagagtct tcgtgccgcc 11700
gtctacatct atctccatta ggtctgaaga tgactcttca caccaacgac gtttaaggtc 11760
tctatcctac tctagcttg caatacctgg cttgcaatac ctggagcctc gtgcacgatg 11820
attggatact gtggaggagg agtgtttgct gatttagagc tcccgttgg gtgatttgac 11880
ttogatttca gtttaggctt gttgaaatff ttcaggttcc attgtgaagc ctttagagct 11940
tgagcttcct tccatgttaa tgccttgatc gaatactcct agagaaaagg gaagtcgatc 12000
totgagtatt gaaatcgaag tgcacatfff ttttcaacgt gtccaatcaa tccacaaaca 12060
aagcagaaga caggtaatct ttcatactta tactgacaag taatagtctt accgtcatgc 12120

ES 2 636 487 T3

ataataacgt ctcgttcctt caagaggggt tttccgacat ccataacgac ccgaagcctc 12180
 atgaaagcat tagggaagaa cttttgggtc ttcttgatcat ggcctttata ggtgtcagcc 12240
 gagctcgcca attcccgtcc gactggctcc gcaaaatatt cgaacggcaa gttatggact 12300
 tgcaaccata actccacggt attgagcagg acctattgtg aagactcatc tcatggagct 12360
 tcagaatgtg gttgtcagca aaccaatgac cgaaatccat cacatgacgg acgtccagtg 12420
 ggtgagcgaa acgaaacagg aagcgcctat ctttcagagt cgtgagctcc acaccggatt 12480
 ccggcaacta cgtggtgggc aggcttcgcc gtattagaga tatggtgagg cagacccatc 12540
 tgtgccactc gtacaattac gagagttggt tttttgtga ttttcctagt ttctcgttga 12600
 tggtagactc atattctaca tcgtatggtc tctcaacgtc gtttcctgtc atctgatatc 12660
 ccgtcatttg catccacgtg cgcgcctcc cgtgccagt ccctaggtgt catgcacgcc 12720
 aaattggtgg tggtagcggc tgccctgtgc ttcttaccga tgggtggagg ttgagtttg 12780
 gggctctcgc ggcgatggtg gtgggtgac ggtttggtgt gggttgacgg cattgatcaa 12840
 tttacttctt gcttcaaatt ctttggcaga aaacaattca ttagattaga actggaacc 12900
 agagtgatga gacggattaa gtcagattcc aacagagtta catctcttaa gaaataatgt 12960
 aacccttta gactttatat atttgaatt aaaaaataa tttactttt agactttata 13020
 tatagtttta ataactaagt ttaaccactc tattatttat atcgaaacta tttgtatgtc 13080
 tcccctctaa ataaacttgg tattgtggtt acagaacct aatcaaata atcaatactc 13140
 aactgaagtt tgtgcagtta attgaagga ttaacggcca aatgcacta gtattatcaa 13200
 ccgaatagat tcacactaga tggccatttc catcaatata atcgccgttc ttcttctgtc 13260
 cacatatccc ctctgaaact tgagagacac ctgcacttca ttgtccttat tacgtgttac 13320
 aaaatgaaac ccatgcatcc atgcaaactg aagaatggcg caagaaccct tcccctccat 13380
 ttcttatgtg ggcaccatcc atttcacat ctcccgtat aaaacacccc catcacttca 13440
 cctagaacat catcactact tgcttatcca tccaaaagat acccactttt acaacaatta 13500
 ccaacaacia caaacaacia acaacattac aattacattt acaattacca taccatgcca 13560
 cctagcgtg ctaagcaaat gggagcttct actggtgttc atgctggtgt tactgactct 13620
 tctgcttca ccagaaagga tgttgctgat agacctgatc tcaccatcgt tggagattct 13680
 gtttacgatg ctaaggcttt cagatctgag catcctggtg gtgetcattt cgtttcttg 13740
 ttcggaggaa gagatgctac tgaggcttcc atggaatacc atagaagggc ttggcctaag 13800
 tctagaatgt ctagattcca cgttgatct cttgcttcta ctgaggaacc tgttgctgct 13860
 gatgagggat accttcaact ttgtgctagg atcgctaaga tggtagcttc tgtttctct 13920
 ggattcgtc ctgcttctta ctgggttaag gctggactta tccttgatc tgetatcgt 13980

ES 2 636 487 T3

cttgaggctt acatgcttta cgctggaaag agacttctcc cttctatcgt tcttgatgg 14040
 cttttcgctc ttatcggctc taacatccag catgatgcta accatgggtc tttgtctaag 14100
 tctgcttctg ttaaccttgc tcttgactt tgtcaggatt ggatcggagg atctatgac 14160
 ctttgcttc aagagcatgt tgttatgcac cacctccaca ctaacgatgt tgataaggat 14220
 cctgatcaaa aggctcacgg tgctcttaga ctcaagccta ctgatgcttg gtcacctatg 14280
 cattggcttc agcatcttta ccttttgctt ggtgagacta tgtacgctt caagcttttg 14340
 ttctctgaca tctctgagct tgttatgtgg cgttgggagg gtgagcctat ctctaagctt 14400
 gctggatacc tctttatgcc ttctttgctt ctcaagctta ccttctgggc tagattcgtt 14460
 gctttgcctc tttaccttgc tcttctgtt catactgctg tgtgtatcgc tgctactgtt 14520
 atgactggat ctttctacct cgctttcttc ttcttcatct cccacaactt cgagggtgtt 14580
 gcttctgttg gacctgatgg atctatcact tctatgacta gaggtgctag cttccttaag 14640
 agacaagctg agacttcttc taacgttga ggacctctc ttgtactct taacggtgga 14700
 ctcaactacc aaattgagca tcacttgttc cctagagttc accatggatt ctaccctaga 14760
 cttgctcctc ttgttaaggc tgagcttgag gctagaggaa tcgagtacaa gcactaccct 14820
 actatctggt ctaaccttgc ttctaccctc agacatatgt acgctcttgg aagaaggcct 14880
 agatctaagg ctgagtaatg acaagcttat gtgacgtgaa ataataacgg taaaatatat 14940
 gtaataataa taataataaa gccacaaagt gagaatgagg ggaaggggaa atgtgtaatg 15000
 agccagtagc cgttgggtct aattttgtat cgtattgtca ataaatcatg aattttgtgg 15060
 tttttatgtg tttttttaa tcatgaattt taaattttat aaaataatct ccaatcggaa 15120
 gaacaacatt ccatatccat gcatggatgt ttctttacc aaatctagtt cttgagagga 15180
 tgaagcatca ccgaacagtt ctgcaactat ccctcaaaag ctttaaaatg aacaacaagg 15240
 aacagagcaa cgttccaaag atcccaaacg aaacatatta tctatactaa tactatatta 15300
 ttaattacta ctgcccggaa tcacaatccc tgaatgattc ctattaacta caagccttgt 15360
 tggcggcgga gaagtgatcg gcgcgcgag aagcagcgga ctcgagagcg aggccttgg 15420
 agatctgagt cgaacgggca gaatcagtat tttccttoga cgttaattga tctacacta 15480
 tgtaggtcat atccatcgtt ttaatttttg gccaccattc aattctgtct tgcctttagg 15540
 gatgtgaata tgaacggcca aggtaagaga ataaaaataa tccaaattaa agcaagagag 15600
 gccaaagtaag ataatccaaa tgtacacttg tcattgcca aattagtaaa atactcggca 15660
 tattgtattc ccacacatta ttaaaatacc gtatatgtat tggctgcatt tgcattgaata 15720
 atactacgtg taagcccaaa agaaccacg tgtagcccat gcaaagttaa cactcacgac 15780
 cccattcctc agtctccact atataaacc accatcccca atctcaccaa accaccaca 15840
 caactcacia ctcaactctca caccttaaag aaccaatcac caccaaaaat tttacaacia 15900

ES 2 636 487 T3

ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca tttacaatta ccataccatg 15960
 agcgctgta ccgttactgg atctgatcct aagaacagag gatcttctag caacaccgag 16020
 caagaggttc caaaagttgc tatcgatacc aacggaaacg tgttctctgt tcctgatttc 16080
 accatcaagg acatocctgg agctatccct catgagtgtt acgagagaag attggctacc 16140
 tctctctact acgtgttcag agatatcttc tgcattgctta ccaccggata ccttaccat 16200
 aagatoccttt accctctcct catctcttac acctctaaca gcatcatcaa gttcactttc 16260
 tgggcccttt aactttacgt tcaaggactt ttcggaaccg gaatctgggt tctcgtcat 16320
 gagtgtggac atcaagcttt ctctgattac ggaatcgtga acgatttcgt tggatggacc 16380
 cttcactctt accttatggt tccttacttc agctggaagt actctcatgg aaagcaccat 16440
 aaggctactg gacacatgac cagagatatg gttttcgttc ctgccaccaa agaggaattc 16500
 aagaagtcta ggaacttctt cggtaacctc gctgagtact ctgaggattc tccacttaga 16560
 accctttacg agcttcttgt tcaacaactt ggaggatgga tcgcttacct cttcgttaac 16620
 gttacaggac aaccttacc tgatgttcct tcttggaat ggaaccactt ctggcttacc 16680
 tctccacttt tcgagcaaag agatgctctc tacatcttc tttctgatct tggaatcctc 16740
 acccagggaa tcgttcttac tctttggtac aagaaattcg gaggatggtc ccttttcac 16800
 aactggttcg ttccttacc ctgggttaac cactggctcg ttttcatcac attccttcag 16860
 cacactgate ctactatgcc tcattacaac gctgaggaat ggactttcgc taagggtgct 16920
 gctgctacta tcgatagaaa gttcggattc atcggacctc acatcttcca tgatatcacc 16980
 gagactcatg tgcttcacca ctactgttct aggatcccat tctacaacgc tagacctgct 17040
 tctgaggcta tcaagaaagt tatgggaaag cactacaggt ctagcgacga gaacatgtgg 17100
 aagtcacttt ggaagtcttt caggctctgc caatacgttg acggtgataa cgggttctc 17160
 atgttccgta acatcaacaa ctgcccaggt ggagctgctg agaagtaatg aaggggtgat 17220
 cgattatgag atcgtacaaa gacactgcta ggtgttaag atggataata ataataata 17280
 tgagatgaat gtgttttaag ttagtgtaac agctgtaata aagagagaga gagagagaga 17340
 gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaggctgatg aaatggtatg tatgtttctt 17400
 ggtttttaa ataatgaaa gcacatgctc gtgtggttct atcgaattat tcggcggttc 17460
 ctgtgggaaa aagtcacaga gggccgccc agctactact acaaccaagg ccgtggagga 17520
 gggcaacaga gccagcactt cgatagctgc tgcgatgatc ttaagcaatt gaggagcgag 17580
 tgcacatgca ggggactgga gcgtgcaatc ggccagatga ggcaggacat ccagcagcag 17640
 ggacagcagc aggaagttga gaggtggtcc catcaatcta aacaagtcgc tagggacctt 17700
 ccgggacagt gcggcaccca gcctagccga tgcagctcc aggggcagca gcagtctgca 17760

ES 2 636 487 T3

tggttttgaa gtggtgatcg atgagatcgt ataaaagacac tgctaggtgt taaggatggg 17820
 ataataagat gtgttttaag tcattaaccg taataaaaag agagagaggc tgatggaatg 17880
 ttatgtatgt atgtttcttg gtttttaaaa ttaaatggaa agcacatgct cgtgtggggtt 17940
 ctatctcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 18000
 aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 18060
 ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 18120
 ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattgggtg tacgatcact 18180
 ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctcttgggt cttccatatt catatgtcaa 18240
 aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 18300
 attaaataga acatatcatt atttaggat catattgatt ttataactta attactaaat 18360
 ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 18420
 tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 18480
 aaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 18540
 taaaataata ttcactaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg 18600
 aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccc aaccaactcg 18660
 gtccatttgc acccctaatac ataatagcct taatatttca agatattatt aagttaacgt 18720
 tgtcaatata ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 18780
 aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 18840
 tattaataat ttctgctagg aagaaggta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 18900
 agaaccataa agtgattgaa gctcgaataa tacgaaggaa caaatatttt taaaaaata 18960
 cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaaaaaa gcatcccctc 19020
 taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgta caaaaatttt 19080
 ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtcctgcag gctagtagat tggttggttg 19140
 gtttccatgt accagaaggc ttaccctatt agttgaaagt tgaaaactttg ttccctactc 19200
 aattcctagt tgtgtaaagtg tatgtatatg taatgtgtat aaaacgtagt acttaaatga 19260
 ctaggagtgg ttcttgagac cgatgagaga tgggagcaga actaaagatg atgacataat 19320
 taagaacgaa tttgaaaggc tcttaggttt gaatcctatt cgagaatggt tttgtcaaag 19380
 atagtggcga ttttgaacca aaaaaacat ttaaaaaatc agtatccggt tacgttcatg 19440
 caaatagaaa gtggtctagg atctgattgt aatttttagac ttaaagagtc tcttaagatt 19500
 caatcctggc tgtgtacaaa actacaaata atatatttta gactattttg ccttaactaa 19560
 acttccactc attatttact gaggttagag aatagacttg cgaataaaca cattcccag 19620
 aaatactcat gatcccataa ttagtcagag ggtatgcca tcagatctaa gaacacacat 19680

ES 2 636 487 T3

tccctcaaat tttaatgcac atgtaatcat agtttagcac aattcaaaaa taatgtagta 19740
 ttaaagacag aaattttag actttttttt ggcgttaaaa gaagactaag tttatacgta 19800
 cattttattt taagtggaaa accgaaattt tccatcgaaa tatatgaatt tagtatatat 19860
 atttctgcaa tgtactattt tgctattttg gcaactttca gtggactact actttattac 19920
 aatgtgtatg gatgcatgag tttgagtata cacatgtota aatgcatgct ttgtaaaacg 19980
 taacggacca caaaagagga tccatacaaa tacatctcat agcttctctc attattttcc 20040
 gacacaaaca gagcatttta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca 20100
 attacattta caattaccat accatggcct ctatcgctat ccctgctgct ctgctgaggaa 20160
 ctcttgata cgttacctac aatgtggcta accctgatat cccagcttct gagaaagttc 20220
 ctgcttactt catgcagggt gagtactggg gacctactat cggaaactatt ggatacctcc 20280
 tcttcatcta cttcggaaag cgtatcatgc agaacagatc tcaacctttc ggactcaaga 20340
 acgctatgct cgtttacaac ttctaccaga ccttcttcaa cagctactgc atctacctt 20400
 tcgttacttc tcatagggct cagggactta aggtttgggg aaacatccct gatatgactg 20460
 ctaactcttg ggaatctct caggttatct ggcttcaact caacaacaag tacggtgagc 20520
 ttctcgacac cttcttcatg gtgatgagga agaagttcga ccagctttct ttccttcaca 20580
 tctaccacca cactcttctc atctggtoat ggttcggtgt tatgaagctt gagcctggtg 20640
 gagattgcta cttcggatct tctgttaaca ccttcgtgca cgtgatcatg tactcttact 20700
 acggacttgc tgctcttggg gttactgtt tctggaagaa gtacatcacc cagatccaga 20760
 tgcttcagtt ctgtatctgt gcttctcact ctatctacac cgcttacggt cagaataccg 20820
 cttctggct tccttacctt caactctggg ttatggtgaa catggtcgtt ctcttcgcca 20880
 acttctaccg taagaggtag aagtctaagg gtgctaagaa gcagtgataa gggccgccc 20940
 catgtgacag atcgaaggaa gaaagtgtaa taagacgact ctactactc gatcgctagt 21000
 gattgtcatt gttatatata ataagtatt ctttcacaac ttatcgtaat gcatgtgaaa 21060
 ctataacaca ttaatcctac ttgtcatatg ataactctt ccccatthaa aactcttgtc 21120
 aatttaaaga tataagattc tttaaatgat taaaaaaaa atattataaa ttcaatcact 21180
 cctactaata aattattaat tattatttat tgattaaaaa aatacttata ctaatttagt 21240
 ctgaatagaa taattagatt ctagcctgca gggcggccc ggcacccatg gactcaaaga 21300
 ttcaaataga ggacctaca gaactcggc taaagactgg cgaacagttc atacagagtc 21360
 tcttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat ggtggagcac gacacacttg 21420
 tctactocaa aaatatcaaa gatacagctc cagaagacca aagggaatt gagacttttc 21480
 aacaaaggtt aatatccgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtoacttta 21540

ES 2 636 487 T3

ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaaatg ccatcattgc gataaaggaa 21600
 aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga 21660
 ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg 21720
 atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct 21780
 ctatataagg aagttcattt catttgagaga gaacacgggg gactgaatta aatatgagcc 21840
 ctgagagggc tctgttgaa atcagacctg ctactgctgc tgatatggct gctgtttgtg 21900
 atatcgtgaa cactacatc gagacttcta cgttaactt cagaactgag cctcaaactc 21960
 ctcaagagtg gatcgatgat cttgagagac tccaagatag atacccttgg cttgttgctg 22020
 aggttgaggg tggtgttgct ggaatcgctt acgctggacc ttggaaggct agaaacgctt 22080
 acgattggac tggtgagtct accgtttacg tttcacacag acatcagaga cttggacttg 22140
 gatctaccct ttacactcac cttctcaagt ctatggaagc tcagggattc aagtctgttg 22200
 ttgctgttat cggactccct aacgatcctt ctgttagact tcatgaggct cttggataca 22260
 ctgctagagg aactcttaga gctgctggat acaagcacgg tggatggcat gatgttggat 22320
 tctggcaaag agatttcgag cttcctgctc ctctagacc tgttagacca gttactcaga 22380
 tctgaatttg cgtgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 22440
 tgccggctctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 22500
 taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt 22560
 atacatttaa tacgcatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 22620
 cgcggtgtca tctatgttac tagatcacta gtgatgtacg gttaaaacca cccagtaca 22680
 ttaaaaacgt ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagcgt caatttgttt acaccacaat 22740
 atatcctgcc accagccagc caacagctcc ccgaccggca gctcggcaca aaatcaccac 22800
 tcgatacagg cagcccatca gtcc 22824

<210> 5
 <211> 24809
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia nucleotídica pga7- mod_e

10

<400> 5

tcctgtgggtt ggcattgcaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgcctttta 60
 aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccggcca atatcctg 120
 tcaaactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
 tcacgacgtt gtaaacggg cgcctcgatt aaaaatccca attatatttg gtctaattta 240
 gtttggatt gagtaaaaca aattcgaacc aaacaaaat ataaatatat agtttttata 300

ES 2 636 487 T3

tatatgcott taagactttt tatagaatth tcttttaaaaa atatctagaa atatttgcca	360
ctcttctggc atgtaatat tctgttaaata tgaagtgtc catttttatt aactttaaat	420
aattggtgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa atgcgtcaat ctctttgttc	480
ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat atctttttcg aatttgaagt	540
gaaatttoga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta tttaggtatc atattgatth	600
ttatacttaa ttactaaatt tggtaactt tgaagtgtc catcaacgaa aaattagtca	660
aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa ttctcctata agaataatth	720
aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa cacatatatt tacttatcaa	780
aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca aaaaaaaaaac cagaaaatgc	840
tgaaaaaccg gcaaaaaccg accaatccaa accgatatag ttggtttggg ttgattttga	900
tataaacoga accaactcgg tccatttgca cccctaataca taatagctth aatatttcaa	960
gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaattht gcaaaatgaa tcaagcctat	1020
atggctgtaa tatgaattht aaagcagctc gatgtggtgg taatatgtaa tttacttgat	1080
tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga agaaggttag ctacgattta	1140
cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctcgaaatat acgaaggaac	1200
aaataattht aaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat atthtttgtt	1260
cttaaaacaag catcccctct aaagaatggc agthttcctt tgcattgtaac tattatgctc	1320
ccttcgttac aaaaattht gactactatt gggaaactct tctgaaaata gtggcgcccc	1380
gcgaaaagct tgctagccaa ttggggccca acgttctcga gthtttctag aaggaaactg	1440
aaggcgggaa acgacaatct gctagtggat ctcccagtcg cgacgttgta aaacgggcgc	1500
cccgcggaaa gcttgccggc gcggtaccgc ccgttcgact cagatcttcc aaggcctcgt	1560
ctccgagtcg gctgcttctc gccgcgccga tcaactctcc gccgccaaca aggctttag	1620
ttaataggaa tcatcaggg attgtgattc cgggcagtag taattaataa tatagtatta	1680
gtatagataa tatgtttcgt ttgggatctt tggaaacttg ctctgttctt tgttgttcat	1740
tttaaagctt ttgagggata gttgcagaac tgttcggtga tgcttcatcc tctcaagaac	1800
tagatttggg taaagaaaca tccatgcatg gatattggaat gttgttcttc cgattggaga	1860
ttatthtata aaatttaaaa ttcatgatth aaaaaaacac ataaaaacca caaaattcat	1920
gatttattga caatacgata caaaattagc accaccggt actggctcat tacacatttc	1980
ccctcccct cattctcact ttgtggctth attattatta ttattacata tattttaccg	2040
ttattatttc acgtcacata agcttgtaa ttaatcatta gtgagccttc tcagcctttc	2100
cgtaaactga gtagtgctgt cccaccttat caaggttaga gaaagttagc ttccaagcac	2160

ES 2 636 487 T3

cgtagtaaga gagcaccttg tagttgagtc cccacttctt agcgaaagga acgaatcttc 2220
 tgctaacctc aggctgtctg aattgaggca tatcagggaa gaggtggtgg ataacctgac 2280
 agttaaggta tcccataagc cagttcacgt atcctctaga aggatcgata tcaacgggtg 2340
 gatcaacagc gtagttaacc caagaaaggt gcttatcaga tggacaaca gggaggtgag 2400
 tatgagaagt agagaagtga gcgaaaaggt acatgtaagc gatccagttt ccgaaagtga 2460
 accaccagta agcaacaggc caagagtatc cagtagcaag cttgataaca gcggttctaa 2520
 caacatgaga aacgagcatc caagaagcct cttcgtagtt cttcttacgg agaacttgtc 2580
 taggggtggag aacgtagatc cagaaagcct gaacaagaag tccagaggta acaggaacga 2640
 aagtccaagc ttgaagtcta gcccaagctc tagagaatcc tctaggtctg ttatcctcaa 2700
 cagcagtggt gaagaaagcc acagcaggag tggatcaag atccatatcg tgtctaacct 2760
 tttgaggggt agcatggtgc ttgttatgca tctggtcca catctacca gaagtagaaa 2820
 gtccgaatcc acaagtcata gcctgaagtc tcttgtccac gtaaacagat ccggtaagag 2880
 agttatgtcc accctcatgt tgaaccatc cacatctagc tccgaagaaa gcaccgtaaa 2940
 caacagaagc aatgataggg tatccagcgt acataagagc agttccaaga gcgaatgtag 3000
 caagaagctc gagaagtctg taagccacat ggggtgataga aggcttgaag aatccatctc 3060
 tctcaagctc agcagccat ctagcgaaat cctcaagcat aggagcatcc tcagactcag 3120
 atctottgat ctcagcaggt ctagaaggca aagctctaag catcttcaa gccttgagag 3180
 aacgcatgtg gaattctttg aaagcctcag tagcatcagc accagtgtta gcaagcatgt 3240
 agaagatcac agatccacca gggtgcttga agttagtcac atcgtactca acgtcctcaa 3300
 ctctaacca tctagtctcg aaagtagcag caagctcatg aggctcaaga gtcttaagat 3360
 caacaggagc agtagaagca tccttagcat caagagcctc agcagaagat ttagacctgg 3420
 taagtggaga tctaggagaa gatcttccat cagtcttagg agggcacatg gtatggtaat 3480
 tgtaaattga attgtaatgt tgtttggtgt ttggtggtgt tggtaattgt tgtaaaatta 3540
 attaagtggg tatcttttgg atggataagc aagtagtgat gatggtctag gtgaagtgat 3600
 gggggtggtt tatagcggga gatgggtaaa tggatggtcg ccacataaga aatggagggg 3660
 aagggttctt gcgccattct tcagtttgca tggatgcatg ggtttcattt tgtaacacgt 3720
 aataaggaca atgaagtgca ggtgtctctc aagtttcaga ggggatatgt ggacagaaga 3780
 agaacggcga tgatattgat ggaaatggcc atctagtgtg aatctattcg gttgataata 3840
 ctagtgcatt ttggcgtta atcccttcaa ttaactgcac aaacttcagt tgagtattga 3900
 ttatttgatt ataggttctg taaacacaat accaagtta tttagagggg agacatacaa 3960
 atagtttoga tataaataat agagtggta aacttagtta ttaaaactat atataaagtc 4020
 taaaagttaa attatTTTTT taattgcaaa tatataaagt ctaaaggggt tacattattt 4080

ES 2 636 487 T3

cttaaagagat gtaactctgt tggaaatctga cttaatccgt ctcatcactc tggtttocag 4140
 ttctaatacta atgaattggt ttctgccaaa gaatttgaag caagaagtaa attgatcaat 4200
 gccgtcaacc cacaccaaac cgtcaacca ctaccatcgc cgcggagacc cccaaactca 4260
 acctccaccc atcggtaaga agcacagggc agcccgacc accaccaatt tggcgtgcat 4320
 gacaactagg gacttggcac gggaggcggc gcacgtggat gcaaatgacg ggatatcaga 4380
 tgacaggaaa cgacgttgag agaccatagc atgtagaata tgagctcacc atcaacgaga 4440
 aactaggaaa atcacaaaa aaacaactct cgtaattgta cgagtggcac agatgggtct 4500
 gcctcaacat atctctaata cggcgaagcc tgcccaacac gtagttgccg gaatccggtg 4560
 tggagctcac gactctgaaa gatagggcgt tctgttttcg tttcgtcac cactggacg 4620
 tccgtcatgt gatggatttc ggtcattggt ttgctgacaa ccacattctg aagctccatg 4680
 agatgagtct tcacaatagg tctgtctcaa taccgtggag ttatggttgc aagtccataa 4740
 cttgccgttc gaataattttg cggagccagt cggacgggaa ttggcgagct cggctgacac 4800
 ctataaaggc catgacaaga agaaccaaaa gttcttcctt aatgctttca tgaggcttcg 4860
 ggtcgttatg gatgtcggaa aaccocctct gaaggaacga gacgttatta tgcattgacg 4920
 taagaactatt acttgtcagt ataagtatga aagattacct gtcttctgct ttgtttgtgg 4980
 attgattgga cacgttgaaa aaaaatgtgc acttogattt caatactcag agatcgactt 5040
 cccttttctc taggagtatt cgatcaaggc attaacatgg aaggaagctc aagctctaaa 5100
 ggcttcacaa tggaaacctga aaaaattcaa caagcctaaa ctgaaatoga agtcaaatca 5160
 cccaaccggg agctctaaat cagcaaacac tctcctcca cagtatcaa tcatcgtgca 5220
 cgatgctcca ggtattgcaa gccaggtatt gcaagctagg agtaggatag agaccttaa 5280
 cgtcgttggg gtgaagagtc atcttcagac ctaatggaga tagatgtaga cggcggcagc 5340
 aagactctga aacaccagaa aggctagtcc aggataagga tctgctatcc caactgacct 5400
 ctcgttagtc ccaaggctc tcaactagag caggaggaag gatggtcaca agactaggat 5460
 aatgatgttt ccaatatgaa cctgaatgtc catagctaat ttttttagtc ttgcttctgc 5520
 actttttgtt tattatgttc tggtgactat gttatttacc cttgtcogta tgcttgaggg 5580
 taccctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttacct attagttgaa 5640
 agttgaaact ttgttccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 5700
 tataaaacgt agtacttaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 5760
 agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaag ggctcttagg tttgaatcct 5820
 attcagagaat gtttttgcata aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 5880
 atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtgggtct aggatctgat tgtaatttta 5940

ES 2 636 487 T3

gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 6000
ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctccattatt actgaggta gagaatagac 6060
ttgogaataa acacattccc gagaataact catgatccca taattagtca gagggatgc 6120
caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 6180
cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt ttggcggtta 6240
aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa tttccatcg 6300
aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 6360
tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 6420
ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 6480
catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 6540
aacaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 6600
tatccctgct gctcttgctg gaactcttg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 6660
tatccagct tctgagaag ttctgctta ctcatgcag gttgagtact ggggacctac 6720
tatcggaact attggatacc tctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 6780
atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 6840
caacagctac tgcacttacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 6900
gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggta tctggcttca 6960
ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagt 7020
cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 7080
tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgta acacctcgt 7140
gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 7200
gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 7260
caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt 7320
gaacatgttc gttctctctg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta aggggtctaa 7380
gaagcagtga taaggcgcgc ggcgcgcgcg gccgcgcgca tgtgacagat cgaaggaaga 7440
aagtgttaata agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat 7500
aatgttatct ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt 7560
gtcatatgat aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtaa tttaaagata taagattctt 7620
taaagatta aaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta 7680
ttattttattg attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct 7740
agtctcatcc ccttttaaac caacttagta aacgtttttt ttttaattt tatgaagtta 7800
agtttttacc ttgtttttaa aaagaatcgt tcataagatg ccatgccaga acattagcta 7860

ES 2 636 487 T3

cacgttacac atagcatgca gcgcgggaga attgtttttc ttcgccactt gtcactccct 7920
 tcaaacacct aagagcttct ctctcacagc acacacatac aatcacatgc gtgcatgcat 7980
 tattacacgt gatcgccatg caaatctcct ttatagccta taaattaact catccgcttc 8040
 actctttact caaaccaaaa ctcatcgata caaacaagat taaaaacata cacgaggatc 8100
 ttttacaaca attaccaaca acaacaaaca acaaacaca ttacaattac atttacaatt 8160
 accataccat gcctccaagg gactcttact cttatgctgc tcctccttct gctcaacttc 8220
 acgaagttga tactcctcaa gagcacgaca agaaagagct tgttatcgga gatagggctt 8280
 acgatgttac caacttcgtt aagagacacc ctggtggaaa gatcattgct taccaagttg 8340
 gaactgatgc tacogatgct tacaagcagt tccatgtag atctgctaag gctgacaaga 8400
 tgcttaagtc tcttccttct cgtcctgttc acaagggata ctctccaaga agggctgac 8460
 ttatcgctga tttccaagag ttcaccaagc aacttgaggc tgagggaatg ttcgagcctt 8520
 ctcttcctca tgttgcttac agacttgctg aggttatcgc tatgcatggt gctggtgctg 8580
 ctcttatctg gcatggatac actttcgtg gaatcgctat gcttgagtt gttcagggaa 8640
 gatgtggatg gcttatgcat gaggggtggac attactctct cactggaaac attgctttcg 8700
 acagagctat ccaagttgct tgttacggac ttggatgtgg aatgtctggt gcttggtggc 8760
 gtaaccagca taacaagcac catgctactc ctcaaagct tcagcacgat gttgatcttg 8820
 atacccttcc tctcgttgct ttccatgaga gaatcgctgc taaggttaag tctcctgcta 8880
 tgaaggettg gctttctatg caagetaagc ttttcgctcc tgttaccact cttcttgttg 8940
 ctcttgatg gcagctttac ctcatccta gacacatgct caggactaag cactacgatg 9000
 agcttgctat gctcggaatc agatacggac ttgttgata ccttgctgct aactacggtg 9060
 ctggatacgt tctcgcttgt taccttcttt acgctcagct tggagctatg tacatcttct 9120
 gcaacttcgc tgtttctcat actcacctcc ctggtgttga gcctaacgag catgctactt 9180
 gggttgagta cgctgctaac cacactacta actgttctcc atcttggtgg tgtgattggt 9240
 ggatgtctta ccttaactac cagatcgagc accaccttta cccttctatg cctcaattca 9300
 gacaccctaa gatcgctcct agagttaagc agcttttcga gaagcacgga cttcactacg 9360
 atgtagagg atacttcgag gctatggctg atactttcgc taacctgat aacgttgccc 9420
 atgctcctga gaagaaaatg cagtaatgag atcgttcaaa catttgcaa taaagtttct 9480
 taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 9540
 ttaagcacgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 9600
 ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaact 9660
 aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcggtcgatt aaaaatccca 9720

ES 2 636 487 T3

attatatttg gtctaattta gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaacccaaaat 9780
 ataaatatat agtttttata tatatgcott taagactttt tatagaattt tctttaaaaa 9840
 atatctagaa atatttgcga ctcttctggc atgtaaatatt togttaaata tgaagtgctc 9900
 catttttatt aactttaaat aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa 9960
 atgogtcaat ctctttgttc ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat 10020
 atctttttcg aatttgaagt gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta 10080
 tttaggtatc atattgattt ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta 10140
 catcaacgaa aaattagtca aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa 10200
 ttctcctata agaatatttt aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa 10260
 cacatatatt tacttatcaa aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca 10320
 aaaaaaaaaac cagaaaatgc tgaaaaccgc gcaaaaaccga accaatcca accgatatag 10380
 ttggtttggg ttgattttga tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca 10440
 taatagcttt aatatttcaa gatattatta agttaacggt gtcaatatcc tggaaatttt 10500
 gcaaaatgaa tcaagcctat atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtggtgg 10560
 taatatgtaa tttacttgat tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga 10620
 agaaggttag ctacgattta cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag 10680
 ctcgaaatat acgaaggaac aaatattttt aaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag 10740
 aaagtgatat attttttgtt cttaaacaag catcccctct aaagaatggc agttttcctt 10800
 tgcagtgaac tattatgctc ccttcggtac aaaaattttg gactactatt gggaaactct 10860
 tctgaaaata gtgatagaac ccacacgagc atgtgctttc catttaattt taaaaaccaa 10920
 gaaacataca tacataacat tccatcagcc tctctctctt tttattacgg ttaatgactt 10980
 aaaacacatc ttattatccc atccttaaca cctagcagtg tctttatacg atctcatcga 11040
 tcaccacttc aaaaccatgc agactgctgc tgcccctgga gctggcatcg gctaggtggt 11100
 gtgocgcaact gtcccgaag gtcccctagcg acttgtttag attgatggga ccacctctca 11160
 acttctctct gctgtccctg ctgctggatg tctctctca tctggccgat tgcacgctcc 11220
 agtcccctgc atgtgcactc gctcctcaat tgcttaagat catcgcagca gctatcgaag 11280
 tgctggctct gttgccctcc tccacggcct tggttgtagt agtagctgcc gccgcccttc 11340
 tggacttttt cccacaggaa ccgocgaata attogataga accacacgag catgtgcttt 11400
 catttatttt aaaaaccaag aaacatacat aacatttcat cagcctctct ctctctctct 11460
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctttat tacagctggt aactaactt 11520
 aaaacacatt catctcatta ttattattat tatccatcct taacacctag cagtgtcttt 11580
 gtacgatctc ataatcgatc accccttcat caggtatcct taggcttcac tccaacgttg 11640

ES 2 636 487 T3

ttgcagttac	ggaacatgta	cacaccatca	tggttctcaa	cgaactggca	agatctccaa	11700
gttttccaaa	ggctaaccce	catgttctca	tcggtgtgtc	tgtagtgtc	tcccataact	11760
ttcttgatgc	actcggtagc	ttctctagca	tggtagaatg	ggatccttga	aacgtagtga	11820
tggagcacat	gagtctcgat	gatgtcatgg	aagatgattc	cgaggattcc	gaactctcta	11880
tcgatagtag	cagcagcacc	cttagcgaaa	gtccactctt	gagcatcgta	atgaggcata	11940
gaagaatcgg	tgtgctgaag	gaaggtaacg	aaaacaagcc	agtggttaac	aaggatccaa	12000
ggacagaacc	atgtgatgaa	agttagccag	aatccgaaaa	ccttgtaagc	ggtgtaaaca	12060
gaagtgaggg	tagcaaggat	tccaagatca	gaaagaacga	tgtaccagta	gtccttctta	12120
tcgaaaacag	ggctagaagg	ccagtagtga	gacttgaaga	acttagaaac	accagggtaa	12180
ggttgctccag	tagcgttagt	agcaaggtaa	agagaaagtc	ctccaagctg	ttggaacaag	12240
agagcgaaaa	cagagtagat	aggagtttcc	tcagcgatat	cgtgaaggct	gtaacttgg	12300
tgcttctctt	tgaattcctc	ggcgggtgta	ggaacgaaaa	ccatatctct	ggtcatgtgt	12360
ccagtagcct	tatggtgctt	agcatgagag	aacttccagc	tgaagtaagg	aaccataaca	12420
agagagtgga	gaaccocatcc	aacggtatcg	ttaaccatc	cgtagttaga	gaaagcagaa	12480
tgtccacact	catgtccaag	gatccagatt	ccgaatccga	aacaagagat	agagaacacg	12540
taagcagacc	aagcagcgaa	tctaaggaat	tcgttaggga	gaagagggat	gtaggttaagt	12600
ccaacgtaag	cgatagcaga	gatagccacg	atatctctca	ccacgtaaga	catagacttc	12660
acgagagatc	tctcgtaaca	gtgcttaggg	atagcgtcaa	ggatatacct	gatggtgtaa	12720
tctggcaccct	tgaaaacggt	tccgaaggta	tcgatagcgg	tcttttgctg	cttgaaagat	12780
gcaacgtttc	cagaacgcct	aacggctcta	gtagatccct	caaggatctc	agatccagac	12840
acggtaacct	tagacatggt	atggtaattg	taaagttaat	tgtaatgttg	ttgtttggtt	12900
gttgttggtg	gtaattggtg	taaaattttt	ggtggtgatt	ggttctttaa	ggtgtgagag	12960
tgagttgtga	gttgtgtggt	gggtttggtg	agattgggga	tggtggggtt	atatagtgga	13020
gactgaggaa	tggggtcgtg	agtgttaact	ttgcatgggc	tacacgtggg	ttcttttggg	13080
cttacacgta	gtattattca	tgcaaatgca	gccaatatcat	atacgttatt	ttaataatgt	13140
gtgggaatac	aatatgccga	gtattttact	aattttgcca	atgacaagtg	tacatttggga	13200
ttatcttact	tggcctctct	tgctttaatt	tggattatth	ttattctctt	accttggccg	13260
ttcatattca	catccctaaa	ggcaagacag	aattgaatgg	tggccaaaaa	ttaaaacgat	13320
ggatagacc	tacatagtgt	aggatcaatt	aacgtcgaag	gaaaatactg	attctctcaa	13380
gcatacggac	aagggtaaat	aacatagtca	ccagaacata	ataaacaaaa	agtgcagaag	13440
caagactaaa	aaaattagct	atggacattc	aggttcatat	tggaaacatc	attatcctag	13500

ES 2 636 487 T3

tcttgtgacc atccttcctc ctgctctagt tgagaggcct tgggactaac gagaggtcag 13560
 ttgggatagc agatccttat cctggactag cctttctggt gtttcagagt cttcgtgccg 13620
 ccgtctacat ctatctccat taggtctgaa gatgactctt cacaccaacg acgtttaagg 13680
 tctctatcct actcctagct tgcaatacct ggcttgcaat acctggagca tctgtcacga 13740
 tgattggata ctgtggagga ggagtgtttg ctgatttaga gctcccgggt ggggtgattg 13800
 acttcgattt cagtttaggc ttgttgaaat ttttcaggtt ccattgtgaa gcctttagag 13860
 cttgagcttc cttccatggt aatgccttga tcgaatactc ctagagaaaa ggaagtcca 13920
 tctctgagta ttgaaatcga agtgcacatt ttttttcaac gtgtccaatc aatccacaaa 13980
 caaagcagaa gacaggtaat ctttcatact tatactgaca agtaatagtc ttaccgcat 14040
 gcataataac gtctcgttcc ttcaagaggg gttttccgac atccataacg acccgaagcc 14100
 tcatgaaagc attaggaag aacttttgggt tcttctgtc atggccttta taggtgtcag 14160
 ccgagctcgc caattcccgt ccgactggct ccgcaaaaata ttcgaacggc aagttatgga 14220
 cttgcaacca taactccacg gtattgagca ggacctattg tgaagactca tctcatggag 14280
 cttcagaatg tggttgtcag caaaccaatg accgaaatcc atcacatgac ggacgtccag 14340
 tgggtgagcg aaacgaaaca ggaagcgcct atctttcaga gtcgtgagct ccacaccgga 14400
 ttccggcaac tacgtgttgg gcaggcttcg ccgtattaga gatatgttga ggcagacca 14460
 tctgtgccac tcgtacaatt acgagagttg tttttttgt gattttccta gtttctcgtt 14520
 gatggtgagc tcatattcta catcgtatgg tctctcaacg tcgtttcctg tcatctgata 14580
 tcccgtcatt tgcattccacg tgcgccgcct cccgtgccaa gtccctaggt gtcattgacg 14640
 ccaaattggt ggtggtgcgg gctgccctgt gcttcttacc gatgggtgga ggttgagttt 14700
 gggggtctcc gggcgatgg tagtgggtg acggtttgggt gtgggttgac ggcattgatc 14760
 aatttacttc ttgcttcaaa ttctttggca gaaaacaatt cattagatta gaactggaaa 14820
 ccagagtgat gagacggatt aagtcagatt ccaacagagt tacatctctt aagaataat 14880
 gtaaccctt tagactttat atatttgcaa ttaaaaaaat aatttaactt ttagacttta 14940
 tatatagttt taataactaa gtttaaccac tctattattt atatcgaac tatttgtatg 15000
 tctcccctct aaataaactt ggtattgtgt ttacagaacc tataatcaa taatcaatac 15060
 tcaactgaag tttgtgcagt taattgaagg gattaacggc caaatgcac tagtattatc 15120
 aaccgaatag attcacta gatggccatt tccatcaata tcatcgccgt tcttctctg 15180
 tccacatc cctctgaaa cttgagagac acctgcactt cattgtcctt attacgtgtt 15240
 acaaatgaa acccatgcat ccatgcaaac tgaagaatgg cgcaagaacc cttcccctcc 15300
 atttcttatg tggcgaccat ccatttcacc atctcccgt ataaaacacc cccatcactt 15360
 cacctagaac atcatcacta cttgcttatc catccaaaag ataccactt ttacaacaat 15420

ES 2 636 487 T3

taccaacaac aacaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgc 15480
cacctagcgc tgctaagcaa atgggagcct ctactggtgt toatgctggt gttactgact 15540
cttctgcttt caccagaaag gatggtgctg atagacctga tctcaccatc gttggagatt 15600
ctgtttacga tgctaaggct ttcagatctg agcatcctgg tgggtgctcat ttcgtttctt 15660
tgttcggagg aagagatgct actgaggcct tcatggaata ccatagaagg gcttggccta 15720
agtctagaat gtctagattc cacgttggat ctcttgcttc tactgaggaa cctggtgctg 15780
ctgatgaggg ataccttcaa ctttgtgcta ggatcgctaa gatggtgcct tctgtttctt 15840
ctggattcgc tcctgcttct tactgggtta aggctggact tctccttggg tctgctatcg 15900
ctcttgaggc ttacatgctt tacgctggaa agagacttct cccttctatc gttcttgat 15960
ggcttttcgc tcttatcggc cttaacatcc agcatgatgc taaccatggt gctttgtcta 16020
agtctgcttc tgtaaacctt gctcttggac tttgtcagga ttggatcggg ggatctatga 16080
tcctttggct tcaagagcat gttggtatgc accacctcca cactaacgat gttgataagg 16140
atcctgatca aaaggctcac ggtgctctta gactcaagcc tactgatgct tggtcaccta 16200
tgcattggct tcagcatctt taccttttgc ctggtgagac tatgtacgct tccaagcttt 16260
tgttcctoga catctctgag cttggtatgt ggcggtggga gggtagcct atctctaagc 16320
ttgctggata cctctttatg cctcttttgc ttctcaagct taccttctgg gctagattcg 16380
ttgctttgcc tctttacctt gctccttctg ttcatactgc tgtgtgtatc gctgctactg 16440
ttatgactgg atctttctac ctgctttct tcttcttcat ctcccacaac ttcgagggtg 16500
ttgcttctgt tggacctgat ggatctatca cttctatgac tagaggtgct agcttcctta 16560
agagacaagc tgagacttct tctaacgttg gaggacctct tcttgctact cttaacggtg 16620
gactcaacta ccaaattgag catcacttgt tccctagagt tcaccatgga ttctacccta 16680
gacttgctcc tcttggttaag gctgagcttg aggctagagg aatcgagtac aagcactacc 16740
ctactatctg gtctaacctt gcttotacct tcagacatat gtacgctctt ggaagaaggc 16800
ctagatctaa ggctgagtaa tgacaagcct atgtgacgtg aaataataac ggtaaaatat 16860
atgtaataat aataataata aagccacaaa gtgagaatga ggggaagggg aatgtgtaa 16920
tgagccagta gccgggtggtg ctaattttgt atcgtattgt caataaatca tgaatttgt 16980
ggtttttatg tgttttttta aatcatgaat tttaaattt ataaaataat ctccaatcgg 17040
aagaacaaca ttccatatcc atgcatggat gtttctttac ccaaatctag ttcttgagag 17100
gatgaagcat caccgaacag ttctgcaact atocctcaa agctttaaaa tgaacaacaa 17160
ggaacagagc aacgttccaa agatcccaa cgaaacatat tatctatact aatactatat 17220
tattaattac tactgcccgg aatcacaatc cctgaatgat tcctattaac tacaagcctt 17280

ES 2 636 487 T3

gttggcggcg gagaagtgat cggcgcggcg agaagcagcg gactcggaga cgaggccttg 17340
 gaagatctga gtcgaacggg cagaatcagt attttccttc gacgttaatt gatcctacac 17400
 tatgtaggtc atatccatcg ttttaatttt tggccaccat tcaattctgt cttgccttta 17460
 gggatgtgaa tatgaacggc caaggttaaga gaataaaaat aatccaaatt aaagcaagag 17520
 aggccaagta agataatcca aatgtacact tgtcattgcc aaaattagta aaatactcgg 17580
 catattgtat tcccacacat tattaaaata ccgtatatgt attggctgca tttgcatgaa 17640
 taatactacg tgtaagccca aaagaaccca cgtgtagccc atgcaaagtt aacactcacg 17700
 accccattcc tcagtctcca ctatataaac ccaccatccc caatctcacc aaaccacca 17760
 cacaactcac aactcactct cacaccttaa agaaccaatc accaccaaaa attttacaac 17820
 aattaccaac aacaacaac aacaacaac attacaatta catttacaat taccatacca 17880
 tgagcgtgt tactcgttact ggatctgac ctaagaacag aggatcttct agcaacaccg 17940
 agcaagaggt tccaaaagtt gctatcgata ccaacggaaa cgtgttctct gttcctgatt 18000
 tcaccatcaa ggacatcctt ggagctatcc ctcatgagtg ttacgagaga agattggcta 18060
 cctctctcta ctacgtgttc agagatatct tctgcatgct taccaccgga taccttacc 18120
 ataagatcct ttaccctctc ctcatctctt acacctctaa cagcatcctc aagttcactt 18180
 totgggcctt ttacacttac gttcaaggac ttttcggaac cggaatctgg gttctcgtc 18240
 atgagtggtg acatcaagct ttctctgatt acggaatcgt gaacgatttc gttggatgga 18300
 cccttcactc ttaccttatg gttccttact tcagctggaa gtactctcat ggaagcacc 18360
 ataaggctac tggacacatg accagagata tggttttcgt tcctgccacc aaagaggaat 18420
 tcaagaagtc taggaacttc ttcggttaacc tcgctgagta ctctgaggat tctccactta 18480
 gaacccttta cgagcttctt gttcaacaac ttggaggatg gatcgcttac ctcttcgtta 18540
 acgttacagg acaaccttac cctgatgttc cttcttgaa atggaaccac ttctggctta 18600
 cctctccact tttcgagcaa agagatgctc tctacatctt cctttctgat ctggaatcc 18660
 tcaccaggg aatcgttctt actccttggg acaagaaatt cggaggatgg tccttttca 18720
 tcaactggtt cgttccttac atctgggta accactggct cgttttctc acattccttc 18780
 agcacactga tcctactatg cctcattaca acgctgagga atggacttcc gctaagggtg 18840
 ctgctgctac tatcgataga aagttcggat tcacgagacc tcacatcttc catgatatca 18900
 tcgagactca tgtgcttcac cactactggt ctaggatccc attctacaac gctagacctg 18960
 cttctgaggc tatcaagaaa gttatgggaa agcactacag gtctagcgac gagaacatgt 19020
 ggaagtcact ttggaagtct ttcaggtctt gccaatcgt tgacggtgat aacggtgttc 19080
 tcatgttccg taacatcaac aactgcggag ttggagctgc tgagaagtaa tgaaggggtg 19140
 atcgattatg agatcgtaca aagacactgc taggtgtaaa ggatggataa taataataat 19200

ES 2 636 487 T3

aatgagatga atgtgtttta agttagtgta acagctgtaa taaagagaga gagagagaga 19260
gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagaggctga tgaaatgtta tgtatgtttc 19320
ttggttttta aaataaatga aagcacatgc tcgtgtgggt ctatogaatt attcggcggg 19380
tcctgtggga aaaagtccag aagggccgcc gcagctacta ctacaaccaa ggccgtggag 19440
gagggcaaca gagccagcac ttcgatagct gctgcgatga tcttaagcaa ttgaggagcg 19500
agtgcacatg caggggactg gagcgtgcaa tcggccagat gaggcaggac atccagcagc 19560
agggacagca gcaggaagtt gagagtggt cccatcaatc taaacaagtc gctagggacc 19620
ttccgggaca gtgcggcacc cagcctagcc gatgccagct ccaggggcag cagcagtctg 19680
catggttttg aagtggatg cgatgagatc gtataaagac actgctaggt gttaaggatg 19740
ggataataag atgtgtttta agtcattaac cgtaataaaa agagagagag gctgatggaa 19800
tgttatgtat gtatgtttct tggttttta aattaaatgg aaagcacatg ctcgtgtggg 19860
ttctatctcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaatt ttagtttggt attgagtaaa 19920
acaaattoga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 19980
ttttatagaa ttttcttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcattgtaat 20040
atttcgtaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggt tgtacgatca 20100
ctttctatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc 20160
aaaatctatc aaaattotta tatactttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 20220
aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 20280
atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 20340
aatacatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 20400
taaaaaaaaa taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag 20460
attaaaataa tattcatcta aaaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 20520
cgaaccaatc caaaccgata tagttggtt gtttgattt tgatataaac cgaaccaact 20580
cgggtccattt gcaccocctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac 20640
gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 20700
ttaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 20760
agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 20820
aaagaacat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg acaaatatt tttaaaaaaaa 20880
tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc 20940
tctaaagaat ggcagttttc ctttgcattg aactattatg ctcccttctg tacaaaaatt 21000
ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtcctgc aggctagtag attggttggt 21060

ES 2 636 487 T3

tggtttccat gtaccagaag gcttacccta ttagttgaaa gttgaaactt tgttccctac 21120
 tcaattccta gttgtgtaaa tgtatgtata tgtaatgtgt ataaaacgta gtacttaaat 21180
 gactaggagt ggttcttgag accgatgaga gatgggagca gaactaaaga tgatgacata 21240
 attaagaacg aatttgaaag gctcttaggt ttgaatccta ttogagaatg tttttgcaa 21300
 agatagtggc gattttgaac caaagaaaac atttaaaaaa tcagtatccg gttacgttca 21360
 tgcaaataga aagtggctca ggatctgatt gtaatttttag acttaagag tctcttaaga 21420
 ttcaatcctg gctgtgtaca aaactacaaa taatatattt tagactattt ggccttaact 21480
 aaacttccac tcattattta ctgaggttag agaatagact tgogaataaa cacattcccg 21540
 agaaatactc atgatcccat aattagtcag agggatgcc aatcagatct aagaacacac 21600
 attccctcaa attttaatgc acatgtaatc atagtttagc acaattcaaa aataatgtag 21660
 tattaaagac agaaatttgt agactttttt ttggcgtaa aagaagacta agtttatacg 21720
 tacattttat ttttaagtga aaaccgaaat tttccatcga aatatatgaa tttagtatat 21780
 atattttctg aatgtactat tttgctattt tggcaacttt cagtggacta ctactttatt 21840
 acaatgtgta tggatgcatg agtttgagta tacacatgct taaatgcatg ctttgtaaaa 21900
 cgtaacggac cacaaaagag gatccataca aatacatctc atagcttcct ccattatttt 21960
 ccgacacaaa cagagcattt tacaacaatt accaacaaca acaacaaca aacaacatta 22020
 caattacatt tacaattacc ataccatgga atttgcctca cctctcgttg ctatggetca 22080
 agagcagtac getgctatcg atgctgttgt tgctcctgct atcttctctg ctaccgactc 22140
 tattggatgg ggactcaagc ctatctcttc tgctactaag gatctccctc tcggtgaatc 22200
 tcttaccctt cttatccttt ctctcctcgc ttacttcgct atcgttggtt ctggactcgt 22260
 ttaccgtaaa gtgttcccta gaaccgttaa gggacaggat cctttccttc tcaaggctct 22320
 tatgctcgtc cacaaacttt tccttatcgg actcagcctt tacatgtgcc tcaagctcgt 22380
 ttacgaggct tacgtgaaca agtactcctt ctggggaaac gcttacaacc ctgctcaaac 22440
 cgagatggct aaggtgatct ggatcttcta cgtgtccaag atctacgagt tcatggacac 22500
 cttcatcatg cttctcaagg gaaacgttaa ccaggtttcc ttctccatg tttaccacca 22560
 cggatctatc totggaatct ggtgatgat cacttatgct gctccaggtg gagatgctta 22620
 cttctcgtc gctctcaact cttgggttca tgtgtgcatg tacacctact acttcatggc 22680
 tgctgttctt cctaaggacg aaaagaccaa gagaaagtac ctttggtggg gaagatacct 22740
 taccagatg caaatgttcc agttcttcat gaaccttctc caggctgttt acctcctca 22800
 ctcttcttct ccttacccta agttcattgc tcaactcctc gttgtttaca tggttaccct 22860
 cctcatgctt ttoggaaact tctactacat gaagcaccac gcttctaagt gataagggcc 22920
 gcgccatgt gacagatcga aggaagaaag tgtaataaga cgactctcac tactcgatcg 22980

ES 2 636 487 T3

ctagtgattg tcattgttat atataataat gttatctttc acaacttatac gtaatgcatg 23040
 tgaaactata acacattaat cctacttgtc atatgataac actctcccca tttaaaactc 23100
 ttgtcaattt aaagatataa gattctttaa atgattaaaa aaaatatatt ataaattcaa 23160
 tcactcctac taataaatta ttaattatta tttattgatt aaaaaatac ttataactaat 23220
 ttagtctgaa tagaataatt agattctagc ctgcagggcg gccgcggatc ccatggagtc 23280
 aaagattcaa atagaggacc taacagaact cgccgtaaag actggcgaac agttcataca 23340
 gagtctctta cgactcaatg acaagaagaa aatctctgtc aacatgggtg agcacgacac 23400
 acttgtctac tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac 23460
 ttttcaacaa agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca 23520
 ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa 23580
 aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc 23640
 cacgaggagc atcgtgaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg 23700
 atgtgataac tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc 23760
 ttctctata taaggaagtt catttcattt ggagagaaca cgggggactg aattaaatat 23820
 gagccctgag aggcgtcctg ttgaaatcag acctgctact gctgctgata tggctgctgt 23880
 ttgtgataac gtgaaccact acatcgagac ttctaccgtt aacttcagaa ctgagocctca 23940
 aactcctcaa gagtggatcg atgatcttga gagactccaa gatagatacc cttggcttgt 24000
 tgctgagggt gaggggtgtg ttgctggaat cgcttacgct ggaccttggg aggctagaaa 24060
 cgcttacgat tggactgtg agtctaccgt ttacgtttca cacagacatc agagacttgg 24120
 acttggatct accctttaca ctcaccttct caagtctatg gaagctcagg gattcaagtc 24180
 tgttgttctg gttatcggac tccctaacga tccctctgtt agacttcatg aggctcttgg 24240
 atacactgct agaggaactc ttagagctgc tggatacaag cacggtggat ggcattgatgt 24300
 tggattctg caaagagatt tcgagcttcc tgctcctcct agacctgta gaccagttac 24360
 tcagatctga atttgcgtga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat 24420
 cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta 24480
 ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg 24540
 caattataca tttataacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaacta ggataaatta 24600
 tcgcgcgcg tgctatctat gttactagat cactagtgat gtacgggtaa aaccacccca 24660
 gtacattaaa aacgtccgca atgtgttatt aagtgtctc agcgtcaatt tgtttacacc 24720
 acaatatatc ctgccaccag ccagccaaca gctccccgac cggcagctcg gcacaaaatc 24780
 accactcgat acaggcagcc catcagtc 24809

- <210> 6
- <211> 26543
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 636 487 T3

<223> Secuencia nucleotídica pGA7- mod_F

<400> 6

tcoctgtggtt	ggcatgcaca	tacaaatgga	cgaacggata	aaccttttca	cgccctttta	60
aatatccgat	tattctaata	aacgctcttt	tctcttaggt	ttaccgcga	atatatcctg	120
tcaaacactg	atagtttaaa	ctgaaggcgg	gaaacgacaa	tctgctagt	gatctcccag	180
tcacgacggt	gtaaaacggg	cgggcggcgg	cctagaatct	aattattcta	ttcagactaa	240
attagtataa	gtatTTTTTT	aatcaataaa	tattaattaa	taatttatta	gtaggagtga	300
ttgaatttat	aatatTTTT	TTTTaatcat	ttaaagaatc	ttatatcttt	aaattgacaa	360
gagttttaa	tggggagagt	gttatcatat	gacaagtagg	attaatgtgt	tatagtttca	420
catgcattac	gataagttgt	gaaagataac	attattatat	ataacaatga	caatcactag	480
cgatcgagta	gtgagagtcg	tcttattaca	ctttcttctc	tcgatctgtc	acatggcggc	540
ggcccgcgat	cgcgataatt	ctcagtgcgc	cttctccgcc	ttgcggttga	cgtagtagtg	600
ctgcccgacc	ttatccaagt	tcgagaacgt	cgcttccag	gcgcccgaat	aggacagcac	660
cttgtagttc	agccccact	tcttcgcgaa	cgggacgaac	cgccggctca	cctccggctg	720
gcgaaactgc	ggcatgtccg	ggaacaggtg	atgaatgacc	tggcagttca	gatatcccat	780
caaccagttc	acgtaccgcg	gcgacgggtc	gatgtccacg	gtgtgatcga	ccgctagtt	840
caccagctc	aggtgcttat	ccgagggcac	gaccgggagg	tgcgtgtggc	tcgtggagaa	900
gtgcggaag	aggtacatgt	acgggatcca	gttgccgaag	gtgaaccacc	agtacggcac	960
gggccacgag	taccccgctg	cgagtttaat	caccgcggtc	ctgacgacgt	gagagacgag	1020
catccacgac	gcctcctcgt	agttcttctt	tcgcaacacc	tgccgcgggt	gcaggacgta	1080
gatccagaac	gcctggacga	gcagcccgga	ggtcaccggg	acgaacgtcc	acgcctgaag	1140
ccgagcccac	gcgcgggaga	accccctcgg	ccggttgtcc	tccacggcgg	tgttaaaaaa	1200
cgccaccgcg	ggggtcgtgt	ccaggtccat	gtcgtgcctc	actttctgcg	gcgtcgcgtg	1260
gtgcttattg	tgcactcgtt	tccacatctc	cccgcctcgt	gacagcccga	acccgcacgt	1320
catcgcttgg	agggccttgt	cgacgtagac	ggaccccgtg	agcgagttgt	gcccgcctc	1380
gtgctggacc	caaccgcacc	gagcgccgaa	gaacgcgccg	tacacgacgg	acgcgatgat	1440
cggttaccgg	gcgtacatga	gggcggtgcc	gagggcgaag	gtcgcgagga	gctcagagtaa	1500
ccgatacgcg	acgtgcgtta	tcgagggctt	aaagaacccg	tcgcttcgga	gctccgcgcg	1560
ccaccgcgcg	aaatcctcca	acatcggcgc	gtcctcgtc	tcgctcgtt	tgatctccgc	1620

ES 2 636 487 T3

ggggcgcgac ggcagcgcctc tgagcatcctt ccacgcctta agcgatcgca tgtggaactc 1680
 cttgaaocgc tcogtggcgt ccgcgcccgt gttcgcgagc atgtagaata tcacgctgcc 1740
 tcccgggtgt ttgaagtttg tgacgtcgta ctcgacgtcc tccacgcgca cccatcgcgt 1800
 ctcgaaocgc gccgcgagct cgtgcggctc gagcgttttg agatcgacgg gcgcgggtcga 1860
 cgcgtccttg gcgtcgagcg cctccgcgga ggatttgctg cgcgtcagcg gcgatcgcg 1920
 ggacgatcgg ccgtccgtct tcggcgggca catcgtcgcg cgcgcgactt aaaccgacga 1980
 cggacggacg aacctgcaac gggaattat caattgacgc gttgctctgt ttgtgtcgga 2040
 aaataatgga ggaagctatg agatgtattt gcatggatcc tcttttgctg tccgttacgt 2100
 tttgcaaagc atgcatttag acatgtgtat actcaaactc atgcatccat acacattgta 2160
 ataaagtagt agtccactga aagttgcaa aatagcaaaa tagtacattg cagaaatata 2220
 tatactaaat tcatatattt cgatggaaaa tttcggtttt ccaacttaaaa taaaatgtac 2280
 gtataaactt agtcttcctt taacgccaaa aaaaagtcta caaatttctg tctttaatac 2340
 tacattattt ttgaattgtg ctaaactatg attacatgtg cattaaaatt tgagggaaatg 2400
 tgtgttctta gatctgattg gcataccctc tgactaatta tgggatcatg agtatttctc 2460
 gggaaatgtgt ttattcgcaa gtctattctc taacctcagt aaataatgag tggaaagttta 2520
 gttaaggcca aatagtctaa aatatattat ttgtagtttt gtacacagcc aggattgaat 2580
 cttaaagagc tctttaagtc taaaattaca atcagatcct agaccacttt ctatttgcat 2640
 gaacgtaacc ggatactgat tttttaaatg ttttctttgg ttcaaaatcg ccaactatctt 2700
 tgacaaaaac attctcgaat aggattcaaa cctaagagcc tttcaaattc gttcttaatt 2760
 atgtcatcat ctttagttct gctcccatct ctcatoggtc tcaagaacca ctcttagtca 2820
 ttaagtaact acgttttata cgcattacat atacatacat ttacacaact aggaattgag 2880
 tagggaacaa agtttcaact ttcaactaat agggtaagcc ttctggtaca tggaaaccaa 2940
 ccaaccaatc tactaggcgg ccgcccgtcg ggatcttctg caagcatctc tatttcctga 3000
 aggtctaacc tcgaagattt aagatttaat tacgtttata attacaaaat tgattctagt 3060
 atctttaatt taatgcttat acattattaa ttaatttagt actttcaatt tgttttcaga 3120
 aattatttta ctatttttta taaaataaaa gggagaaaat ggctatttaa actgaaggcg 3180
 ggaaacgaca atctgctagt ggatctccca gtcacgacgt tgtaaaacgg gcgccccgcg 3240
 gaaagcttgc gccgcgggta ccgcccgttc gactcagatc ttccaaggcc tcgtctccga 3300
 gtccgctgct tctcgcgcg ccgatcactt ctccgcgcgc aacaaggctt gtagttaata 3360
 ggaatcattc agggattgtg attccgggca gtagtaatta ataatatagt attagtatag 3420
 ataatatggt tcgtttgga tctttggaac gttgctctgt tccttggtgt tcattttaaa 3480

ES 2 636 487 T3

gcttttgagg gatagttgca gaactgttcg gtgatgcttc atcctctcaa gaactagatt 3540
tgggtaaaga aacatccatg catggatatg gaatggtgtt cttccgattg gagattatit 3600
tataaaatit aaaattcatg atttaaaaaa acacataaaa accacaaaat tcatgattta 3660
ttgacaatac gatacaaaat tagcaccacc ggctactggc tcattacaca tttccccttc 3720
ccctcattct cactttgtgg ctttattatt attattatta catatattit accgttatta 3780
tttcacgtca cataagcttg ttaattaatc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa 3840
cgtagtagtg ctgtcccacc ttatcaaggt tagagaaagt agccttcaa gcaccgtagt 3900
aagagagcac cttgtagttg agtcccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa 3960
cctcaggctg tctgaattga ggcatatcag ggaagagggtg gtggataacc tgacagttaa 4020
ggtatcccat aagccagttc acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa 4080
cagcgtagtt aaccaagaa aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag 4140
aagtagagaa gtgagcgaaa aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc 4200
agtaagcaac aggccaagag tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat 4260
gagaaaagag catccaagaa gcctcttctg agttcttctt acggagaact tgtctagggt 4320
ggagaacgta gatccagaaa gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc 4380
aagcttgaag tctagcccaa gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag 4440
tgttgaagaa agccacagca ggagtggat caagatccat atcgtgtcta accttttgag 4500
gggtagcatg gtgcttgta tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga 4560
atccacaagt catagcctga agtctcttgt ccacgtaaac agatccggtg agagagttat 4620
gtccaccctc atgttgaacc catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag 4680
aagcaatgat aggtatcca gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa 4740
gctcgagaag tctgtaagcc acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa 4800
gctcagcacg ccatctagcg aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct 4860
tgatctcagc aggtctagaa ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca 4920
tgtggaatc tttgaaagcc tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga 4980
tcacagatcc accagggtgc ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa 5040
cccatctagt ctcgaaagta gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag 5100
gagcagtaga agcatcctta gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg 5160
gagatctagg agaagatctt ccatcagctc taggagggca catggtatgg taattgtaaa 5220
tgtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa attaattaag 5280
tgggtatctt ttggatggat aagcaagtag tgatgatggt ctagggtgaag tgatgggggt 5340
gttttatagc gggagatggg gaaatggatg gtcgccacat aagaaatgga ggggaagggt 5400

ES 2 636 487 T3

tcttgcccca ttcttcagtt tgcattgatg catgggtttc attttgtaac acgtaataag 5460
 gacaatgaag tgcaggtgtc tctcaagttt cagaggggat atgtggacag aagaagaacg 5520
 gcgatgatat tgatggaaat ggccatctag tgtgaatcta ttcggttgat aatactagtg 5580
 cattttggcc gttaatccct tcaattaact gcacaaactt cagttgagta ttgattattt 5640
 gattataggt tctgtaaaca caataccaag tttatttaga ggggagacat acaaatagtt 5700
 tcgatataaa taatagagtg gttaaactta gttattaaaa ctatatataa agtctaaaag 5760
 ttaaattatt tttttaattg caaatatata aagtctaaag gggttacatt atttcttaag 5820
 agatgtaact ctggttgaat ctgacttaat ccgtctcctc actctggttt ccagttctaa 5880
 tctaataaat tgttttctgc caaagaattt gaagcaagaa gtaaattgat caatgccgtc 5940
 aaccacaccc aaaccgtcaa cccactacca tcgccgcgga gacccccaaa ctcaacctcc 6000
 acccatcggg aagaagcaca gggcagcccg caccaccacc aatttggcgt gcatgacacc 6060
 tagggacttg gcacgggagg cggcgcacgt ggatgcaaat gacgggatat cagatgacag 6120
 gaaacgacgt tgagagacca tacgatgtag aatatgagct caccatcaac gagaaactag 6180
 gaaaatcaca aaaaaaaca ctctcgtaat tgtacgagtg gcacagatgg gtctgcctca 6240
 acatatctct aatacggcga agcctgccca acacgtagtt gccggaatcc ggtgtggagc 6300
 tcacgactct gaaagatagg cgcttcctgt ttcgtttgc tcacccactg gacgtccgtc 6360
 atgtgatgga tttcggatcat tggtttctg acaaccacat tctgaagctc catgagatga 6420
 gtcttcacaa taggtcctgc tcaataccgt ggagttatgg ttgcaagtcc ataacttggc 6480
 gttcgaatat tttgcggagc cagtcggacg ggaattggcg agctcggctg acacctataa 6540
 aggccatgac aagaagaacc aaaagttctt ccctaattgct ttcattgaggc ttcgggtcgt 6600
 tatggatgtc ggaaaacccc tcttgaagga acgagacggt attatgcatg acggttaagac 6660
 tattacttgt cagtataagt atgaaagatt acctgtcttc tgctttggtt gtggattgat 6720
 tggacacggt gaaaaaaaaat gtgcacttctg atttcaatac tcagagatcg acttcccttt 6780
 tctctaggag tattcgcata aggcattaac atggaaggaa gctcaagctc taaaggcttc 6840
 acaatggaac ctgaaaaatt tcaacaagcc taaactgaaa tcgaagtcaa atcaccacac 6900
 cgggagctct aaatcagcaa acactcctcc tccacagtat ccaatcatcg tgcacgatgc 6960
 tccaggtatt gcaagccagg tattgcaagc taggagtagg atagagacct taaacgtcgt 7020
 tgggtggaag agtcatcttc agacctaatg gagatagatg tagacggcgg cacgaagact 7080
 ctgaaacacc agaaaggcta gtccaggata aggatctgct atcccaactg acctctcgtt 7140
 agtcccaagg cctctcaact agagcaggag gaaggatggt cacaagacta ggataatgat 7200
 gttccaata tgaacctgaa tgtccatagc taattttttt agtcttgctt ctgcactttt 7260

ES 2 636 487 T3

tgtttattat gttctggtga ctatgttatt tacccttgtc cgtatgcttg aggttacct	7320
agtagattgg ttggttggtt tccatgtacc agaaggctta ccctattagt tgaaagttga	7380
aactttgttc cctactcaat tccatgttgt gtaaagtat gtatatgtaa tgtgtataaa	7440
acgtagtact taaatgacta ggagtggttc ttgagaccga tgagagatgg gagcagaact	7500
aaagatgatg acataattaa gaacgaattt gaaaggctct taggtttgaa tcctattcga	7560
gaatgttttt gtcaaagata gtggcgattt tgaaccaaag aaaacattta aaaaatcagt	7620
atccggttac gttcatgcaa atagaaagtg gtctaggatc tgattgtaat tttagactta	7680
aagagtctct taagattcaa tccctggctgt gtacaaaact acaaataata tatttttagac	7740
tattttggcct taactaaact tccactcatt atttactgag gttagagaat agacttgcca	7800
ataaacacat tcccagagaa tactcatgat cccataatta gtcagagggg atgccaatca	7860
gatctaagaa cacacattcc ctcaaatttt aatgcacatg taatcatagt ttagcacaat	7920
tcaaaaataa tgtagtatta aagacagaaa tttgtagact tttttttggc gtaaaaagaa	7980
gactaagttt atacgtacat tttattttta gtggaaaacc gaaattttcc atcgaaatat	8040
atgaatttag tatatatatt tctgcaatgt actattttgc tattttggca actttcagt	8100
gactactact ttattacaat gtgtatggat gcatgagttt gagtatacac atgtctaaat	8160
gcatgctttg taaaacgtaa cggaccacaa aagaggatcc atacaaatac atctcatagc	8220
ttcctccatt attttccgac acaaacagag cattttacaa caattaccaa caacaacaaa	8280
caacaacaaa cattacaatt acatttacia ttaccatacc atggcctcta tcgctatccc	8340
tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat gtggctaacc ctgatatccc	8400
agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag tactggggac ctactatcgg	8460
aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt atcatgcaga acagatctca	8520
acctttcggg ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc taccagacct tcttcaacag	8580
ctactgcac taccctttcg ttacttctca tagggctcag ggacttaagg tttggggaaa	8640
catccctgat atgactgcta actcctgggg aatctctcag gttatctggc ttcactacia	8700
caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg atgaggaaga agttcgacca	8760
gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcacc tggtcacggt tcgttggtat	8820
gaagcttgag cctggttgag attgctactt cggatcttct gttaaacacct tcgtgcacgt	8880
gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttgagtt aactgtttct ggaagaagta	8940
catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct tctcactcta tctacaccgc	9000
ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttacctcaa ctctgggtta tgggtaacat	9060
gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag tctaaggggtg ctaagaagca	9120
gtgataaggc gcgcggcgcg ccgggcccgc gccatgtgac agatcgaagg aagaaagtgt	9180

ES 2 636 487 T3

aataagacga ctctcactac tcgatcgcta gtgattgtca ttgttatata taataatggt 9240
atctttcaca acttatcgta atgcatgtga aactataaca cattaatcct acttgtcata 9300
tgataacact ctccccattt aaaactcttg tcaatttaaa gatataagat tctttaaatg 9360
attaaaaaaa atatattata aattcaatca ctccactaa taaattatta attattattt 9420
attgattaaa aaaatactta tactaattta gtctgaatag aataattaga ttctagtctc 9480
atcccccttt aaaccaactt agtaaacggt tttttttta attttatgaa gtttaagttt 9540
taccttgttt ttaaaaagaa tcgttcataa gatgccatgc cagaacatta gctacacggt 9600
acacatagca tgcagccgcg gagaattggt tttcttcgcc acttgtcact cccttcaaac 9660
acctaagagc ttctctctca cagcacacac atacaatcac atgcgtgcat gcattattac 9720
acgtgatcgc catgcaaact tcctttatag cctataaatt aactcatccg ctccactctt 9780
tactcaaacc aaaactcctc gatacaaaca agattaaaaa catacacgag gatcttttac 9840
aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattaaa ttacatttac aattaccata 9900
ccatgcctcc aagggactct tactcttatg ctgctcctcc ttctgctcaa ctccacgaag 9960
ttgatactcc tcaagagcac gacaagaaag agcttgttat cggagatagg gcttacgatg 10020
ttaccaactt cgtaagaga caccctggtg gaaagatcat tgcttaccaa gttggaactg 10080
atgctaccga tgcttacaag cagttccatg ttagatctgc taaggctgac aagatgctta 10140
agtctcttcc ttctcgtcct gttcacaagg gatactctcc aagaagggt gatcttatcg 10200
ctgatttcca agagttcacc aagcaacttg aggtgaggg aatgttcgag cctctcttc 10260
ctcatgttgc ttacagactt gctgagggta tcgctatgca tgttctggt gctgctctta 10320
tctggcatgg atacactttc gctggaatcg ctatgcttgg agttgttcag ggaagatgtg 10380
gatggcttat gcatgagggt ggacattact ctctcaactg aacattgct ttcgacagag 10440
ctatccaagt tgcttgttac ggacttggat gtggaatgtc tgggtcttgg tggcgttaacc 10500
agcataaaaa gcaccatgct actcctcaa agcttcagca cgatgttgat cttgatacc 10560
ttcctctcgt tgctttccat gagagaatcg ctgctaaggt taagtctcct gctatgaagg 10620
cttggctttc tatgcaagct aagcttttcg ctctgttac cactctctt gttgctcttg 10680
gatggcagct ttaccttcat cctagacaca tgctcaggac taagcactac gatgagcttg 10740
ctatgctcgg aatcagatac ggacttgttg gataccttgc tgctaactac ggtgctggat 10800
acgttctcgc ttgttacctt ctttacgctc agcttggagc tatgtacatc ttctgcaact 10860
tcgctgtttc tcatactcac ctccctggtt ttgagcctaa cgagcatgct acttgggttg 10920
agtaogctgc taaccacact actaactggt ctccatcttg gtggtgtgat tgggtgatgt 10980
cttaccttaa ctaccagatc gagcaccacc tttacccttc tatgcctcaa ttcagacacc 11040

ES 2 636 487 T3

ctaagatcgc tcttagagtt aagcagcttt tcgagaagca cggacttcac tacgatgtta 11100
 gaggatactt cgaggetatg gctgatactt tcgctaacct tgataacggt gcccatgctc 11160
 ctgagaagaa aatgcagtaa tgagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat 11220
 tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctggtgaat tacgtaagc 11280
 acgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag 11340
 tcccgcaatt atacatthaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata 11400
 aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggtc gattaaaaaat cccaattata 11460
 tttggtctaa tttagtttg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aatataaat 11520
 atatagtttt tatatatatg cctttaaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct 11580
 agaaatattt gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt 11640
 tattaacttt aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt 11700
 caatctcttt gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaattctt atatatcttt 11760
 ttcgaatttg aagtgaatt tcgataaatt aaaattaaat agaacatatac attatttagg 11820
 tatcatattg atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa 11880
 cgaaaaatta gtcaaacgac taaaataaat aaatataatg tgttattaag aaaattctcc 11940
 tataagaata ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata 12000
 tatttactta tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct acaaaaaaaaa 12060
 aaaccagaaa atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttgggt 12120
 tggtttgatt ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaacccta atcataatag 12180
 ctttaatat tcaagatatt attaagtaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa 12240
 tgaatcaagc ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat 12300
 gtaatttact tgattctaaa aaaatatccc agtattaat aatttctgct aggaagaagg 12360
 ttagctacga tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa 12420
 atatacgaag gaacaaatat ttttaaaaa atacgcaatg acttggaca aaagaaagt 12480
 atatattttt tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg 12540
 taactattat gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa 12600
 aatagtgata gaaccacac gagcatgtgc tttccattta attttaaaaa ccaagaaaca 12660
 tacatacata acattccatc agcctctctc tctttttatt acggttaatg acttaaaaca 12720
 catcttatta tcccatcctt aacacctagc agtgtcttta taogatctca togatcacca 12780
 cttcaaaaac atgcgactg ctgctgcccc tggagctggc atcggctagg ctgggtgccg 12840
 cactgtcccg gaaggtccct agcgacttgt ttagattgat gggaccacct ctcaacttcc 12900
 tgctgctgtc cctgctgctg gatgtcctgc ctcatctggc cgattgcacg ctccagtccc 12960

ES 2 636 487 T3

ctgcatgtgc actcgetcct caattgctta agatcatcgc agcagctatc gaagtgctgg 13020
 ctctgttgcc ctccctccacg gccttggttg tagtagtagc tgccgccgcc cttctggact 13080
 ttttcccaca ggaaccgccc aataattcga tagaaccaca cgagcatgtg ctttcattta 13140
 ttttaaaaac caagaaacat acataacatt tcatcagcct ctctctctct ctctctctct 13200
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ttattacagc tgttacacta acttaaaaca 13260
 cattcatctc attattatta ttattatcca tccttaacac ctacgagtgt ctttgtacga 13320
 tctcataatc gatcaccocct tcatcaggta tccttaggct tcaactccaac gttgttgagc 13380
 ttacggaaca tgtacacacc atcatgggtc tcaacgaact ggcaagatct ccaagttttc 13440
 caaaggctaa cccacatggt ctcatcggtg tctctgtagt gctctcccat aactttcttg 13500
 atgcactcgg tagcttctct agcatggtag aatgggatcc ttgaaacgta gtgatggagc 13560
 acatgagtct cgatgatgtc atggaagatg attccgagga ttccgaactc tctatcgata 13620
 gtagcagcag cacccttagc gaaagtccac tcttgagcat cgtaatgagg catagaagaa 13680
 tcggtgtgct gaaggaaggt aacgaaaaca agccagtggt taacaaggat ccaaggacag 13740
 aaccatgtga tgaaagtagg ccagaatccg aaaaccttgt aagcgggtgta aacagaagtg 13800
 agggtagcaa ggattccaag atcagaaaga acgatgtacc agtagtcctt cttatcgaaa 13860
 acagggctag aaggccagta gtgagacttg aagaacttag aacaccagg gtaaggttgt 13920
 ccagtagcgt tagtagcaag gtaaagagaa agtcctccaa gctggtggaa caagagagcg 13980
 aaaacagagt agataggagt ttctcagcg atatcgtgaa ggctggtaac ttggtgcttc 14040
 tctttgaatt cctcggcggt gtaaggaacg aaaaccatat ctctgggtcat gtgtccagta 14100
 gccttatggt gcttagcatg agagaacttc cagctgaagt aaggaacct aacaagagag 14160
 tggagaacct atccaacggt atcgttaacc catccgtagt tagagaaagc agaatgtcca 14220
 cactcatgtc caaggatcca gattccgaat ccgaaacaag agatagagaa cacgtaagca 14280
 gaccaagcag cgaatctaag gaattcgta gggagaagag ggatgtaggt aagtccaacg 14340
 taagcgatag cagagatagc cacgatatct ctaccacgt aagacataga cttcacgaga 14400
 gatctctcgt aacagtgctt agggatagcg tcaaggatat ccttgatggt gtaatctggc 14460
 accttgaaaa cgtttccgaa ggtatcgata gcggtctttt gctgcttgaa agatgcaacg 14520
 tttccagaac gcctaacggt cttagtagat cctcaagga tctcagatcc agacacggta 14580
 accttagaca tggtatggta attgtaaata taattgtaat gttgtttgtt gtttgttgtt 14640
 gttggttaatt gttgtaaaat ttttgggtgt gattggttct ttaagggtgtg agagtgagtt 14700
 gtgagttgtg tgggtgggtt ggtgagattg gggatggtgg gtttatatag tggagactga 14760
 ggaatggggt cgtgagtggt aactttgcat gggctacacg tgggttcttt tgggcttaca 14820

ES 2 636 487 T3

cgtagtatta ttcgatgcaa tgcagccaat acatatacgg tattttaata atgtgtggga 14880
 atacaatatg ccgagtatgt tactaatttt ggcaatgaca agtgtacatt tggattatct 14940
 tacttggcct ctcttgcttt aatttggatt atttttattc tottaccttg gccgttcata 15000
 ttcacatccc taaaggcaag acagaattga atggtggcca aaaattaaaa cgatggatat 15060
 gacctacata gtgtaggatc aattaacgtc gaaggaaaat actgattctc tcaagcatac 15120
 ggacaagggt aaataacata gtcaccagaa cataataaac aaaaagtgca gaagcaagac 15180
 taaaaaatt agctatggac attcagggtc atattggaaa catcattatc ctagtcttgt 15240
 gaccatcctt cctcctgctc tagttgagag gccttgggac taacgagagc tcagttggga 15300
 tagcagatcc ttatcctgga ctagcctttc tgggtgttca gagtcttctg gccgctctc 15360
 acatctatct ccattaggtc tgaagatgac tottcacacc aacgacgttt aaggctctca 15420
 tctactcct agcttgcaat acctggcttg caatacctgg agcatcgtc acgatgattg 15480
 gatactgtgg aggaggagtg tttgctgatt tagagctccc ggttgggtga tttgactctg 15540
 atttcagttt aggcttgttg aaatttttca ggttccattg tgaagccttt agagcttgag 15600
 cttccttcca tgttaatgcc ttgatogaat actoctagag aaaaggggaag togatctctg 15660
 agtattgaaa tcgaagtgca ctttttttt caacgtgtcc aatcaatcca caaacaagc 15720
 agaagacagg taatctttca tacttatact gacaagtaat agtcttaccg tcatgcataa 15780
 taacgtctcg ttccttcaag aggggttttc cgacatccat aacgaccoga agcctcatga 15840
 aagcattagg gaagaacttt tggttcttct tgtcatggcc tttatagggtg tcagccgagc 15900
 tcgccaattc ccgtccgact ggctccgcaa aatattcgaa cggcaagtta tggacttgca 15960
 accataactc cacggtattg agcaggacct attgtgaaga ctcatctcat ggagcttcag 16020
 aatgtggttg tcagcaaacc aatgaccgaa atccatcaca tgacggacgt ccagtgggtg 16080
 agcgaacga aacaggaagc gcctatcttt cagagtcgtg agtccacac cggattccgg 16140
 caactacgtg ttgggcaggc ttcgccgtat tagagatatg ttgaggcaga cccatctgtg 16200
 ccactcgtac aattacgaga gttgtttttt ttgtgatttt cctagtttct cgttgatggt 16260
 gagctcatat tctacatcgt atggtctctc aacgtcgttt cctgtcatct gatatccgt 16320
 catttgcac cactgctgcc gcctcccgtg ccaagtccct aggtgtcatg cacgccaaat 16380
 tgggtggtgt gcgggctgcc ctgtgcttct taccgatggg tggaggttga gtttgggggt 16440
 ctccgcccgc atggtagtgg gttgacggtt tgggtgtgggt tgacggcatt gatcaattta 16500
 cttcttgctt caaattcttt ggcagaaaac aattcattag attagaactg gaaaccagag 16560
 tgatgagacg gattaagtca gattccaaca gagttacatc tottaagaaa taatgtaacc 16620
 cctttagact ttatatatgt gcaattaaaa aaataattta acttttagac tttatatata 16680
 gttttaataa ctaagtttaa ccactctatt atttatatog aaactatttg tatgtctccc 16740

ES 2 636 487 T3

ctctaaataa acttggattt gtgtttacag aacctataat caaataatca atactcaact 16800
 gaagtttgtg cagttaattg aagggattaa cggccaaaat gcactagtat tatcaaccga 16860
 atagattcac actagatggc catttccatc aatatcatcg cggttcttct tctgtccaca 16920
 tatcccctct gaaacttgag agacacctgc acttcattgt ccttattacg tgttacaaaa 16980
 tgaaacccat gcatccatgc aaactgaaga atggcgcaag aacccttccc ctccatttct 17040
 tatgtggcga ccatccattt caccatctcc cgctataaaa cacccttccc acttcaccta 17100
 gaacatcatc actacttgct tatccatcca aaagataccc acttttacia caattaccaa 17160
 caacaacaaa caacaacaaa cattacaatt acatttacia ttaccatacc atgccaccta 17220
 gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tgggtttact gactcttctg 17280
 ctttcaccag aaaggatggt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga gattctgttt 17340
 acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctgggtgggc tcatttcggt tctttgttog 17400
 gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggtctgg cctaagtcta 17460
 gaatgtctag attccacggt ggatctcttg ctttactga ggaacctggt gctgctgatg 17520
 agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctggt tcttctggat 17580
 tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct atcgctcttg 17640
 aggcttacat gctttacgct gaaagagac ttctcccttc tatcgttctt ggatggcttt 17700
 tcgctcttat cggctttaac atccagcatg atgctaacca tgggtgcttg tctaagtctg 17760
 cttctgttaa ccttgcctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct atgatccttt 17820
 ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat aaggatcctg 17880
 atcaaaaggc tcacgggtgct cttagactca agcctactga tgcttggca cctatgcatt 17940
 ggcttcagca tctttacctt ttgcctgggtg agactatgta cgttttcaag cttttgttcc 18000
 togacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggaggggtga gcctatctct aagcttgctg 18060
 gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga ttcgttctt 18120
 tgctctttaa ccttgcctct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct actgttatga 18180
 ctggatcttt ctacctgct ttcttcttct tcatctcca caacttcgag ggtgttctt 18240
 ctgttgacc tgatggatct atcaacttca tgactagagg tgctagcttc cttagagac 18300
 aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactctaac ggtggactca 18360
 actaccaa at tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac cctagacttg 18420
 ctctcttctg taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac taccctacta 18480
 tctggcttaa ccttgcctct acctcagac atatgtacgc tcttgaaga aggcctagat 18540
 ctaaggctga gtaatgaaa gcttatgtga cgtgaaataa taacggtaaa atatatgtaa 18600

ES 2 636 487 T3

taataataat aataaagcca caaagtgaga atgaggggaa ggggaaatgt gtaatgagcc 18660
 agtagccggt ggtgctaatt ttgtatcgta ttgtcaataa atcatgaatt ttgtggtttt 18720
 tatgtgtttt tttaaatcat gaatttttaa ttttataaaa taatctccaa tcggaagaac 18780
 aacattccat atccatgcat ggatgtttct ttacccaaat ctagtctctg agaggatgaa 18840
 gcatcaccga acagtctcgc aactatccct caaaagcttt aaaatgaaca acaaggaaca 18900
 gagcaacggt ccaaagatcc caaacgaaac atattatcta tactaatact atattattaa 18960
 ttactactgc ccggaatcac aatccctgaa tgattcctat taactacaag ccttgttggc 19020
 ggcggagaag tgatcggcgc ggcgagaagc agcggactcg gagacgagc cttggaagat 19080
 ctgagtcgaa cgggcagaat cagtattttc cttcgacggt aattgatcct acactatgta 19140
 ggtcatatcc atcgttttaa tttttggcca ccattcaatt ctgtcttgcc tttagggatg 19200
 tgaatatgaa cggccaaggt aagagaataa aaataatcca aattaaagca agagaggcca 19260
 agtaagataa tccaaatgta cacttgtcat tgccaaaatt agtaaaatac tcggcatatt 19320
 gtattcccac acattattaa aataccgtat atgtattggc tgcatttgca tgaataatac 19380
 tacgtgtaag cccaaaagaa cccacgtgta gcccatgcaa agttaacact caccgaccca 19440
 ttctcagtc tccactatat aaaccacca tcccacatct caccaaaccc accacacaac 19500
 tcacaactca ctctcacacc ttaaagaacc aatcaccacc aaaaatttta caacaattac 19560
 caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attacattta caattaccat accatgagcg 19620
 ctgttacggt tactggatct gatcctaaga acagaggatc ttctagcaac accgagcaag 19680
 aggttccaaa agttgctatc gataccaacg gaaacgtggt ctctgttcct gatttcacca 19740
 tcaaggacat ccttgagct atccctcatg agtgttacga gagaagattg gctacctctc 19800
 tctactacgt gttcagagat atcttctgca tgcttaccac cggatacctt acccataaga 19860
 tcctttacco tctctcatc tcttacacct ctaacagcat catcaagttc actttctggg 19920
 ccctttacac ttacgttcaa ggacttttcg gaaccggaat ctgggttctc gctcatgagt 19980
 gtggacatca agctttctct gattacggaa tcgtgaacga tttcgttga tggacccttc 20040
 actcttacct tatggttctt tacttcagct ggaagtactc tcatggaaag caccataagg 20100
 ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctgc caccaaagag gaattcaaga 20160
 agtctaggaa cttcttcggt aacctcgctg agtactctga ggattctcca cttagaaccc 20220
 tttacgagct tcttgttcaa caacttgag gatggatcgc ttacctctc gttaacgtta 20280
 caggacaacc ttaccctgat gttccttctt gaaatggaa ccacttctgg cttacctctc 20340
 cacttttcga gcaaagagat gctctctaca tcttccttc tgatcttga atcctcacc 20400
 agggaatcgt tcttactctt tggtaacaaga aattcggag atggtcctt tcatcaact 20460
 ggttcggtcc ttacatctgg gtaaccact ggctcgtttt catcacatc cttcagcaca 20520

ES 2 636 487 T3

ctgatoctac tatgcctcat tacaacgctg aggaatggac tttcgctaag ggtgctgctg 20580
 ctactatoga tagaaagttc ggattcatcg gacctcacat cttccatgat atcatcgaga 20640
 ctcatgtgct tcaccaactac tgttctagga tcccattcta caacgctaga cctgcttctg 20700
 aggctatcaa gaaagttatg ggaaagcact acaggtctag cgacgagaac atgtggaagt 20760
 cactttggaa gtctttcagg tcttgccaat acggtgacgg tgataacggg gttctcatgt 20820
 tccgtaacat caacaactgc ggagttggag ctgctgagaa gtaatgaagg ggtgatcgat 20880
 tatgagatcg tacaagaca ctgctaggtg ttaaggatgg ataataataa taataatgag 20940
 atgaatgtgt tttaagttag tgtaacagct gtaataaaga gagagagaga gagagagaga 21000
 gagagagaga gagagagaga gagagagagg ctgatgaaat gttatgtatg tttcttggtt 21060
 tttaaaataa atgaaagcac atgctcgtgt ggttctatcg aattattcgg cggttcctgt 21120
 gggaaaagt ccagaagggc cgccgagct actactaaa ccaaggcctg ggaggagggc 21180
 aacagagcca gcaactogat agctgctgcg atgatcttaa gcaattgagg agcgagtgca 21240
 catgcagggg actggagcgt gcaatcgcc agatgaggca ggacatccag cagcagggac 21300
 agcagcagga agtgagagg tggcccac atctaaaca agtcgctagg gaccttccgg 21360
 gacagtggg caccagcct agccgatgcc agctccagg gcagcagcag tctgcatggt 21420
 tttgaagtgg tgatogatga gatcgtataa agacactgct aggtgttaag gatgggataa 21480
 taagatgtgt tttaagtc ataccgtaat aaaaagagag agaggctgat ggaatgttat 21540
 gtatgtatgt ttcttggtt ttaaaattaa atggaaagca catgctcgtg tgggttctat 21600
 ctogatataa aatcccaatt atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat 21660
 tcgaaccaa ccaaaatata aatatatagt tttatata atgccttaa gactttttat 21720
 agaattttct taaaaaata tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg 21780
 ttaaatatga agtgctccat tttattaac ttaataaat tggttgtacg atcactttct 21840
 tatcaagtgt tactaaaatg cgtcaatctc tttgttctc catattcata tgtcaaaatc 21900
 tatcaaaatt cttatatatc tttttogaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta 21960
 aatagaacat atcattatth aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg 22020
 ttaactttga aagtgtacat caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc 22080
 atgtgttatt aagaaaattc tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa 22140
 aaattaatth ttactaacac atatatthac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa 22200
 ataatttca tctaacaaaa aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc 22260
 aatccaaacc gatatagttg gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggctc 22320
 atttgcacc ctaatcataa tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttctc 22380

ES 2 636 487 T3

aatatcctgg aaatTTTgca aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaattTaaaa 22440
gcagctcgat gtggtggtaa tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt 22500
aataatTTct gctaggaaga aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaaagaa 22560
ccataaagtg attgaagctc gaaatatacg aaggaacaaa tattTTTaaa aaaatacgca 22620
atgacttggg acaaaagaaa gtgatataat tTTTgttctt aaacaagcat cccctctaaa 22680
gaatggcagt tTcctTTTgc atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattTTTggac 22740
tactattggg aactTcttct gaaaatagtc ctgcaggcta gtagattggg tggTTggTTt 22800
ccatgtacca gaaggcttac cctattagtt gaaagtgaa actTTgtTcc ctactcaatt 22860
cctagtTtgTg taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag 22920
gagtgttct tGagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag 22980
aacgaattTg aaaggctctt aggtTTgaaT cctattcgag aatgTTTTg tcaaagatag 23040
TggcgattTt gaaccaaaga aacattTaa aaaatcagta tccggtTacg tTcatgcaaa 23100
tagaaagtgg tctaggatct gattgtaatt ttagactTaa agagtctctt aagattcaat 23160
cctggctgtg taaaaacta caaataatat atTTtagact attTggcctt aactaaactt 23220
ccactcatta tTactgagg ttagagaata gactTgcgaa taaacacatt cccgagaaat 23280
actcatgatc ccataattag tcagagggtg tgccaatcag atctaagaac acacattccc 23340
tcaaattTta atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa 23400
agacagaaat tTtagactt tTTTtTggcg tTaaagaag actaagTta tacgtacatt 23460
tTattTtaag Tggaaaaccg aaattTcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt 23520
ctgcaatgta ctattTTgct atTTTggcaa cTTTcagTgg actactactt tattacaatg 23580
Tgtatggatg catgagTTTg agtatacaca Tgtctaaatg catgctTTgt aaaacgtaac 23640
ggaccacaaa agaggatcca tacaataca tctcatagct tcctccatta tTTTccgaca 23700
caaacagagc atTTTacaac aattaccaac aacaacaaac acaaaacaac attacaatta 23760
cattTacaat taccatacca TggaattTgc tcaacctctc gTTgctatgg ctcaagagca 23820
gtacgctgct atcgatgctg tTgtTgctcc Tgctatcttc tctgctaccg actctattgg 23880
atggggactc aagcctatct cTtctgctac taaggatctc cctctgTtg aatctcctac 23940
ccctcttata cTtctctcc tggcttactt ogctatcgTt ggttctggac tcgTTTaccg 24000
taaagtgttc cctagaaccg ttaagggaca ggatcctTtc cTtctcaagg ctcttatgct 24060
cgctcacaac gTTTtccTta tcggactcag cTTTtacaTg Tgcctcaagc tcgTTTaccg 24120
ggctTaccgtg aacaagtact cTtctgggg aaacgctTac aacctgctc aaaccgagat 24180
ggctaaggTg atctggatct tctacgtgtc caagatctac gagTtcatgg acacctTcat 24240
catgcttctc aagggaacg ttaaccaggt tTcctTctc catgTTTacc accacggatc 24300

ES 2 636 487 T3

tatctctgga atctggtgga tgatcactta tgetgctcca ggtggagatg cttacttctc	24360
tgctgctctc aactcttggg ttcatgtgtg catgtacacc tactacttca tggctgctgt	24420
tcttcctaag gacgaaaaga ccaagagaaa gtaccttggg tggggaagat accttaccba	24480
gatgcaaagt ttccagttct tcatgaacct tctccaggct gtttacctcc tctactcttc	24540
ttctccttac cctaagttca ttgctcaact cctcgttggt tacatgggta ccctcctcat	24600
gcttttcgga aacttctact acatgaagca ccacgcttct aagtgataag ggccgcccgc	24660
atgtgacaga togaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg	24720
attgtcattg ttatatataa taatgttctc ttccacaact tatcgtaatg catgtgaaac	24780
tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca	24840
atttaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaata tattataaat tcaatcactc	24900
ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc	24960
tgaatagaat aattagatc tagcctgcag ggcggccgcg gatcccatgg agtcaaagat	25020
tcaaatagag gacctaacag aactcgccgt aaagactggc gaacagttca tacagagtct	25080
cttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acacacttgt	25140
ctactccaaa aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca	25200
acaaagggtg atatccgga acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat	25260
tgtgaagata gtgaaaaggt aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa	25320
ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggccccaaa gatggacccc caccacgag	25380
gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga	25440
tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttogcaag acccttctc	25500
tatataagga agttcatttc atttggagag aacacggggg actgaattaa atatgagccc	25560
tgagagggct cctgttgaaa tcagacctgc tactgctgct gatatggctg ctgtttgtga	25620
tatcgtgaac cactacatcg agacttctac cgttaacttc agaactgagc ctcaaactcc	25680
tcaagagtgg atcgatgatc ttgagagact ccaagataga tacccttggc ttgttgctga	25740
ggttgagggt gttgttgctg gaatcgotta cgctggacct tgggaaggcta gaaacgctta	25800
cgattggact gttgagtcta ccgtttacgt ttcacacaga catcagagac ttggacttgg	25860
atctaccctt tacactcacc ttctcaagtc tatggaagct cagggattca agtctgttgt	25920
tgctgttctc ggactcccta acgatccttc tgtagactt catgaggctc ttggatacac	25980
tgctagagga actccttagag ctgctggata caagcacggg ggatggcatg atgttgatt	26040
ctggcaaaga gatttcgagc ttctcgtctc tcctagacct gttagaccag ttactcagat	26100
ctgaatttgc gtgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt	26160

ES 2 636 487 T3

gocggtcttg cgatgattat catataatth ctggtgaatt acgtaagca tgtaataatt 26220
aacatgtaat gcatgacgth atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 26280
tacatthaat acgcataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 26340
gcggtgtcat ctatgttact agatcactag tgatgtacgg ttaaaaccac cccagtacat 26400
taaaaacgth cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgthta caccacaata 26460
tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctcggcacia aatcaccact 26520
cgatacaggc agcccatcag tcc 26543

<210> 7
<211> 23760
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia nucleotídica pGA7- mod_G

<400> 7

tactgtggtt ggcattgaca tacaatgga cgaacggata aactttttca cgcctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcga atatatcctg 120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacia tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgth gtaaaacggg cgcctcggg aaagcttgcg gccgcggtag cgcctgttcg 240
actcagatct tccaagcct cgtctccgag tccgctgctt ctgcgcgcgc cgatcacttc 300
tccgcgcga acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360
tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgtht cgtttgggat ctttggaacg 420
ttgctctgth ccttgthgtt cattttaaag cthttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480
tgatgcttca tcctctcaag aactagatth gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540
aatgtthtth ttccgatttg agattattht aaaaatthta aattcatga thtaaaaaaa 600
cacataaaaa ccacaaaatt catgatttht tgacaatagc atacaaaatt agcaccaccg 660
gctactggct cattacacat thccctthc cctcattctc actthgtggc thtattatta 720
thattattac atathththt cgtthattat thcacgtcac athagcttht taattaatta 780
tactgctthc thagcaccct tagactthgta cctcttagc tagaagthtg cgaagagaac 840
gaacatgthc accataacc agagthgaag gtaaggaagc cagaaagcgg tattctgaac 900
gtaagcggth tagatagagth gagaagcaca gatacagaac tgaagcatct ggatctgggt 960
gatgtactth thccagaaac agthtaactc aagagcagca agthccgtagt aagagthacat 1020
gatcacgthc acgaagthgt taacagaaga thcgaagtag caatctcaa caggctcaag 1080
cttcataaca acgaacctg accagatgag aagagthgtg thgtagatgt gaaggaaaga 1140
aagctgthc aactctthc thcatccat gaagaagtht thgagaagct caacgtactth 1200

ES 2 636 487 T3

gttggttag tgaagccaga taacctgaga gattcccca gagttagcag tcatatcagg 1260
 gatgtttccc caaaccttaa gtccctgagc cctatgagaa gtaacgaaaa ggtagatgca 1320
 gtagctggtg aagaaggtct ggtagaagtt gtaaacgagc atagcgttct tgagtccgaa 1380
 aggttgagat ctgttctgca tgatagcctt tccgaagtag atgaagagga ggtatccaat 1440
 agttccgata gtaggtcccc agtactcaac ctgcatgaag taagcaggaa ctttctcaga 1500
 agctgggata tcagggtag ccacattgta ggtaacgtat ccaagagttc cagcaagagc 1560
 agcagggata gcgatagagg ccatggtatg gtaattgtaa atgtaattgt aatggtgttt 1620
 gttgtttggt gttgttggtg attgttgtaa aattaattaa gtgggtatct tttggatgga 1680
 taagcaagta gtgatgatgt tctaggtgaa gtgatggggg tgttttatag cgggagatgg 1740
 tgaaatggat ggtcgccaca taagaaatgg aggggaaggg ttcttgcgcc attcttcagt 1800
 ttgcatggat gcatgggttt cattttgtaa cacgtaataa ggacaatgaa gtgcaggtgt 1860
 ctctcaagtt tcagagggga tatgtggaca gaagaagaac ggcgatgata ttgatgaaa 1920
 tggccatcta gtgtgaatct attcggttga taatactagt gcattttggc cgtaaatccc 1980
 ttcaattaac tgcacaaact tcagttgagt attgattatt tgattatagg ttctgtaaac 2040
 acaataccaa gtttatttag aggggagaca tacaaatagt ttcgatataa ataatagagt 2100
 ggttaaactt agttattaaa actatatata aagtctaaaa gttaaattat ttttttaatt 2160
 gcaaataat aaagtctaaa ggggttacat tatttcttaa gagatgtaac tctggtggaa 2220
 tctgacttaa tccgtctcat cactctggtt tccagttcta atctaataa ttgttttctg 2280
 ccaaagaatt tgaagcaaga agtaaattga tcaatgccgt caaccacac caaacctca 2340
 acccactacc atcgccgcgg agaccccaa actcaacctc caccatcgg taagaagcac 2400
 agggcagccc gcaccaccac caatttggcg tgcatgacac ctagggactt ggcaaggag 2460
 gcggcgcacg tggatgcaaa tgacgggata tcagatgaca ggaaacgacg ttgagagacc 2520
 atacgatgta gaatatgagc tcaccatcaa cgagaaacta ggaaatcac aaaaaaaca 2580
 actctcgtaa ttgtacgagt ggcacagatg ggtctgcctc aacatatctc taatacggcg 2640
 aagcctgcc aacacgtagt tgccggaatc cgggtgtggag ctcaogactc tgaagatag 2700
 gcgcttcctg tttogtttcg ctcaaccact ggacgtccgt catgtgatgg atttcggtca 2760
 ttggtttgct gacaaccaca ttctgaagct ccatgagatg agtcttcaca ataggtcctg 2820
 ctcaataccg tggagttatg gttgcaagtc cataacttgc cgttcgaata ttttgcggag 2880
 ccagtcggac gggaaattggc gagctcggct gacacctata aaggccatga caagaagaac 2940
 caaaagttct tccctaagtc tttcatgagg cttcgggtcg ttatggatgt cggaaaacc 3000
 ctcttgaagg aacgagacgt tattatgcat gacggtaaga ctattacttg tcagtataag 3060

ES 2 636 487 T3

tatgaaagat tacctgtctt ctgctttggt tgtggattga ttggacacgt tgaaaaaaaa 3120
tgtgcacttc gatttcaata ctcagagatc gacttcoctt ttctctagga gtattcgatc 3180
aaggcattaa catggaagga agctcaagct ctaaaggctt cacaatggaa cctgaaaaat 3240
ttcaacaagc ctaaactgaa atcgaagtoa aatcacccaa cggggagctc taaatcagca 3300
aacactcctc ctccacagta tccaatcatic gtgcacgatg ctccaggtat tgcaagccag 3360
gtattgcaag ctaggagtag gatagagacc ttaaactcgc ttggtgtgaa gagtcatctt 3420
cagacctaata ggagatagat gtagacggcg gcacgaagac tctgaaacac cagaaaggct 3480
agtccaggat aaggatctgc tatcccaact gacctctcgt tagtccaag gcctctcaac 3540
tagagcagga ggaaggatgg tcacaagact aggataatga tgtttccaat atgaacctga 3600
atgtccatag ctaatttttt tagtcttgct tctgcacttt ttgtttatta tgttctggtg 3660
actatgttat ttacccttgt ccgatgctt gagggtacc tagtagattg gttggttgg 3720
ttccatgtac cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttggt ccctactcaa 3780
ttcctagttg tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact 3840
aggagtgggt cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta 3900
agaacgaatt tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat 3960
agtggcgatt ttgaaccaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca 4020
aatagaaagt ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca 4080
atcctggctg tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac 4140
ttccactcat tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa 4200
atactcatga tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc 4260
cctcaaattt taatgcacat gtaatcatag ttagcaciaa ttcaaaaata atgtagtatt 4320
aaagacagaa atttgtagac tttttttgg cgtaaaaaga agactaagtt tatacgtaca 4380
ttttatttta agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat 4440
ttctgcaatg tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacia 4500
tgtgtatgga tgcattgatt tgagtataca catgtctaaa tgcattgctt gtaaaacgta 4560
acggaccaca aaagaggatc catacaaata catctcatag ctctctccat tattttccga 4620
caciaaacaga gcattttaca acaattacca acaacaacia acaacaacia acattacaat 4680
tacatttaca attaccatac catggaattc gccagcctc ttgttgctat ggctcaagag 4740
caatacgtcg ctatcgtatg tgttgttgc ctctctatct tctctgctac tgattctatc 4800
ggatggggac ttaagcctat ctctctgct actaaggact tgctcttctg tgagtctcct 4860
acacctctca tcctttcttt gcttgcttac tctgctatcg ttggatctgg actcgtttac 4920
agaaaggttt tcctagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg 4980

ES 2 636 487 T3

cttgctcaca acgtgttcoct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac 5040
 gaggcttacg ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag 5100
 atggctaagg ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc 5160
 atcatgctcc tcaagggaaa tgtaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga 5220
 tctatctctg gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc 5280
 tctgctgctc ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc 5340
 gtgcttccta aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact 5400
 caaatgcaga tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct 5460
 tcatctcctt accctaagtt tatcgcctcag ctccctcgtgg tgtacatggt tactcttctc 5520
 atgcttttctg gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg 5580
 ggccgccgcc atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg 5640
 atcgctagtg attgtcattg ttatatataa taatgttata tttcacaact tatcgtaatg 5700
 catgtgaaac tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaa 5760
 actcttgtoa atttaaagat ataagattct ttaaagtatt aaaaaaata tattataaat 5820
 tcaatcactc ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac 5880
 taatttagtc tgaatagaat aattagattc tagtctcctc cccttttaa ccaacttagt 5940
 aaacgttttt ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg 6000
 ttcataagat gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag 6060
 aattgttttt cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag 6120
 cacacacata caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaactctc 6180
 tttatagcct ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat 6240
 acaaacaaga ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaac 6300
 acaaacaac attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac 6360
 tcttatgctg ctccctcttc tgetcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac 6420
 aagaaagagc ttgttatcgg agatagggtt tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac 6480
 cctggtggaa agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag 6540
 ttccatgtta gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctggt 6600
 cacaagggat actctccaag aagggtgat cttatcgtg atttccaaga gttaccaag 6660
 caactgagg ctgagggaaat gttcgagcct tctcttcctc atggtgctta cagacttgct 6720
 gaggttatcg ctatgcatgt tgetggtgct gctcttatct ggcatggata cacttctgct 6780
 ggaatcgcta tgcttgaggt tgttcagggg agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga 6840

ES 2 636 487 T3

cactactctc tcaactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga 6900
 cttggatgtg gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact 6960
 cctcaaaaagc ttcagcaoga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag 7020
 agaatcgctg ctaagggtta gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag 7080
 cttttcgctc ctgtaaccac tcttcttggt gctcttggtt ggcagcttta ccttcatcct 7140
 agacacatgc tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacggg 7200
 cttgttggtt accttgctgc taactacggt gctggatagc ttctcgcttg ttaccttctt 7260
 tacgttcagc ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcaacctc 7320
 cctgttggtt agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact 7380
 aactgttctc catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag 7440
 caccaccttt accttctat gcctcaattc agacacctta agatcgctcc tagagttaag 7500
 cagcttttcg agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttoga ggctatggct 7560
 gatactttcg ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga 7620
 gatcgttcaa acatttgga ataaagtctt ttaagattga atcctggtgc cggctcttgcg 7680
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc 7740
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 7800
 gcgatagaaa acaaaatata ggcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 7860
 atgttactag atcggctgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat 7920
 tgagtaaaac aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct 7980
 ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg 8040
 catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattgggtg 8100
 tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttggt cttccatatt 8160
 catatgtcaa aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg 8220
 ataatttaaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta 8280
 attactaaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa 8340
 aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctoctat aagaatattt taatagatca 8400
 tatgtttgta aaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac 8460
 aaagtaagat taaaataata ttcactaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaacc 8520
 ggcaaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg ttgattttg atataaaccg 8580
 aaccaactcg gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt 8640
 aagttaacgt tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta 8700
 atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa 8760

ES 2 636 487 T3

atatcccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggta gctacgattt acagcaaagc 8820
 cagaatacaa agaaccataa agtgattgaa gctcgaataa tacgaaggaa caaatatfff 8880
 taaaaaata cgcaatgact tggaaacaaa gaaagtgata tattttttgt tcttaaacia 8940
 gcatcccctc taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta 9000
 caaaaatfff ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacaagag 9060
 catgtgcttt ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc 9120
 ctctctctct ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac 9180
 acctagcagt gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg 9240
 ctgcccctgg agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc 9300
 gacttgttta gattgatggg accacctctc aacttctgct tgcctgcctt gctgctggat 9360
 gtctgcctc atctggcga ttgcacgctc cagtcacctg catgtgcact cgctcctcaa 9420
 ttgcttaaga tcatcgagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc 9480
 ttggttgtag tagtagctgc cgccgccctt ctggactfff tcccacagga accgcogaat 9540
 aattcgatag aaccacacga gcatgtgctt tcattatfff taaaaacaa gaaacataca 9600
 taacatttca tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 9660
 tctctcttta ttacagctgt tacactaaat taaaacacat tcatctcatt attattatta 9720
 ttatccatcc ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat caccocctca 9780
 tcaggatcc ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc 9840
 atggttctca acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaacc acatgttctc 9900
 atcgggtgtg ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc 9960
 atggtagaat gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctoga tgatgtcatg 10020
 gaagatgatt ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa 10080
 agtccactct tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac 10140
 gaaaacaagc cagtggtaa caagatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca 10200
 gaatccgaaa accttgtaag cgggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc 10260
 agaaagaacg atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg 10320
 agacttgaag aacttagaaa caccagggtta aggttgctca gtagcgttag tagcaaggta 10380
 aagagaaagt cctccaagct gttggaacia gagagcgaia acagagtaga taggagtttc 10440
 ctcagcgata tegtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcgggtgta 10500
 aggaacgaaa accatatctc tggatcatgt tccagtagcc ttatgggtgct tagcatgaga 10560
 gaacttccag ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaaccatc caacggtatc 10620

ES 2 636 487 T3

gttaacccat ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat 10680
 tccgaatccg aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa 10740
 ttcgtaggg agaagagga ttaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac 10800
 gatatacttc accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg 10860
 gatagcgtca aggatatact tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt tccgaaggt 10920
 atcgatagcg gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt 10980
 agtagatccc tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt 11040
 gtaaatgtaa ttgtaatggt gttgttggt tggtgtggt ggtaattggt gtaaaatttt 11100
 tgggtggtgat tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt 11160
 gagattgggg atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac 11220
 tttgcatggg ctacacgtgg gttcttttg gcttacacgt agtattattc atgcaaagtc 11280
 agccaataca tatacgggat ttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac 11340
 taattttggc aatgacaagt gtacatttg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat 11400
 ttggattatt tttattctct taccttgccc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca 11460
 gaattgaatg gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat 11520
 taacgtogaa ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc 11580
 accagaacat aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt 11640
 caggttcata ttggaaacat cattatccta gtcttgtagc catccttctc cctgctctag 11700
 ttgagaggcc ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcttgacta 11760
 gcctttctgg tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga 11820
 agatgactct tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc 11880
 tggcttgcaa tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgtt 11940
 gctgatttag agctcccggt tgggtgattt gacttogatt tcagtttagg cttgttgaaa 12000
 ttttcaggt tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg 12060
 atcgaatact cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat 12120
 ttttttcaa cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac 12180
 ttatactgac aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg 12240
 ggttttccga catccataac gaccogaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg 12300
 ttcttcttgt catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc 12360
 tccgcaaaat attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc 12420
 aggacctatt gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggtgtgca gcaaaccaat 12480
 gaccgaaatc catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc 12540

ES 2 636 487 T3

tatctttcag agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtggtg ggcaggcttc 12600
gcoqtattag agatatgttg aggcagaccc atctgtgccca ctogtacaat tacgagagtt 12660
gttttttttg tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgatg 12720
gtctctcaac gtcgtttcct gtcactgat atcccgcat ttgcatccac gtgcccggcc 12780
tcccgtgccca agtccctagg tgatcatgac gccaaattgg tgggggtgag ggcggccctg 12840
tgcttcttac cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt 12900
gacggtttg tgtgggtga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc 12960
agaaaacaat tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat 13020
tccaacagag ttacatctct taagaataa tgtaaccctt ttagacttta tatatttgca 13080
attaaaaaaa taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca 13140
ctctattatt tataatgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggattgtg 13200
tttacagaac ctataatcaa ataataata ctcaactgaa gtttgtgag ttaattgaag 13260
ggattaacgg ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat 13320
ttocatcaat atcatgccc ttctctctct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga 13380
cacctgcact tcattgtcct tattacgtgt taaaaatga aaccatgca tccatgcaaa 13440
ctgaagaatg gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac 13500
catctcccgc tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat 13560
ccatcaaaa gataccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caacaacat 13620
tacaattaca tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct 13680
tctactggtg ttcattgtgg tgttactgac tctctgctt tcaccagaaa ggatgttgct 13740
gatagacctg atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct 13800
gagcatcctg gtgggtctca tttcgtttct ttgttoggag gaagagatgc tactgaggct 13860
ttcatggaat accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttga 13920
tctcttgctt ctactgagga acctgttgcct gctgatgagg gataccttca actttgtgct 13980
aggatcgcta agatgggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctccctgcttc ttactgggtt 14040
aaggctggac ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga 14100
aagagacttc tcccttctat cgttcttggga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc 14160
cagcatgatg ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttga 14220
ctttgtcagg attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg 14280
caccacctcc acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cgggtctctt 14340
agactcaagc ctactgatgc ttggtcaact atgcattggc ttcagcatct ttacctttg 14400

ES 2 636 487 T3

cctgggtgaga ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttggtatg 14460
 tggcgttggg aggggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg 14520
 cttctcaagc ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct 14580
 gttcactactg ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc 14640
 ttcttcttca tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc 14700
 acttctatga ctagagggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacggt 14760
 ggaggacctc ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg 14820
 ttccctagag ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgtaa ggctgagctt 14880
 gaggtagag gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc 14940
 ctcaaacata tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct 15000
 tatgtgacgt gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa 15060
 agtgagaatg aggggaagg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg 15120
 tctcgtattg tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgtttttt aaatcatgaa 15180
 ttttaaat tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatata catgcatgga 15240
 tgtttcttta cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac 15300
 tatccctcaa aagctttaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa 15360
 acgaaacata ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat 15420
 ccctgaatga ttctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc 15480
 gagaagcagc ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag 15540
 tattttcctt cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt 15600
 ttggccacca ttcaattctg tcttgctttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag 15660
 agaataaaaa taatccaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac 15720
 ttgtcattgc caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat 15780
 accgtatatg tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaacc 15840
 acgtgtagcc catgcaaagt taacactcac gaccccttc ctcagtctcc actatataaa 15900
 cccaccatcc ccaatctcac caaaccacc acacaactca caactcactc tcacacctta 15960
 aagaaccaat caccaccaa aattttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaacaaa 16020
 cattacaatt acatttacia ttaccatacc atgagcgtg ttaccgttac tggatctgat 16080
 cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat 16140
 accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat ttaccatca aggacatcct tggagctatc 16200
 cctcatgagt gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatata 16260
 ttctgcatgc ttaccaccg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct 16320

ES 2 636 487 T3

tacacctcta acagcatcat caagttcact ttctgggcc tttacactta cgttcaagga 16380
cttttcggaa ccggaatctg ggttctcget catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat 16440
tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac 16500
ttcagctgga agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat 16560
atggttttcg ttcttgcac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt ctctcgtaac 16620
ctcgtctgagt actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa 16680
cttgaggat ggatcgctta cctcttcggt aacgttacag gacaacctta ccctgatggt 16740
ccttcttggga aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct 16800
ctctacatct tcctttctga tcttggaaac ctcaccagg gaatcgttct tactcttgg 16860
tacaagaaat tcggaggatg gtcccttttc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt 16920
aaccactggc tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac 16980
aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagtccgga 17040
ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccaactactgt 17100
tctaggatcc cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga 17160
aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg tggaaagtcac tttggaagtc tttcaggtct 17220
tgccaatacg ttgacggtga taacggtggt ctcattgtcc gtaacatcaa caactgcgga 17280
gttgagctg ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg 17340
ctaggtgta aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt 17400
aacagctgta ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 17460
agagaggctg atgaaatggt atgtatggtt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg 17520
ctcgtgtggt tctatcgaat tattcggcgg ttctctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc 17580
cgcagctact actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc 17640
tgctcggatg atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca 17700
atcgccaga tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg 17760
tcccatcaat ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgccggcac ccagcctagc 17820
cgatgccagc tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtgggta tcgatgagat 17880
cgtataaaga cactgctagg tgtaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa 17940
ccgtaataaa aagagagaga ggctgatgga atggtatgta tgtatgtttc ttggttttta 18000
aatataaatg gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata 18060
tttggcttaa tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aatataaat 18120
atatagtttt tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct 18180

ES 2 636 487 T3

agaaatattt gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt 18240
 tattaacttt aaataattgg ttgtacgata actttcttat caagtgttac taaaatgcgt 18300
 caatctcttt gtctctccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt 18360
 ttcgaatttg aagtgaattt tcgataattt aaaattaaat agaacatatac attatattagg 18420
 tatcatattg atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa 18480
 cgaaaaatta gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc 18540
 tataagaata ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaaa ttaattttta ctaaacacata 18600
 tatttactta tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct acaaaaaaaaa 18660
 aaaccagaaa atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt 18720
 tggtttgatt ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccoccta atcataatag 18780
 ctttaatatt tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa 18840
 tgaatcaagc ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgaatgtg gtggaatat 18900
 gtaatttact tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg 18960
 ttagctacga ttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa 19020
 atatacgaag gaacaaatat ttttaaaaa atacgcaatg acttgaaca aaagaaagtg 19080
 atatatTTTT tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg 19140
 taactattat gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttctctgaa 19200
 aatagtcctg caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttacct 19260
 attagttgaa agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat 19320
 atgtaatgag tataaaacgt agtacttaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag 19380
 agatgggagc agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg 19440
 tttgaatcct attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa 19500
 catttaaaaa atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggctt aggatctgat 19560
 tgtaatttta gacttaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa 19620
 ataatatatt ttagactatt tggccttaac taaactcca ctcatattt actgaggtta 19680
 gagaatagac ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca 19740
 gagggtatgc caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat 19800
 catagtttag cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt 19860
 tttggcgtta aaggaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa 19920
 ttttccatcg aatatatga atttagtata tatattctg caatgtacta ttttgctatt 19980
 ttggcaactt tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt 20040
 atacacatgt ctaaagcat gctttgcaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatgc 20100

ES 2 636 487 T3

aaatacatct catagcttcc tccattatth tccgacacaa acagagcaga ctctagagga 20160
 tccccccggt ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacat 20220
 ttacaattac catcccaaat cggcgcgcca tgtgtcctcc taagaccgat ggaagatctt 20280
 ctctagatc tcctctcacc aggtctaagt catctgctga ggctcttgat gctaaggatg 20340
 cttctaccgc tcctgttgat cttagacc cttgagcctca tgaacttgct gctaccttcg 20400
 agactagatg ggtaggggtt gaggatgttg agtacgacgt gaccaacttc aaacatcctg 20460
 gtggaagcgt gatcttctac atgcttgcta acactggctg tgatgctact gaggctttca 20520
 aagaatttca catgcgtagc ctcaaggctt ggaagatgct tagagctttg ctttctagac 20580
 ctgctgagat caagagatct gagtctgagg atgctcctat gcttgaggat ttcgctaggt 20640
 ggagagctga acttgagagg gacggattct tcaagccttc tatcaccocat gttgcttacc 20700
 gtcttttggg gcttcttgct actttcgcctc ttggaaccgc tcttatgtac gctggatacc 20760
 ctatcattgc tagcgttggtg tacggtgctt tcttcggagc tagatgtgga tgggttcaac 20820
 atgagggtgg acacaactct cttaccggat ctgtgtacgt ggataagaga cttcaggcta 20880
 tgacttgccg attcggactt tctaccagcg gagagatgtg gaaccagatg cataacaagc 20940
 accatgctac ccctcagaaa gttagacacg acatggatct tgataccact cctgctgtgg 21000
 ctttcttcaa caccgctgtg gaggataata gacctagggg attctctaga gcttgggcta 21060
 gacttcaagc ttggaccttc gttcctgcta cttctggact tctcgttcag gctttctgga 21120
 tctacgttct ccctcctaga cagggtgctca ggaagaagaa ctacgaggaa gcttcttggg 21180
 tgctcgttcc tcacgttggtt agaaccgctg ttatcaagct tgctaccgga tactcttggc 21240
 ctggttgctta ctgggtggtc actttcggaa actggatcgc ttacatgtac ctcttcgctc 21300
 acttctctac ttctcacact cacctccctg ttgttccatc tgacaagcac cttagctggg 21360
 ttaactacgc tgttgatcac accggtgaca tcgatccttc tcgtggatac gttactggc 21420
 ttatgggata ccttaactgc caggttatcc accatctctt ccctgatatg cctcaattca 21480
 gacagcctga ggtgtcaaga agattcgtcc ctttcgctaa gaagtgggga ctcaactaca 21540
 aggtgctctc ttactacggt gcttgggaagg ctactttcag caacctcgac aaagttggac 21600
 agcactacta cgttaacgga aaggctgaga aggctcactg atgattaatt aaatttgggc 21660
 tcgaaccggt tcgagcaagc ttatgtgacg tgaaataata acggtaaaat atatgtaata 21720
 ataataataa taaagccaca aagtgagaat gaggggaagg ggaaatgtgt aatgagccag 21780
 tagccggtgg tgctaatttt gtatcgtatt gtcaataaat catgaatttt gtggttttta 21840
 tgtgtttttt taaatcatga attttaaatt ttataaaata atctccaatc ggaagaacaa 21900
 cattccatat ccatgcatgg atgtttcttt acccaaatct agttcttgag aggatgaagc 21960

ES 2 636 487 T3

atcacogaac agttctgcaa ctatcoctca aaagotttaa aatgaacaac aaggaacaga 22020
gcaacggtcc aaagatocca aacgaaacat attatctata ctaatactat attattaatt 22080
actactgccc ggaatcaciaa tccctgaatg attcctatta actacaagcc ttggtggeg 22140
cggagaagtg atcggcgggg cgagaagcag cggactcgga gacgaggcct tggagaatct 22200
cctgcagggc ggccgcgat cccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac 22260
tcgccgtaaa gactggcgaa cagttcatac agagtctctt acgactcaat gacaagaaga 22320
aaatcttcgt caacatggtg gagcaogaca cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata 22380
cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga cttttcaaca aagggttaata tccgaaacc 22440
toctcggatt ccattgccc gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag 22500
gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg 22560
ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccaogaggag catcgtggaa aaagaagacg 22620
ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg 22680
acgcacaatc ccactatcct tgcgaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt 22740
tggagagaac acgggggact gaattaaata tgagocctga gaggcgtcct gttgaaatca 22800
gacctgctac tgctgctgat atggctgctg tttgtgatat cgtgaaccac tacatcgaga 22860
cttctaccgt taacttcaga actgagcctc aaactcctca agagtggatc gatgatcttg 22920
agagactcca agatagatac ccttggttg ttgctgaggt tgaggggtgtt gttgctggaa 22980
tcgcttacgc tggaccttg aaggctagaa acgcttacga ttggactgtt gactctaccg 23040
tttacgttcc acacagacat cagagacttg gacttggatc taccctttac actcaccttc 23100
tcaagtctat ggaagctcag ggattcaagt ctggtgttgc tgttatcgga ctccctaacg 23160
atccttctgt tagacttcat gaggctcttg gatacactgc tagaggaact cttagagctg 23220
ctggatacaa gcacggtgga tggcatgatg ttggattctg gcaaagagat ttcgagcttc 23280
ctgctcctcc tagacctgtt agaccagtta ctcagatctg aatttgcgtg atcgttcaaa 23340
catttggcaa taaagttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat 23400
ataattctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt 23460
tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatac gtagagaaaa 23520
caaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgog gtgtcatcta tgttactaga 23580
tcactagtga tgtacgggta aaaccacccc agtacattaa aaacgtccgc aatgtgttat 23640
taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat cctgccacca gccagccaac 23700
agctccccga ccggcagctc ggcacaaaat caccactcga tacaggcagc ccatcagtc 23760

<211> 11042

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica pORE04+11ABGBEC_caupí_EPA_inserto

10 <400> 8

ES 2 636 487 T3

tctgtggtt ggcattgaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta	60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatactg	120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag	180
tcacgacgtt gtaaacggg cgccctagaa tctaattatt ctattcagac taaattagta	240
taagtatttt tttaatcaat aaataataat taataattta ttagtaggag tgattgaatt	300
tataatatat tttttttaat catttaaaga atcttatatc tttaaattga caagagtttt	360
aatggggag agtgttatca taccacaagt aggattaatg tgttatagtt tcacatgcat	420
tacgataagt tgtgaaagat aacattatta tatatacaa tgacaatcac tagcgatcga	480
gtagtgagag tcgtcttatt acactttctt ccttcgatct gtcacatggc ggcggcccga	540
attctcatca cttagaagcg tgggtcttca tgtagtagaa gtttccgaaa agcatgagaa	600
gagtcacat gtacaccacg aggagctgag cgataaactt agggtaaggt gaagaagagt	660
agaggaggta cacagcctgg agaaggttca tgaagaactg gaacatttgc atctgggtga	720
ggtatcttcc ccaccagagg tactttctct tagttttctc atccttaggg agcacagcag	780
ccataaagta gtaggtgtac atgcacacgt gcaccaaga gttgagagca gcagagaaat	840
aagcatcacc acctggagca gcgtaggtga tcatccacca gattccagag atagatccgt	900
gatggtacac gtggaggaat gacacctggt tcacatttcc cttgaggagc atgatgaagg	960
tatccatgaa ctogtagatc tttgacacgt agaaaatcca gatcacctta gccatctcgg	1020
tctgagcagg gttgtaagcg tttccccaga aagagtactt gttcacgtaa gcctcgtaca	1080
cgagcttgag gcacatgtag agtgagagtc cgatgaggaa cacgttatga gcgagcatga	1140
gagccttgag caagaatgga tcctgtccct tcacagttct agggaacacc tttctgtaca	1200
cgagtccaga tcccacgata gcgaagtaag cgaggagaga caagataaga ggggtaggag	1260
attccacgag agggagatcc ttagtagcag aagagatagg cttgagtccc catccgatag	1320
aatcggtagc agagaagata gcaggagcca caacagcatc gatagcagcg tattgttctt	1380
gagccatagc cacgagaggc tgagcaaatt ccatgaattc tgttcttctt tactctttgt	1440
gtgactgagg tttggtctag tgctttggtc atctatatat aatgataaca acaatgagaa	1500
caagctttgg agtgatcggg gggcttagga tacatgagat tcaagtggac taggatctac	1560
accgttgat tttgagtgtg gatatgtgtg aggttaattt tacttggtaa cgccacaaa	1620
ggcctaagga gaggtggtga gacccttacc ggcttgaacc gctggaataa tgccacgtgg	1680

ES 2 636 487 T3

aagataattc catgaatctt atcgttatct atgagtgaaa ttgtgtgatg gtggagtggg 1740
gcttgctcat tttacttgcc tgggtgactt ggcctttcc ttatggggaa tttatatttt 1800
acttactata gagctttcat acctttttt taccttggat ttagttaata tataatggta 1860
tgattcatga ataaaaatgg gaaatttttg aatttgtact gctaaatgca taagattagg 1920
tgaaactgtg gaatatatat ttttttcatt taaaagcaaa atttgccttt tactagaatt 1980
ataaatatag aaaaatatat aacattcaaa taaaaatgaa aataagaact ttcaaaaaac 2040
agaactatgt ttaatgtgta aagattagtc gcacatcaag tcatctgta caatatgta 2100
caacaagtca taagcccaac aaagttagca cgtctaaata aactaaagag tccacgaaaa 2160
tattacaaat cataagcca acaaagtat tgatcaaaaa aaaaaaacgc ccaacaaagc 2220
taaacaaagt ccaaaaaaaaa cttctcaagt ctccatcttc ctttatgaac attgaaaact 2280
atacacaaaa caagtcagat aatctcttt ctgggctgt cttcccaacc tctacatca 2340
cttccctatc ggattgaatg ttttacttgt accttttccg ttgcaatgat attgatagta 2400
tgtttgtgaa aactaatagg gttaacaatc gaagtcatgg aatatggatt tggccaaga 2460
ttttccgaga gctttctagt agaaagcca tcaccagaaa tttactagta aaataaatca 2520
ccaattaggt ttcttattat gtgccaaatt caatataatt atagaggata tttcaaatga 2580
aaacgtatga atgttattag taaatggtca ggtaagacat taaaaaaaac ctacgtcaga 2640
tattcaactt taaaaattcg atcagtggtg aattgtacaa aaatttggga tctactatat 2700
atatataatg ctttacaaca cttggatttt tttttggagg ctggaatttt taatctacat 2760
atgtgttttg gccatgcacc aactcattgt ttagtgaat actttgatt tgtcaaatat 2820
atgtgttcgt gtatatttgt ataagaattt ctttgaccat atacacacac acatatatat 2880
atatatata atattatata tcatgcactt ttaattgaaa aaataatata tatatatata 2940
gtgcattttt tctaacaacc atatatgtg cgattgatct gcaaaaatac tgctagagta 3000
atgaaaaata taatctattg ctgaaattat ctcagatgtt aagattttct taaagtaaat 3060
tctttcaaat ttttagctaaa agtcttgtaa taactaaaga ataatacaca atctcgacca 3120
cggaaaaaaaa acacataata aatttggggc ccctagaatc taattattct attcagacta 3180
aattagtata agtatttttt taatcaataa ataataatta ataatttatt agtaggagtg 3240
attgaattta taatatattt tttttaatca tttaaagaat cttatatctt taaattgaca 3300
agagttttaa atggggagag tgttatcata tcacaagtag gattaatgtg ttatagtttc 3360
acatgcatta cgataagttg tgaaagataa cattattata tataacaatg acaatcacta 3420
gcatcgagt agtgagagtc gtcttattac actttcttcc ttcgatctgt cacatggcgg 3480
cggcccggcg ccgctcatca gtgagccttc tcagccttcc cgttcacgta gtagtgctgt 3540
cccaccttat cgaggtttga gaaggtagcc ttccaagcac cgtagtaaga gagcaccttg 3600

ES 2 636 487 T3

tagttgagtc cccacttctt agcgaagga acgaatcttc ttgacacctc aggctgtctg 3660
aactgtggca tatctgggaa gaggtgatgg atcacctggc agttgaggta tcccatgagc 3720
cagttcacgt aaccctaga aggatcgata tccacgggtg gatccacagc gtagttcacc 3780
caagaaaggt gcttatcaga tggcaccact gggagatggg tatgagaggt agagaagtga 3840
gogaagaggt acatgtaagc gatccagttt ccgaagggtga accaccaata agcaacaggc 3900
caagagtatc cggtagcgag cttgataaca gcggttctca caacgtgaga cagcagcatc 3960
caagaagcct ctctgtagtt cttctttctg agcacctgtc taggatggag aacgtagatc 4020
cagaaagcct gcacgagaag tccagaagtc acaggaacga aagtccaagc ctgaagtcta 4080
gcccagctc tagaaaatcc cctaggcctg ttatctcaa cagcgggtgt gaagaaagcc 4140
acagcaggag tggtagcgag atccatatca tgcctcacct tttgtggggt tgcgtggtgc 4200
ttgttgtgca tctggttcca catctcacca gaggtagaaa gtccgaatcc gcaagtcata 4260
gcctggagcc tcttatccac atacacagat ccggtgagag agttatgacc accctcgtgt 4320
tgaaccctac cacatctagc tccgaagaaa gcaccgtaca ccacagaagc gataataggg 4380
tatccagcat acatgagagc agttccgaga gcgaaagtag caagaagctc gagaagtctg 4440
tatgccacgt gggtagataga aggcttgaag aatccatccc tctcaagctc agctctccac 4500
ctagcgaat ctctgagcat aggagcatcc tcagactcag acctctgat ctgagctggt 4560
ctagaaggca aagccctaag catcttcaa gccttgagag atctcatgtg aaattctttg 4620
aaagcctcag tagcatcagc accggtgtta gcgagcatgt agaagatcac agaaccacca 4680
gggtgcttga agttagtaac atcgtactca acatcctcaa ctctcaccca tctagtctcg 4740
aaggtagcag ccaactcatg aggtcaaga gtcttgagat ccacaggagc agtagaagca 4800
tccttagcat cgagagcctc agcagatgac ttagacctgg taagaggtga cctaggagaa 4860
gatcttccat cagtctttgg agggcacatg cggccgctgt tcttctttac tctttgtgtg 4920
actgaggttt ggtctagtgc tttggtcatc tatatataat gataacaaca atgagaacaa 4980
gctttggagt gatcggaggg tctaggatac atgagattca agtggactag gatctacacc 5040
gttgattttt gagtgtggat atgtgtgagg ttaattttac ttggtaacgg ccacaaaggc 5100
ctaaggagag gtggtgagac ccttatcggc ttgaaccgct ggaataatgc cacgtggaag 5160
ataattccat gaatcttatc gttatctatg agtgaaattg tgtgatggtg gagtgggtct 5220
tgctcatttt acttgctggtg tggacttggc ccttctctta tggggaattt atattttact 5280
tactatagag ctttcatacc ttttttttac cttggattta gttaatatat aatggtatga 5340
ttcatgaata aaaatgggaa atttttgaat ttgtactgct aaatgcataa gattaggtga 5400
aactgtggaa tatatatttt tttcatttaa aagcaaaatt tgccttttac tagaattata 5460

ES 2 636 487 T3

aatatagaaa aatatataac attcaaataa aaatgaaaat aagaactttc aaaaaacaga 5520
actatgttta atgtgtaaag attagtcgca catcaagtca tctgttacia tatgttacia 5580
caagtcataa gcccaacaaa gttagcacgt ctaaataaac taaagagtcc acgaaaatat 5640
tacaatcat aagcccaaca aagttattga tcaaaaaaaaa aaaacgcccc acaaagctaa 5700
acaaagtcca aaaaaaactt ctcaagtctc catcttctct tatgaacatt gaaaactata 5760
cacaaaacaa gtcagataaa tctctttctg ggctgtctct cccaacctcc tacatcactt 5820
ccctatcgga ttgaatgttt tacttgtacc ttttccgttg caatgatatt gatagtatgt 5880
ttgtgaaaac taatagggtt aacaatcgaa gtcatggaat atggatttgg tccaagattt 5940
tccgagagct ttctagtaga aagcccatca ccagaaatth actagtaaaa taaatcacca 6000
attaggtttc ttattatgtg ccaaattcaa tataattata gaggatattt caaatgaaaa 6060
cgtatgaatg ttattagtaa atggtcaggt aagacattaa aaaaatccta cgtcagatat 6120
tcaactttaa aaattcgatc agtgtggaat tgtacaaaaa tttgggatct actatatata 6180
tataatgctt tacaacactt ggattttttt ttggaggctg gaatttttaa tctacatatt 6240
tgttttggcc atgcaccaac tcattgttta gtgtaatact ttgattttgt caaatatatg 6300
tgttcgtgta tatttgtata agaatttctt tgaccatata cacacacaca tatatatata 6360
tatatatata ttatatatca tgcactttta attgaaaaaa taatatatat atatatagtg 6420
cattttttot aacaaccata tatgttgcga ttgatctgca aaaatactgc tagagtaatg 6480
aaaaatataa tctattgctg aaattatctc agatgttaag attttcttaa agtaaattct 6540
ttcaaattht agctaaaagt cttgtaataa ctaaagaata atacacaatc tgcaccacgg 6600
aaaaaaaaa cataataaat ttggggcgcg cgcgtattgg ctagagcagc ttgccaacat 6660
ggtggagcac gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca 6720
aagggtatt gagacttttc aacaaaggtt aatatcgga aacctcctcg gattccattg 6780
cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggca cctacaaatg 6840
ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca gtggtoccaa 6900
agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 6960
aaagcaagtg gattgatgtg ataacatggt ggagcacgac actctcgtct actccaagaa 7020
tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggctattgag acttttcaac aaaggtaat 7080
atcgggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cacttcatca aaaggacagt 7140
agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg ctatcgttca 7200
agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccc cccacgagga gcatcgtgga 7260
aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata tctccactga 7320
cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttgcgaagac cttcctctat ataaggaagt 7380

ES 2 636 487 T3

tcatttcatt	tggagaggac	acgctgaaat	caccagtctc	tctctacaaa	tctatctctg	7440
cgatcgcatg	cctcctaggg	attcttactc	ttacgctgct	cctccatctg	ctcagctcca	7500
tgaagttgat	actcctcaag	agcacgataa	gaaagaactc	gtgatcggag	atagggctta	7560
cgatgtgacc	aacttcgtga	agagacaccc	tggtggaaag	attatcgctt	accaggttgg	7620
aactgatget	accgatgctt	acaagcagtt	ccacgtgaga	tctgctaagg	ctgataagat	7680
gctcaagtct	ctcccatcta	ggcctgtgca	caagggatat	tctccaagaa	gggctgatct	7740
tatcgctgat	ttccaagagt	tcaccaagca	gcttgaggct	gagggaatgt	togaaccttc	7800
tctccctcat	gtggcttaca	gactcgctga	ggttatogct	atgcatgttg	ctgggtgctgc	7860
tctcatctgg	cacggatata	ctttcgctgg	aatcgctatg	ctcggagtgg	ttcaggggaag	7920
atgtggatgg	cttatgcatg	agggtggaca	ctactctctc	accggaaaca	ttgctttcga	7980
tagggctatc	caggtggcat	gctatggact	tggatgtgga	atgtctggtg	cttgggtggag	8040
aaaccagcat	aacaagcacc	atgctacccc	tcaaaagctc	cagcatgatg	tggatctcga	8100
tactctccct	ctcgtggctt	tccatgagag	aatcgctgct	aaggtgaagt	ctcctgctat	8160
gaaggcttgg	ctctctatgc	aggctaagct	tttcgctcct	gtgactactc	ttctcgttgc	8220
tcttgatgg	cagctctacc	tccatcctag	acacatgctc	aggaccaagc	actacgatga	8280
gcttgctatg	ctcggtatca	gatacggact	cgttggatac	ctcgtctgcta	attacgggtgc	8340
tggatacgtt	ctcgettgct	accttcttta	cgttcagctc	ggagctatgt	acatcttctg	8400
caacttcgct	gtgtctcaca	ctcatctccc	tgtggttga	cctaacgagc	atgctacttg	8460
ggttgagtac	gctgctaacc	acactaccaa	ctgctctcca	tcttggtggg	gtgattgggtg	8520
gatgtcttac	ctcaactacc	agatcgagca	ccacctctac	ccttctatgc	ctcagttcag	8580
acaccctaag	atcgtctccta	gagtgaagca	gcttttogag	aagcacggac	tccactacga	8640
tgtgagagga	tactttgagg	ctatggctga	taccttogct	aacctcgata	atgtggctca	8700
cgctcctgag	aagaaaatgc	agtgatgagc	gatcgcgatac	gttcaaacat	ttggcaataa	8760
agtttcttaa	gattgaatcc	tgttgccggg	cttgcgatga	ttatcatata	atttctgttg	8820
aattacgtta	agcatgtaat	aattaacatg	taatgcatga	cgttatttat	gagatgggtt	8880
tttatgatta	gagtcccga	attatacatt	taatacgcga	tagaaaacaa	aatatagcgc	8940
gcaaactagg	ataaattatc	gcgcgcgggtg	tcatctatgt	tactagatcc	ctgcagggcg	9000
tattggctag	agcagcttgc	caacatgggtg	gagcacgaca	ctctcgtcta	ctccaagaat	9060
atcaaagata	cagtctcaga	agaccaaagg	gctattgaga	cttttcaaca	aagggtaata	9120
tcgggaaacc	tctcggatt	ccattgccc	gctatctgtc	acttcatcaa	aaggacagta	9180
gaaaaggaag	gtggcaccta	caaatgccat	cattgcgata	aaggaaaggc	tatcgttcaa	9240

ES 2 636 487 T3

gatgcctctg cggacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa 9300
aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgataa catggtggag 9360
cacgacactc tcgtctactc caagaatatac aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct 9420
attgagactt ttcaacaaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct 9480
atctgtcact tcatcaaaaag gacagtagaa aaggaagggtg gcacctacaa atgccatcat 9540
tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga 9600
ccccaccaca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa 9660
gtggattgat gtgatatact cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg 9720
caagaccttc ctctatataa ggaagtcat ttcatttggga gaggacacgc tgaatcacc 9780
agtctctctc tacaatcta tctctctcga gatgattgaa caagatggat tgcacgcagg 9840
ttctccggcc gcttgggtgg agaggtatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 9900
ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg aggccgggtc tttttgtcaa 9960
gaccgacctg tccgggtgcc tgaatgaact tcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct 10020
ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgcggtt gtcaactgaag cgggaaggga 10080
ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 10140
cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgttg atccggctac 10200
ctgccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgcgaga gcacgtactc ggatggaagc 10260
cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 10320
gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgccga cggcgaggat ctctcgtga ctcatggcga 10380
tgcctgcttg ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 10440
ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga 10500
agagcttggc ggcaaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga 10560
ttcgcagcgc atgccttct atgccttct tgacgagttc ttctgaaacg cgtgatcgtt 10620
caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccggctt gcgatgatta 10680
tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcattgacgt 10740
tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgaatt atacatttaa tacgcatag 10800
aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcgggtgtca tctatgttac 10860
tagatcgacg tccgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt 10920
attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca 10980
acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt 11040
cc 11042

<210> 9
<211> 1254
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 636 487 T3

<220>

<223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 12 desaturasa de Lachancea kluyveri en plantas

5 <400> 9

```

atgagcgcgtg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc      60
gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat      120
ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct      180
acctctctct actacgtgtt cagagatata ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc      240
cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacaacctca acagcatcat caagttcact      300
ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa cgggaatctg ggttctogct      360
catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg      420
acccttcaact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac      480
cataaggcta ctggacacat gaccagagat atgggttttcg ttcttgccac caaagaggaa      540
ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctctgctgagt actctgagga ttctccactt      600
agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttogtt      660
aacgttacag gacaacctta cctgatggtt ccttcttgga aatggaacca cttctggctt      720
acctctccac tttctgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttggaatc      780
ctcaccagag gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat tcggaggatg gtcccttttc      840
atcaactggt togttctta catctgggtt aacctggtc tcgttttcat cacattcctt      900
cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt      960
gctgctgcta ctatcgatag aaagtctgga ttcactcggac ctcacatctt ccatgatatc     1020
atcgagactc atgtgcttca ccaactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct     1080
gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg     1140
tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatcag ttgacggtga taacggtggt     1200
ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga           1254

```

<210> 10

10 <211> 416

<212> PRT

<213> Lachancea kluyveri

<400> 10

15

```

Met Ser Ala Val Thr Val Thr Gly Ser Asp Pro Lys Asn Arg Gly Ser
1           5           10           15

```

ES 2 636 487 T3

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

Gly Asn Val Phe Ser Val Pro Asp Phe Thr Ile Lys Asp Ile Leu Gly
35 40 45

Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr
50 55 60

Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr
65 70 75 80

His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile
85 90 95

Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe
100 105 110

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

Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser
130 135 140

Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His
145 150 155 160

His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala
165 170 175

Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala
180 185 190

Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val
195 200 205

Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly
210 215 220

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

Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser
245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys
260 265 270

ES 2 636 487 T3

Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
 275 280 285

Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
 290 295 300

Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
 305 310 315 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
 325 330 335

Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
 340 345 350

Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
 355 360 365

Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
 370 375 380

Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
 385 390 395 400

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

<210> 11
 <211> 1251
 <212> AND
 <213> Pichia pastoris

5

<400> 11

atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgtagg 60
 cgttctggaa acgttgcatc tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaaac 120
 gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatataccttg acgctatccc taagcactgt 180
 tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct 240
 gctatcgctt acgttggact taactacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc 300
 gctgcttggg ctgcttacgt gttctctatc tcttgtttcg gattcggaaat ctggatcctt 360
 ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggttaacga taccgttgga 420
 tgggttctcc actctcttgt tatggttcct tacttcagct ggaagttctc tcatgetaag 480
 caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctta caccgccgag 540
 gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc 600

10

ES 2 636 487 T3

```
tactctgttt tcgctctctt gttccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact      660
aacgctactg gacaacotta ccttgggtgtt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct      720
tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtagatcg ttctttctga tcttggaatc      780
cttgctaccc tcacttctgt ttacacogct tacaaggttt tcggattctg gctactttc      840
atcacatggt tctgtccttg gatccttggt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt      900
cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt      960
gctgctgcta ctatcgatag agagtctgga atcctcggaa tcattctcca tgacatcatc     1020
gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct     1080
accgagtgca tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg     1140
gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tgggtgtgtac     1200
atgttcogta actgcaacaa cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a                1251
```

<210> 12
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Pichia pastoris
 <400> 12

5

```
Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr
 1                    5                10                15

Lys Thr Val Arg Arg Ser Gly Asn Val Ala Ser Phe Lys Gln Gln Lys
      20                    25                30

Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr
      35                    40                45

Ile Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser
      50                    55                60

Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser
 65                    70                75                80

Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu
      85                    90                95

Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys
      100                   105                110

Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala
 115                   120                125
```

10

ES 2 636 487 T3

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

ES 2 636 487 T3

Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr
 385 390 395 400

Met Phe Arg Asn Cys Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr
 405 410 415

- <210> 13
- <211> 1392
- 5 <212> ADN
- <213> Micromonas pusilla
- <400> 13

```

atgtgcccgc cgaagacgga cggccgatcg tccccgat cgccgctgac gcgcagcaaa      60
tcctccgctgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg      120
ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat gggcgccgct ggaggacgtc      180
gagtacgacg tcacaaactt caaacaccgg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg      240
aacacgggctg cggacgccac ggaggcgttc aaggagtcc acatgcgatc gcttaaggcg      300
tggaagatgc tcagagcgtt gccgtcgcgc cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcag      360
gacgcgccga tggttgagga tttcgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaacg cgacgggttc      420
ttaagccct cgataacgca cgtcgcgtat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc      480
ctcggcaccg ccctcatgta cgcgggttac ccgatcatcg cgtccgtcgt gtacggcgcg      540
ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cagcagggcg ggcacaactc gctcacgggg      600
tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtcgc ggttcgggct gtccacgagc      660
gggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac      720
gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgttttcta acaccgccgt ggaggacaac      780
cggccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccgtg      840
acctccgggc tgctcgtcca ggcgttctgg atctacgtcc tgcaccgcg gcaggtgttg      900
cgaaagaaga actacgagga ggcgtcgtgg atgctcgtct ctacgtcgt caggaccgcg      960
gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgtcgcgt actggtggtt caccttcggc     1020
aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctcccg     1080
gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactac cggtcgatca caccgtggac     1140
atcgaccctg cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt     1200
catcacctgt tcccggacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc     1260
ccgttcgcga agaagtggg gctgaactac aagggtcgtg cctattacgg cgcctggaag     1320
gcgacgttct cgaacttggg taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag     1380
aaggcgcact ga                                                                1392
    
```

- 10
- <210> 14
- <211> 1395
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial

ES 2 636 487 T3

<220>

<223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 6 desaturasa de Micromonas pusilla en plantas (versión 1)

5 <400> 14

```

atgtgcctc ctaagactga tgaagatct tctcctagat ctccacttac caggtctaaa      60
tcttctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctactg ctctgttga tcttaagact      120
cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggttagagt tgaggacggt      180
gagtacgatg tgactaactt caagcacctt ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct      240
aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcggtc tctcaaggct      300
tgaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag      360
gatgctccta tgcttgagga ttctgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc      420
ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct      480
cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacggtgct      540
ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga      600
tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttgtg gattcggact ttctacttct      660
ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta ccctcaaaa ggtagacac      720
gatatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca aactgctgtg tgaggataac      780
agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttcctggt      840
acctctggac ttcttgttca agctttcttg atctacgttc tccaccctag acaagttctc      900
cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaaccgct      960
gttatcaagc ttgctactgg aactcttgg cctgttgcct actggtggtt cactttcgga     1020
aactggatcg cttacatgta ccttttctg cacttctcta cttctcatac tcacctccct     1080
gttgttccat ctgataagca cctttcttgg gtaactacg ctggtgatca caccgttgat     1140
atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc     1200
caccacctct tcctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcggt     1260
cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aagggtctct cttactacgg tgcttgaag     1320
gctactttct ctaaccttga taagggtgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag     1380
aaggctcact aatga                                                    1395

```

10 <210> 15
<211> 1395

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> > Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 6 desaturasa de Micromonas pusilla en plantas (versión 2)

20 <400> 15

ES 2 636 487 T3

atgtgtcctc ctaagaccga tgaagatct tctcctagat ctctctcac caggtctaag 60
 tcctctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctaccg ctctggtga tcttaagacc 120
 cttgagcctc atgaacttgc tgctaccttc gagactagat gggttagggt tgaggatggt 180
 gagtacgacg tgaccaactt caaacatcct ggtggaagcg tgatcttcta catgcttgct 240
 aacctgggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaatttc acatgogtag cctcaaggct 300
 tgaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360
 gatgctccta tgcttgagga tttcgctagg tggagagctg aacttgagag ggacggattc 420
 ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac cgtcttttgg agcttcttgc tactttcgct 480
 cttggaaccg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg ctacggttgt gtacggtgct 540
 ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgaggggtg gacacaactc tcttaccgga 600
 tctgtgtacg tggataagag acttcaggct atgacttgcg gattcggact ttctaccagc 660
 ggagagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta ccctcagaa agttagacac 720
 gacatggatc ttgataccac tctgctgtg gctttcttca acaccgctgt ggaggataat 780
 agacctaggg gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacctt cgttcctggt 840
 acttctggac ttctcgttca ggctttctgg atctacgttc tccatcctag acaggtgctc 900
 aggaagaaga actacgagga agcttcttgg atgctcgttt ctacggttgt tagaaccgct 960
 gttatcaagc ttgctaccgg atactcttgg cctggtgctt actggtgggt cactttcgga 1020
 aactggatcg cttacatgta cctcttctgct cacttctcta cttctcacac tcacctcct 1080
 gttgttccat ctgacaagca ccttagctgg gttactacg ctggtgatca caccggtgac 1140
 atcgatcctt ctctggtgata cgtaactg cttatgggat accttaactg ccaggttatc 1200
 caccatctct tcctgatat gcctcaattc agacagcctg aggtgtcaag aagattcgtc 1260
 cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggag 1320
 gctactttca gcaacctcga caaagttgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380
 aaggctcact gatga 1395

5

<210> 16
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Micromonas pusilla

 <400> 16

ES 2 636 487 T3

Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
1 5 10 15

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
20 25 30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala
35 40 45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val
50 55 60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala
65 70 75 80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg
85 90 95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
115 120 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
130 135 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala
145 150 155 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
165 170 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
180 185 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
195 200 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
210 215 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
225 230 235 240

Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
245 250 255

ES 2 636 487 T3

Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
 260 265 270

Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
 275 280 285

Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
 290 295 300

Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
 305 310 315 320

Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
 325 330 335

Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe
 340 345 350

Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
 355 360 365

Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
 370 375 380

Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
 405 410 415

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
 420 425 430

Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
 435 440 445

Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
 450 455 460

<210> 17
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*
 <400> 17

5

ES 2 636 487 T3

```

atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg      60
tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac      120

gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac      180
gcgatcgcga agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg      240
acggatthta agcatcccgg aggatcgggt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg      300
gacgcgacgg aggcctthta agagtttcat tatcggctga aaaaggcgcg caaggcgttg      360
gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgagggc      420
atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt tthtaagccc      480
tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcaoc      540
gcgttgatgc acgcgcggtg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg thtcttcggc      600
gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggg gggcacaatt cgttgactgg aacatttgg      660
tgggacaagc gaatccaagc cttcgcgcgg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg      720
tggacaaca tgacaaca gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat      780
ctcgacacca ctcccacggg ggcgthtctt aactccgggg ttgaagaaaa tgcgccggg      840
ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccggt gacgtccggt      900
atggtthtgt tcttctggat gttcgtcttg caccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc      960
ttcgaagaag cggcttggat gthttccgcg cacgtcattc gcacggcggg tatcaaagcc     1020
gtcacccggt actcctggat cgctcgtac ggcttgctcg cggcgacgat gtgggcgagc     1080
ggatgttact tgctcgcgca thtttccaog tctcacaogc acttggatgt cgtgccgagc     1140
gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcg gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac     1200
aacagcgtcg tcaactggtt gatgggtac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc     1260
ccggatatgc ctcagttccg ccaaccggaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttgcgaag     1320
aagtggaact taaactaaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc     1380
aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctacgcgcgt caaatcaaag     1440
tcggcgtga                                     1449

```

<210> 18
 <211> 1449
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 6-desaturasa de *Ostreococcus lucimarinus* en plantas

10

<400> 18

ES 2 636 487 T3

```

atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct      60
tcttcttcac tctctgaggg tggaaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat      120
gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttggg ccaaagagct tgagcctcac      180

gctatcgcta agaccttoga gagaagatac gttaccatcg aggggtgttg gtacgatgtg      240
accgatttca aacaccctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct      300
gatgctactg aggctttcaa agagttccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt      360
gctgctcttc ctcaacaagc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct      420
atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct      480
tctcctgctc atgttgctta ccgtttcgct gaactcgctg ctatgttcgc tcttggaaac      540
gctcttatgc atgctagatg gcacgttgct agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga      600
gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aacatctgg      660
tgggataaga gaatccaagc tttcgctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg      720
tggacaaca tgcacaacaa gcaccatgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat      780
cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg      840
ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttcctgt tacctctgga      900
atggtgctct tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct      960
ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct     1020
gttaccggat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct     1080
ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacacco acctcgatgt tgttccatct     1140
gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac     1200
aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc     1260
cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag     1320
aagtggaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga     1380
aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag     1440
agcgcttga                                         1449

```

<210> 19
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> *Ostreococcus lucimarinus*

5

<400> 19

ES 2 636 487 T3

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

Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
 20 25 30

Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
 35 40 45

ES 2 636 487 T3

Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
50 55 60

Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
65 70 75 80

Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
85 90 95

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
100 105 110

Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
115 120 125

Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
130 135 140

Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
165 170 175

Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
180 185 190

Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
195 200 205

Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
210 215 220

Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
225 230 235 240

Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
245 250 255

His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
260 265 270

Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
275 280 285

Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
290 295 300

ES 2 636 487 T3

Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
 305 310 315 320

Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
 325 330 335

Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
 340 345 350

Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
 355 360 365

Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
 370 375 380

Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
 385 390 395 400

Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
 405 410 415

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
 420 425 430

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
 435 440 445

Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
 450 455 460

Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
 465 470 475 480

Ser Ala

<210> 20

<211> 456

5 <212> PRT

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 20

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
 1 5 10 15

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

10

ES 2 636 487 T3

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
35 40 45

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

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
130 135 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
165 170 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
180 185 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
210 215 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225 230 235 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
245 250 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
260 265 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro

ES 2 636 487 T3

275		280		285											
Ser	Lys	Ala	Leu	Lys	Gly	Gly	Lys	Tyr	Glu	Glu	Leu	Val	Trp	Met	Leu
	290					295					300				
Ala	Ala	His	Val	Ile	Arg	Thr	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Val	Thr	Gly	Phe
305					310					315					320
Thr	Ala	Met	Gln	Ser	Tyr	Gly	Leu	Phe	Leu	Ala	Thr	Ser	Trp	Val	Ser
				325					330					335	
Gly	Cys	Tyr	Leu	Phe	Ala	His	Phe	Ser	Thr	Ser	His	Thr	His	Leu	Asp
			340					345					350		
Val	Val	Pro	Ala	Asp	Glu	His	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Tyr	Ala	Val	Asp
		355					360					365			
His	Thr	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly	Trp	Val	Asn	Trp	Leu	Met
	370					375					380				
Gly	Tyr	Leu	Asn	Cys	Gln	Val	Ile	His	His	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Pro
385					390					395					400
Gln	Phe	Arg	Gln	Pro	Glu	Val	Ser	Arg	Arg	Phe	Val	Ala	Phe	Ala	Lys
				405					410					415	
Lys	Trp	Asn	Leu	Asn	Tyr	Lys	Val	Met	Thr	Tyr	Ala	Gly	Ala	Trp	Lys
			420					425					430		
Ala	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Asn	Val	Gly	Lys	His	Tyr	Tyr	Val	His
		435					440					445			
Gly	Gln	His	Ser	Gly	Lys	Thr	Ala								
	450					455									

<210> 21
 <211> 894
 <212> ADN
 <213> Pyramimonas cordata

 <400> 21

5

ES 2 636 487 T3

```

atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg      60
gtggtagccc ctgcaatddd ctcagctacc gacagcatcg gttggggtct taagcccatt      120
agcagcgcgga caaaggatct tcctctcggt gagagtcoga cgcgctcat actgagcctg      180
ttggcctatt ttgcatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctcgcaca      240
gtaaaggggc aagaccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcaaaa cgtgttcctc      300
attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac      360
tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt      420
ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac      480
gtcaaccagg tctctttcct gcatgtgtac catcatggtt ccatctctgg tatctggtgg      540
atgatcacct acgctgcccc tggcgggtgac gcgtaactct cggcggcgt caactcgtgg      600
gtgcaogtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccaa ggacgagaag      660
accaagcgca agtacctctg gtggggcgcg tacctgacct agatgcagat gttccagttc      720
ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta cccaagttc      780
atgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgctgctga tgctcttcgg caacttctac      840
tacatgaagc accacgagag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag      894

```

<210> 22

<211> 870

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 6 elongasa de *Pyramimonas cordata* en plantas (truncado en el extremo 3' y que codifica la elongasa funcional) (versión 1)

<400> 22

ES 2 636 487 T3

```

atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgaatgct      60
gttggtgctc ctgctatcct ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc      120
tcttctgcta ctaaggactt gctcttggtt gagtctocta cacctctcat cctttctttg      180
cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctctgttaca gaaaggtttt ccctagaacc      240
gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcaciaa cgtgttcctt      300
atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac      360
tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc      420
ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat      480
gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctgggtg      540
atgattactt acgctgctcc tgggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg      600
gttcacgtgt gtatgtacac ctactatfff atggctgcoq tgcttctaa ggacgagaaa      660
actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc      720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactcct catctcctta ccctaagttt      780
atcgtcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac      840
tcatgaagc accacgctag caagtgatga      870

```

- <210> 23
- <211> 870
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 6 elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (truncado en el extremo 3' y que codifica la elongasa funcional) (versión 2)
- <400> 23

ES 2 636 487 T3

```

atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgtgc tatcgatgct      60
gttggtgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc      120
tcttctgcta ctaaggactt gcctcttggt gagtctccta cacctctcat cctttctttg      180
cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc      240
gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacia cgtgttcctt      300
atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac      360
tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc      420
ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaat      480
gttaaccagg ttagcttctt tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg      540
atgattactt acgctgctcc tgggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg      600
gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa      660
actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aatgcagat gttccagttc      720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt      780
atcgctcagc tcctcgtggt gtacatgggt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac      840
tacatgaagc accacgctag caagtgatga      870

```

<210> 24

<211> 870

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 6 elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (truncado en el extremo 3' y que codifica la elongasa funcional) (versión 3)

<400> 24

```

atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgtgc tatcgatgct      60
gttggtgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc      120
tcttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta ccctcttat cctttctctc      180
ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc      240
gttaagggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacia cgttttcctt      300

```

ES 2 636 487 T3

atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360
 tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420
 ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaaac 480
 gttaaccagg tttccttcct ccatggtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg 540
 atgatcaact atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600
 gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660
 accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttacc agatgcaaat gttccagttc 720
 ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780
 attgctcaac tcctcgttgt ttacatggtt accctcctca tgcttttcgg aaacttctac 840
 tacatgaagc accacgcttc taagtgataa 870

<210> 25
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Pyramimonas cordata

5

<400> 25

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

10

ES 2 636 487 T3

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
 145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
 165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
 180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
 195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
 210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
 225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
 245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
 260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
 275 280 285

Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
 290 295

<210> 26
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Pyramimonas cordata
 <400> 26

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
 1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
 20 25 30

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
 35 40 45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
 50 55 60

5

10

ES 2 636 487 T3

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

<210> 27
<211> 1278
<212> AND
<213> Pavlova salina

5

<400> 27

ES 2 636 487 T3

```

atgccgccgc gcgatagcta ctcgtagccc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc      60
gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgatcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg      120
accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat      180
gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggctcgcca aggcggacaa gatgctcaag      240
tcgctgcctt cgcgcccggg gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc      300
gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcgaggggca tgtttgagcc gtcgctgccg      360
cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc      420
tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcccc      480
tggctcatgc acgagggcgg cactactcg ctccagggca acattgcttt tgaccgtgcc      540
atccaagtgc cgtgctacgg ccttggctgc gcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag      600
cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc      660
ccgctcgtcg ccttccacga gcggatagcc gcccaaggtga agagccccgc gatgaaggcg      720
tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc      780
tggcagctgt acctgcacct gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg      840
atgctcggca ttcgctacgg ccttgcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcgggggtac      900
gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcgcgccca tgtacatctt ctgcaacttt      960
gccgtgtcgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag     1020
tacgccgcga accacacgac caactgctcg cctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg     1080
tacctcaact accagatcga gcaccacctc taccctgcca tgccgcagtt ccgccacccg     1140
aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcaacta cgacgtgcgt     1200
ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg     1260
gagaagaaga tgcagtga                                     1278

```

5 <210> 28
 <211> 1281
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 5 desaturasa de Pavlova salina en plantas (versión 1)

<400> 28

ES 2 636 487 T3

```

atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt      60
gatactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatggt      120
accaacttcg ttaagagaca ccctgggtga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat      180
gctaccgatg cttacaagca gttccatggt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag      240
tctcttcctt ctcgtcctgt tcacaagggg tactctccaa gaagggctga tcttatcget      300
gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttctt      360
catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctgggtc tgctcttctt      420
tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga      480
tggcttatgc atgaggggtg acattactct ctcaactggaa acattgcttt cgacagagct      540
atccaagttg cttgttacgg acttggatgt ggaatgtctg gtgcttgggt gcgtaaccag      600
cataacaagc accatgctac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt      660
cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaagggta agtctcctgc tatgaaggct      720
tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttggg      780
tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaaggacta agcactacga tgagcttgcct      840
atgctcggaa tcagatacgg acttgttggg taccttgctg ctaactacgg tgctggatac      900
gttctcgtct gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc      960
gctgtttctc atactcaact ccctgttggt gagcctaacg agcatgctac ttggggttgag     1020
tacgctgcta accacactac taactgttct ccatcttggg ggtgtgattg gtggatgtct     1080
taccttaact accagatoga gcaccacctt tacccttcta tgcttcaatt cagacaccct     1140
aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcaact cgatgttaga     1200
ggatacttcg aggctatggc tgatacttcc gctaaccttg ataacgttgc ccatgctcct     1260
gagaagaaaa tgcagtaatg a                                             1281

```

5 <210> 29
 <211> 1281
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 5 desaturasa de Pavlova salina en plantas (versión 2)

<400> 29

ES 2 636 487 T3

atgcctccta gggactctta ctottacgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgagggt 60
 gacactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtg 120
 accaacttcg ttaagagaca cctgggtgga aagatcattg cttaccaagt gggaactgat 180
 gctaccgatg cttacaagca gttccatgtg agatctgcta aggctgacaa gatgctcaag 240
 tctctccctt ctagacctgt tcacaaggga tactctccta gaagagctga tcttatcgct 300
 gacttccaag agttcactaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgaacc ttctctcct 360
 catgttgctt accgtcttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctgggtc tgctcttacc 420
 tggcacggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgcgga 480

 tggcttatgc atgaggggtg aactactct cttaccggaa acattgcttt cgatagggct 540
 atccaagttg cttgttacgg acttggatgc ggaatgtctg gtgcttgggt gagaaaccag 600
 cataacaagc accatgctac tcctcaaaaag ctccagcacg atgttgatct tgataccctc 660
 cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctctgc tatgaaggct 720
 tggctctcca tgcaagctaa actcttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttggg 780
 tggcagcttt accttcacc tagacacatg ctcaagaacta agcactacga cgagcttgcct 840
 atgcttggta tcagatacgg acttgtggga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900
 gttcttgcct gctaccttct ctacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960
 gctgtttctc aactcactc cctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020
 tacgctgcta accacactac taactgctct ccatcttggg ggtgtgattg gtggatgagc 1080
 tacctcaact accagatcga gcatcacctt tacccttcta tgctcagtt caggcatcct 1140
 aagatcgctc ctagagtga gcaactctc gagaagcacg gacttcaacta cgatgtgcgt 1200
 ggatacttcg aggctatggc tgatacttcc gctaacctcg ataactgtgc tcatgctcct 1260
 gagaagaaaa tgcaatgatg a 1281

<210> 30
 <211> 425
 5 <212> PRT
 <213> Pavlova salina

 <400> 30

ES 2 636 487 T3

Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val
 20 25 30

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

Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala
 50 55 60

Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys
 65 70 75 80

Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala
 85 90 95

Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
 100 105 110

ES 2 636 487 T3

Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
 115 120 125
 Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
 130 135 140
 Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
 145 150 155 160
 Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
 165 170 175
 Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
 180 185 190
 Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
 195 200 205
 Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
 210 215 220
 Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
 225 230 235 240
 Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
 245 250 255
 Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
 260 265 270
 Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
 275 280 285
 Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
 290 295 300
 Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
 305 310 315 320
 Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
 325 330 335
 Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser
 340 345 350
 Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
 355 360 365

ES 2 636 487 T3

His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
370 375 380

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

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
405 410 415

Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
420 425

<210> 31

<211> 1329

5 <212> ADN

<213> Pyramimonas cordata

<400> 31

ES 2 636 487 T3

```

atgggaaagg gaggcaatgc tagcgctcct actgcgaaga aggaggtggt gatcgagggg      60
aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtggtt cgatcatcaa gtttctctcg      120
ggttctggtg ctgacgccac cgcttcctac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca      180
gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg      240
gttgagttct ccaagctcaa cccgccctcc gcgagagtg cctctgctcc cctgaccgac      300
cttgccaagg tggaagcgct gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gctcattcag      360
gagggcttct ttaagcccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg      420
atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgttgt gaccctcgga      480
gttctgatcc gcggcattgc acagggccgg tgcggttggc ttatgcacga gggcggccac      540
tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc      600
ggctgtgaa  tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaaccca      660
cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttcctc tgatggcttt caacaacgct      720
gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag      780
gccttcctct tcttccccgt gacctccctt ctggtcggcc tcggttggac caccgtcctc      840
caccocaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt      900
tacgaggtt  tcgctgctct ttctgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc      960
tacctcgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatatttca tcaacttctc ggtctctcac      1020
actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggctgtgta ttcggccatc      1080
cacaccacta acatcaaate cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc      1140
cagatcgagc atcacctggt cccttcaatg ccccagttcc gccacaagat tatctccccg      1200
cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgcc ctattggggg      1260
gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttggca ctcacgcata tcaactccaag      1320
gcgcactag                                     1329

```

5 <210> 32
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Pyramimonas cordata
 <400> 32

ES 2 636 487 T3

Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val
 1 5 10 15

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly
 20 25 30

Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala
 35 40 45

Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu
 50 55 60

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

Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala
 85 90 95

Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu
 100 105 110

Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile
 115 120 125

Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val
 130 135 140

Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly
 145 150 155 160

Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His
 165 170 175

Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg
 180 185 190

ES 2 636 487 T3

Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp
 195 200 205

Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln
 210 215 220

His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala
 225 230 235 240

Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp
 245 250 255

Leu Lys Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Val
 260 265 270

Gly Leu Gly Trp Thr Thr Val Leu His Pro Arg His Ser Leu Arg Thr
 275 280 285

Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
 290 295 300

Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
 305 310 315 320

Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe
 325 330 335

Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu
 340 345 350

His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser
 355 360 365

Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His
 370 375 380

His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro
 385 390 395 400

Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg
 405 410 415

Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val
 420 425 430

Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His
 435 440

ES 2 636 487 T3

5 <210> 33
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Pyramimonas cordata

<400> 33

```

atggcgctcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat      60
gtcgcaaacc cagatattcc tgcacccgag aagggtgctg cttactttat gcaggtcgag      120
tattgggggc caacgattgg gaccatcggg tatcttctgt tcatctactt tggtaaaccg      180
attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggg gtacaacttc      240
tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag      300
gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag      360
gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacggt cttcatggtc      420
atgcgcaaga agtttgacca gctttcgttc ctgcacattt accatcatac cctggtgatc      480
tggctcttgg tctgtgtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc      540
gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tctgtactatg gccttgccgc gctcgggggtg      600
aattgcttct ggaagaagta cattaacgag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct      660
tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgctg tctggttgcc ttacttgacg      720
ctgtgggtga tgggtaacat gttcgtgttg ttcgccaact tctatcgcaa gcgctacaag      780
agcaaggggtg ccaagaagca gtaa                                             804
  
```

10 <210> 34
 <211> 807
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 5 elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (versión 1)

20 <400> 34

ES 2 636 487 T3

```

atggcctcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat      60
gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag      120
tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt      180
atcatgcaga acagatctca acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc      240
taccagacct tcttcaacag ctactgcata taccttttctg ttacttctca tagggctcag      300
ggacttaagg tttggggaaa catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag      360
gttatctggc ttcactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg      420
atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcctc      480
tggatcatggt tcgttggtat gaagcttgag cctggtggag attgctactt cggatcttct      540

gttaacacct tcgtgcaagt gatcatgtac tcttactacg gacttgetgc tcttggagtt      600
aactgtttct ggaagaagta catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct      660
tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttacctcaa      720
ctctgggtta tggatgaacat gttcgttctc ttcgccaaact tctaccgtaa gaggtacaag      780
tctaagggtg ctaagaagca gtgataa                                           807

```

<210> 35

<211> 867

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 5 elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (versión 2)

<400> 35

ES 2 636 487 T3

atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct 60
gttgttgctc ctgctatcct ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc 120
tcttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta ccctcttat cctttctctc 180
ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctctgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc 240
gttaaggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacia cgttttcctt 300
atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctctgtttacc aggcttacgt gaacaagtac 360
tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420
ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacacctca tcatgcttct caagggaaac 480
gttaaccagg tttccttctt ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg 540
atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600
gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660
accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttacc agatgcaa atgttccagttc 720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780
attgctcaac tcctcgttgt ttacatggtt accctcctca tgcttttcgg aaacttctac 840
tacatgaagc accacgcttc taagtga 867

<210> 36
<211> 807
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 5 elongasa de Pyramimonas cordata en plantas (versión 3)

<400> 36

atggcttcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt gacctacaac 60
gtggctaacc ctgatattcc tgcttctgag aaggttccag cttacttcat gcaagtggag 120
tactggggac ctactatcgg aactatcggg tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt 180
atcatgcaaa acagaagcca gcctttcggg cttagaagac ctatgctcgt gtacaacttc 240
taccagacct tcttcaacag ctactgcata tacctcttctg ttacctctca tagggctcag 300
ggacttaaaag tttggggaaa catccctgat atgaccgcta actcttgggg aatctctcag 360
gttatctggc tccactacaa caacaagtac gtggagcttc togatacctt cttcatggtg 420
atgaggaaga agttcgacca gctttcttct cttcacatct accaccacac tcttctcatc 480
tggatcatggt tcgtggttat gaagctcag cctgttggag attgctactt cggatctagc 540
gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgcctc tcttggagtt 600
aactgcttct ggaagaagta catcaccocag atccagatgc ttcagttctg tatctgcgct 660
tctcactcta tetacaccgc ttacgttcag aacctgctt tctggttcc ttaccttcag 720
ctctgggtga tggtaacat gttcgtgctc ttcgctaact tctaccgtaa aaggtacaag 780
agcaagggtg ctaagaagca gtgataa 807

<210> 37
 <211> 267
 <212> PRT
 5 <213> Pyramimonas cordata

<400> 37

Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
 1 5 10 15

Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val
 20 25 30

Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
 35 40 45

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
 50 55 60

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
 65 70 75 80

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
 85 90 95

His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
 100 105 110

ES 2 636 487 T3

Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
 115 120 125

Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
 130 135 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
 145 150 155 160

Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
 165 170 175

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

Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
 195 200 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
 210 215 220

Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
 225 230 235 240

Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
 245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
 260 265

5 <210> 38
 <211> 1344
 <212> AND
 <213> Pavlova salina
 <400> 38

ES 2 636 487 T3

```

atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca      60
gattcgctcg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt      120
gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcadc cgggtggcgc gcactttgtg      180
tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcattg agtaccaccg gcgcgcctgg      240
cccaagtgcg gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc      300
gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcacgc ccaagatggg gccgtcggtc      360
agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg      420
atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc      480

gggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc      540
tccaagtgcg cctcgggtcaa cctggcgctc gggttgtgcc aggactggat cggcggggagc      600
atgacacctc ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac      660
aaggaccgag accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc      720
ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag      780
ctgctgtttc tcgacatcag cgagctggtg atgtggcggg gggagggcga gcccatcagc      840
aagctggccg ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc      900
tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgccc agcgtgcaca cggcgggtgtg catcgcggcg      960
acggtaatga cggggagctt ctacctgcc ttcttcttct tcactctgca caacttcgag     1020
ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcactcttc     1080
ctcaagcggc aggccgagac ctcgccaac gtgggcggcc cgtgctcgc cacgctcaac     1140
ggcggcctca actaccaaact cgagcaccac ctcttccccg ggggtcacca cgcttctac     1200
cctcgcctcg gcgcgttggt caaggcggag ctcgagggcg gcggcattga gtacaagcac     1260
taccacacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc     1320
aggccgcgca gcaaggcggg gtga                                             1344

```

<210> 39
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 4 desaturasa de Pavlova salina en plantas (versión 1)

10

<400> 39

ES 2 636 487 T3

```

atgccaccta gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tgggtgttact      60
gactcttctg ctttcaccag aaaggatggt gctgatagac ctgatctcac catcgttggga      120
gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctgggtgggc tcatttctgt      180
tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggcttgg      240
cctaagtcta gaatgtctag attccacggt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt      300
gctgctgatg agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt      360
tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gtaaggctg gacttatcct tggatctgct      420
atcgctcttg aggcttacet gctttacgct gaaagagac ttctcccttc tatcgttctt      480
ggatggcttt tcgctcttat cggctttaac atccagcatg atgctaacca tgggtgctttg      540
tctaagtctg cttctgttaa ccttgctcct ggactttgtc aggattggat cggaggatct      600
atgatccttt ggcttcaaga gcatgttggt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat      660

aaggatcctg atcaaaaggc tcacgggtgct cttagactca agcctactga tgcttgggtca      720
cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctgggtg agactatgta cgctttcaag      780
cttttgttcc tcgacatctc tgagcttggt atgtggcgtt gggaggggtga gcctatctct      840
aagcttgctg gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga      900
ttcgttgctt tgcctcttta ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgtctgct      960
actgttatga ctggatcttt ctacctogct ttctttctct tcatctccca caacttcgag     1020
gggtgttgctt ctggttgacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc     1080
cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac     1140
ggtggactca actaccaa at tgagcatcac ttgttcctca gagttcacca tggattctac     1200
cctagacttg ctctcttctg taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac     1260
taccctaeta tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga     1320
aggcctagat ctaaggctga gtaatga                                           1347

```

<210> 40
 <211> 1347
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 4 desaturasa de Pavlova salina en plantas (versión 2)

<400> 40

ES 2 636 487 T3

atgcctccat ctgctgctaa acagatggga gcttctactg gtgttcacgc tgggtgttacc 60
 gattcttctg ctttcaccag aaagatgtg gctgatagac ctgatcttac catcgttggt 120
 gactctgtgt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctgggtggtc tcatttcgtt 180
 tcactcttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccacag aagagcttgg 240
 cctaagtcta ggatgtctag gttccatggt ggatctcttg cttctaccga ggaacctggt 300
 gctgctgatg agggatacct tcagctttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtg 360
 tcactctggat tcgctccagc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct oggatctgct 420
 atcgctcttg aggcttacat gctctacgct gaaagagac ttctcccttc tctcgttctt 480
 ggatggctct tcgctcttat cggacttaac atccagcatg acgctaacca tgggtgcttg 540
 tctaagtctg ctagcgtaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600
 atgatccttt ggctccaaga gcatgttggt atgcaccacc tccacaccaa cgatgttgat 660
 aaggacctg atcaaaaggc tcatgggtgct cttagactca agcctaccga tgcttggtca 720
 cctatgcatt ggcttcagca cctttacctt ctccctgggt aaactatgta cgctttcaag 780
 ctctcttcc tcgatatctc tgagcttggt atgtggagat gggagggtga acctatctct 840

 aagctcgctg gatacctctt catgccttct cttctctca agcttacctt ctgggctaga 900
 ttcgttgctc ttcctcttta cctcgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tctcgctgct 960
 actggtatga ccggaagctt ctaccttgct ttcttctctt tcactcagca caacttcgag 1020
 ggtggtgctt ctggtggacc tgatggatct atcacctcta tgaccagggg agcttctttc 1080
 ctttaagaggc aggctgagac ttcttctaat gtgggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140
 ggtggactca actaccaaact cgagcaaccac cttttcccta gagttcacca cggattctac 1200
 cctagacttg ctctcttctg gaaggctgaa cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260
 taccctacca tctggtctaa cctcgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320
 aggcttagat ctaaggctga gtgatga 1347

5 <210> 41
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Pavlova salina

 <400> 41

ES 2 636 487 T3

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

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

Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala
 35 40 45

Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly
 50 55 60

Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
 65 70 75 80

Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
 85 90 95

Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
 100 105 110

Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser
 115 120 125

Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
 130 135 140

Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu

ES 2 636 487 T3

Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile
 405 410 415

Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu
 420 425 430

Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu
 435 440 445

5 <210> 42
 <211> 792
 <212> ADN
 <213> Isochrysis galbana

<400> 42

atggcctcgc caaacgacgc gggagagcgc atctgggcgg ctgtgaccga ccggaaatc 60
 ctccattggca ccttctcgta cttgctactc aaaccgctgc tccgcaattc cgggctggg 120
 gatgagaaga agggcgcata caggacgtcc atgatctggg acaacgttct gctggcgctc 180
 ttctctgcgc tgagcttcta cgtgacggcg accgcctcgc gctgggacta tggtacgggc 240
 gcgtggctgc gcaggcaaac cggcgacaca ccgcagccgc tcttccagtg cccgtccccg 300
 gtttgggact cgaagctctt cacatggacc gcccaaggcat tctattactc caagtacgtg 360
 gagtacctcg acacggcctg gctggtgctc aagggcaaga ggggtctcctt tctccaggcc 420
 ttccaccact ttggcgcgcc gtgggatgtg tacctcggca ttcggctgca caacgagggc 480
 gtatggatct tcatgttttt caactogttc attcacacca tcatgtacac ctactacggc 540
 ctcaccgccg ccgggtataa gttcaaggcc aagccgctca tcaccgcat gcagatctgc 600
 cagttcgtgg gcggttctct gttggtctgg gactacatca acgtcccctg cttcaactcg 660
 gacaaaggga agttgttcag ctgggctttc aactatgcat acgtcggctc ggtcttcttg 720
 ctcttctgcc actttttcta ccaggacaac ttggcaacga agaaatcggc caaggcgggc 780
 aagcagctct ag 792

10
 15 <210> 43
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Isochrysis galbana

<400> 43

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

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
 20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg

ES 2 636 487 T3

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

<210>44
 <211>801
 <212>ADN

ES 2 636 487 T3

<213> *Emiliana huxleyi*

<400> 44

```

atgctcgatc ggcctcgtc cgacgcggcc atctggctg cgggtgccga tccggaaatc      60
ctgacggca cttctccta cctgctgctc aagccgctgc tacgcaactc agggctcgtg      120
gacgagcggg aaggcgccta ccggacctcg atgatctggt acaacgtggt gctcgcgctc      180
ttctccgcga cgagcttcta cgtgactgcg accgcgctcg ggtgggacaa gggcaccggc      240
gagtggctcc gcagtctcac gggcgacagc ccgcagcagc tgtggcaatg cccgtcgagg      300
gtatgggact ccaagctggt cctgtggacg gccaaaggcct tctactactc aaagtacgtg      360
gagtacctcg acacggcgtg gctcgtcctc aaggggaaga aggtctcctt cctgcagggc      420
ttccaccact ttggcgcgcc gtgggacgtg tacctgggca ttcggctgaa gaacgagggc      480
gtgtggatct tcatgttctt caactcgttc atccacacgg tcatgtacac gtactacggc      540
ctcaccgccg cgggctacaa gatccgcggc aagccgatca tcaccgcgat gcaaataagc      600
cagttcgtcg gcggctttgt cctagtgtgg gactacatca acgtgccgtg cttccacgcc      660
gacgccgggc aggtcttcag ctgggtcttt aactatgctt acgtcggctc cgtctttctg      720
ctgttctgcc acttcttcta catggacaac atcgcgaagg ccaaggccaa gaaggccgtc      780
gctaccgccg aggcgctgtg a                                     801

```

5

<210> 45

<211> 801

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Marco de lectura abierto optimizado por codones para la expresión de la 9 elongasa de *Emiliana huxleyi* en plantas

15

<400> 45

ES 2 636 487 T3

```

atgcttgata gagcttcate tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tectgagatc      60
cttatcggaa ccttctotta ctttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgtg      120
gatgagagaa agggagotta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt      180
ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaaactgg      240
gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg cccttctaga      300
gtttgggaca gcaaactcct cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacggt      360
gagtaccttg aactgcttg gcttgttctc aagggaaaga aggtttcatt cctccaggga      420
ttccatcatt tcggtgctcc atgggatggt taccttgaa tcaggcttaa gaacgaggga      480
gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atocacactg ttatgtacac ttactacgga      540
cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaactcct      600
caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct      660
gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggato tgttttctt      720
ctttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt      780
gctaccagaa aggctctttg a                                          801

```

- <210> 46
- <211> 266
- 5 <212> PRT
- <213> *Emiliana huxleyi*
- <400> 46

ES 2 636 487 T3

Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr
50 55 60

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

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro
180 185 190

Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu

ES 2 636 487 T3

195	200	205
Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln		
210	215	220
Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala		
245	250	255
Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu		
260	265	

5 <210> 47
 <211> 819
 <212> AND
 <213> Pavlova pinguis
 <400> 47

atggttgogc caccoatcac gtcgagtg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg	60
ttcggtgggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgccgc cttttgaag	120
cgcacccocgt tggtgacac gcggaagggc gcgtataaga gtggatgat cgcgtacaac	180
gtgatcatgt gcgtgttctc gctgggtgtc ttcactctgcc agctcgcagc cctgggctat	240
gacatgggct acttgacagt ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt cccctctac	300
caggacgtgt ccccgctccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc	360
ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctggatgat gaagggcaag	420
cccgtgtcct tgcctocagg cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc	480
atcaccttcc agaacgagg catctacgtg ttogtgggtgc tcaacgcctt catccacag	540
atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc	600
atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatgggtgta tcaactacatc	660
accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg	720
tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag	780
aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag	819

10
 15 <210> 48
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Pavlova pinguis
 <400> 48

ES 2 636 487 T3

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

ES 2 636 487 T3

	260	265	270				
	<p><210> 49 <211> 840 <212> AND <213> Pavlova salina</p>						
5	<p><400> 49</p>						
	atggcgactg	aagggatgcc	ggcgataacg	ctggactggc	tgctctcgcc	cgggctgaag	60
	gatgccgtaa	ttggcgggga	ggtgctctac	ttttcgcttg	ggtatctgct	gctcagagccc	120
	atcctcaagc	gctcaccggt	tgtggacaag	cgcaagggcg	cataccgcaa	cggcatgatc	180
	gcgtacaaca	tcctcatgtg	cggtttctcg	ctggtatgct	tcgtgtgcca	gatggcggcg	240
	ctcggccttg	atcgcggcca	cctgcagttt	gtccgcgacc	tcacgggcca	cagcgtggtg	300
	cagctctacc	aggacgtgag	ccatcccct	gcattcgcga	acaagctctt	ccggactca	360
	gcggtgccgt	tccactactc	aaagtacgtg	gagtacatgg	acacagcgtg	gcttgctgtg	420
	aagggcaagc	ccgtctcggt	cctgcagggc	ttccaccact	tcggcgccgc	gtgggacacc	480
	tactttggca	tcacgtttca	gaacgagggc	acctacgtct	ttgtgctgct	caacgcattc	540
	atccacacaa	tcattgtacac	ctactacggc	gcgacggcag	cgggcatcaa	aatctcgatg	600
	aagccgctga	tcaccctcat	gcagatcacg	cagttcctgc	tgggcttcgc	gctcgtctac	660
	ccgtacattg	acctcgggta	cttcctgctg	tcgcccggag	tcgtgtggag	ctacctgttc	720
	aactatgcgt	acgtactcat	ggtgctcttc	ctcttcctgc	gcttcttcta	ccacgacaac	780
10	tttagcaagc	acaagccaat	ctcgcgcctc	gactccagca	accgcatgaa	aaccgagtag	840
	<p><210> 50 <211> 279 <212> PRT <213> Pavlova salina</p>						
15	<p><400> 50</p>						

ES 2 636 487 T3

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

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

Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val
35 40 45

Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile
50 55 60

Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala
65 70 75 80

ES 2 636 487 T3

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

<210> 51
 <211> 1284
 <212> AND
 <213> Pavlova salina

5

<400> 51

ES 2 636 487 T3

```

atgggacgcg gcgagacag cagtgggag ggcacccg cggcggagct ggcgggccg      60
agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc      120

aagcgcgttg atgtgaccaa gttccaacgc acgcaccggt gtggtagcaa ggtcttccgg      180
atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc      240
aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc      300
tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt      360
tactacgatc catgccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc      420
tttgccggca tgtacatgct caaggcgggc gtccggctcc cgctctcggg cgcctcatg      480
gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctccgcacg actatctgca ccaactcgtc      540
ttcaaggggt ccgtcgcacg caccgtcggg tggaaacaac cggcgggcta cttcctcggc      600
ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtgggtg cgcgcgcggc ataacacgca ccactgtgac      660
accaatgagg acggctcggg ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc      720
aacaagccga gcacgcgcaa gcgcctgaac gccttccagc gctaccagca gtactactat      780
gtgcgggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg      840
atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctccgactcg tcgcgcacta cgcctatgct      900
gcgtgggtct ttgcggggca ctaccacctg ctcccgtcgt tgacggttct gcgcggggtt      960
ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacgggtgagg acattctoga cgcggaccag     1020
gtcgcgcaca tgacgctcgt cgagcagacg gcaactcaact cgcgcaacat ctccggcggc     1080
tggctcgtga acgtgctcac cggcttcacg tcaactgcaga cggagcacca cctgttcccg     1140
atgatgcaa cggcaacct catgactatc cagcccaggg tgcgcgcctt cttcaagaag     1200
cacggacttg agtaccgca gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgoc     1260
cttgcatcgc agcacctgct ttga                                             1284

```

5 <210> 52
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Pavlova salina
 <400> 52

ES 2 636 487 T3

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

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

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

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
50 55 60

ES 2 636 487 T3

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
 65 70 75 80
 Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp
 85 90 95
 Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met
 100 105 110
 Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp
 115 120 125
 Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met
 130 135 140
 Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met
 145 150 155 160
 Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu
 165 170 175
 His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn
 180 185 190
 Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu
 195 200 205
 Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp
 210 215 220
 Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg
 225 230 235 240
 Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln
 245 250 255
 Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg
 260 265 270
 Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro
 275 280 285
 Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe
 290 295 300
 Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe

ES 2 636 487 T3

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
 65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
 85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
 100 105 110

Val Ser Lys Pro
 115

5 <210> 55
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Virus del arrugado del nabo
 <400> 55

ES 2 636 487 T3

Met Glu Asn Asp Pro Arg Val Arg Lys Phe Ala Ser Glu Gly Ala Gln
1 5 10 15

Trp Ala Ile Lys Trp Gln Lys Lys Gly Trp Ser Ser Leu Thr Ser Arg
20 25 30

Gln Lys Gln Thr Ala Arg Ala Ala Met Gly Ile Lys Leu Ser Pro Val
35 40 45

Ala Gln Pro Val Gln Lys Val Thr Arg Leu Ser Ala Pro Val Ala Leu
50 55 60

Ala Tyr Arg Glu Val Ser Thr Gln Pro Arg Val Ser Thr Ala Arg Asp
65 70 75 80

Gly Ile Thr Arg Ser Gly Ser Glu Leu Ile Thr Thr Leu Lys Lys Asn
85 90 95

Thr Asp Thr Glu Pro Lys Tyr Thr Thr Ala Val Leu Asn Pro Ser Glu
100 105 110

Pro Gly Thr Phe Asn Gln Leu Ile Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Glu Lys
115 120 125

Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Arg Phe Arg Tyr Ser Pro Met Ser Pro Ser
130 135 140

Thr Thr Gly Gly Lys Val Ala Leu Ala Phe Asp Arg Asp Ala Ala Lys
145 150 155 160

Pro Pro Pro Asn Asp Leu Ala Ser Leu Tyr Asn Ile Glu Gly Cys Val
165 170 175

Ser Ser Val Pro Trp Thr Gly Phe Ile Leu Thr Val Pro Thr Asp Ser
180 185 190

Thr Asp Arg Phe Val Ala Asp Gly Ile Ser Asp Pro Lys Leu Val Asn
195 200 205

Phe Gly Lys Leu Ile Met Ala Thr Tyr Gly Gln Gly Ala Asn Asp Ala
210 215 220

Ala Gln Leu Gly Glu Val Arg Val Glu Tyr Thr Val Gln Leu Lys Asn
225 230 235 240

Arg Thr Gly Ser Thr Ser Asp Ala Gln Ile Gly Asp Phe Ala Gly Val

ES 2 636 487 T3

Met His Gly Ile Glu Gln Pro Gln Leu Pro Leu Asp Tyr Val His Arg
 1 5 10 15

Cys Ala Ser Thr Ser Phe Leu Leu Ala Ser Leu Asp Gly Leu Leu Ser
 20 25 30

Glu Ala Arg Glu Leu Ser Gly Pro Leu Ala Leu Ile Thr Ser Ser Tyr
 35 40 45

Tyr Leu Leu Val Ser Ile Ala Leu Cys Trp Ala Ile Pro Gly Ser Phe
 50 55 60

Trp Tyr Arg Pro Gly Cys Trp Leu Gln Pro Val Ser Gly Arg Asn Leu
 65 70 75 80

Ile Phe Cys Gly Pro Thr Glu Ala Leu Gln Arg Phe Arg Leu Tyr Ala
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Leu Val Leu Ser Glu Asn Cys Pro Arg His Gly Gln
 100 105 110

Ser Ala Ala Ile Thr Leu Gln Ser Tyr Trp Ala Leu Pro Asn Asn Ile

ES 2 636 487 T3

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

<210> 57
 <211> 256
 5 <212> PRT
 <213> Virus del enanismo amarillo del cereal
 <400> 57

ES 2 636 487 T3

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

<210> 58
 <211> 519
 <212> ADN
 <213> Virus del enanismo arbustivo del tomate

 <400> 58

ES 2 636 487 T3

atggaacgag ctatacaagg aaacgacgct agggaacaag ctaacagtga acgttgggat 60

ggaggatcag gaggtaccac ttctcccttc aaacttctg acgaaagtcc gagttggact 120

gagtggcggc tacataacga tgagacgaat tcgaatcaag ataatcccct tggtttcaag 180

gaaagctggg gtttcgggaa agttgtatth aagagatata tcagatacga caggacggaa 240

gcttcaactgc acagagtcc tggatcttgg acgggagatt cggttaacta tgcagcatct 300

cgatthtttcg gtttcgacca gatcggatgt acctatagta ttcggthttcg aggagttagt 360

atcaccgtht ctggagggtc gcgaactctt cagcatctct gtgagatggc aattcggctc 420

aagcaagaac tgctacagct tgccccaatc gaagtggaaa gtaatgtatc aagaggatgc 480

cctgaaggta ctgagacctt cgaaaaagaa agcgagtaa 519

5 <210> 59
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Virus del rizado amarillo de la hoja del tomate

10 <400> 59

atgtgggatc cacttctaaa tgaatthctt gaatctgttc acggatthtc ttgtatgth 60

gctattaaat atthgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120

thaatagggt atcttatata tgttgtaagg gccctgact atgtcgaagc gaccaggcga 180

tataatcatt tccacgcccg cctcgaagg tgcgccgaag ctgaacttcg acagcccata 240

cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300

caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

15 <210> 60
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Virus del arrugado del nabo

20 <400> 60

ES 2 636 487 T3

```

atggaaaatg atcctagagt ccgaaagttc gcatccgagg gcgccaatg ggcgataaag      60
tggcagaaga agggctggtc atccctaacc agcagacaga aacagaccgc ccgcgacagcg      120
atggggatca agctctcccc tgtggcgcaa cctgtgcaga aagtgactcg actgagtgct      180
ccggtggctc tcgcctaccg cgaggtttcc acccagcctc gggtttctac tgccagggac      240
ggcataacca gaagcggttc tgaactgatc acaaccctga agaagaacac tgacactgaa      300
cctaagtaca ccacagctgt gcttaaccga agcgaaccog gaacattcaa ccaactcatc      360
aaggaggcgg cccagtatga aaaataccga ttcacgtcac tcagatttag gtactctccc      420
atgagccctt caaccaccgg gggcaagggt gctctggcat tcgaccgaga cgctgccaaa      480
cctccgccca acgacctcgc ttccctctac aacatagagg gttgtgtatc tagcgtgccc      540
tggacagggt ttatthttgac cgtcccaaca gattctactg accgctttgt ggcgatgggt      600
atcagcgatc caaagcttgt caatttcggc aagctcatca tggccaccta tggccaagga      660

gccaatgatg ccgccaact cggatgaagtg cgagtcgagt acaccgtgca gctcaagaac      720
agaactggct caaccagcga cgcccagatt ggggacttcg cgggtgttaa ggacggacct      780
aggttggtct cgtggtccaa gaccaaggga acagctgggt gggagcacga ttgtcatttt      840
ctcggaaaccg gaaacttctc gttgacactg ttctacgaga aggcgcccggt ttcggggcta      900
gaaaacgcag acgcctctga cttctcggtc ctgggagaag ccgagcagg tagtgtccaa      960
tgggctggag tgaaggtagc agaaagggga caaagcgtga aatggtcac aactgaggag     1020
cagccaaggg gaaaatggca agcactcagg atttag                                  1056

```

<210> 61

<211> 912

5 <212> ADN

<213> Virus del mosaico del guisante

<400> 61

ES 2 636 487 T3

atgcacggaa ttgagcagcc tcaactaccg ctagattacg ttcaccgttg cgcacccaacc 60
 tccttcttgc tcgcatcact agatggcctc ctttctgaag cccgtgaact ctcagggcct 120
 ctggctctca ttacttctag ctattactta cttgtttcta ttgccctctg ctgggcaatc 180
 cctggatcct tctggtatag gcctggctgc tggttgcagc cagtctcagg gcggaatctc 240
 atcttttgcg gccctaccga ggcccttgcaa cgattccgtc tgtacgctgc cagacttggg 300
 ttggtcctgt cagagaactg cccaagacac ggccaatcag cagcaatcac ccttcaatca 360
 tactgggcac ttccatacaa catctggatg gacatggccc aattggactt gctcaccttc 420
 tcaatgcaa ttgctaatac atttgcctac ttggcagatt gtgaagcaag atttctcct 480
 attgttgaag gagtgggatc tgcttactat gtgccaacgc tgctcggact tactcaccia 540
 gaccccaggc tttatcttgc gcttcgcagg agaaaccttg atcttagtgg cgaacctcat 600
 agagtctgc ctggtgtcct ggagtctatg gctttgctct gttctagtgt acgtagcaca 660
 agccgttcca ggcaaattcc tcctttatat gccagcgttt tgcaccacgt tttgggcctg 720
 gccgagagag actgcatcct ctttgatagc gatagtaact actcctctta cactcatcgg 780
 gttcttgaac aagaccggaa tcgggctgat cagtcattgt ttagcattga cttggaatat 840
 gttcatgacc tggagcttat tgccctgggt tactctgatg aagatgatga agatcttgat 900
 aacttcttct ag 912

<210> 62
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> Virus del enanismo amarillo del cereal
 <400> 62

5

atgttcatcg cccaaccttg cgggcgagtt cttgtgttcg acgtcgcctc ccgcacgcca 60
 tcgttcttca ctogttatag tgttgaactc tcgctccgtg ttctagacc attcttcacg 120
 cgagcagtaa cagatttccg atacacccaa aatgaaatcg atttatttg tgtgtctctt 180
 ggctttctgt tgccaattct cctcacagga gaatcttact cttggcgcgg tcacctcaac 240
 ctcccccttt cttacaccga attacttggt cgatgggggc tcgcagtggg gtacttccct 300
 accttctcca ctgatggtga cattogacag aaccocagaac tccgcatcga cctgtccacc 360
 atgtcaaccc gctottteta cgagcagttc ctactcagat ataacacgag tgggttgcca 420
 aaagctatcg tcggacagca agagtgcttt caaagcggca tggagtcttt taaaagattc 480
 ctacactacc gcctcacgtg ctttgaaagc tgccctccac gacctcgttg gaaagtctct 540
 ttggctcctg gtoccttatct ggacagggct tttgaggcaa ctcttctcgg ccgtatggct 600
 ggtcataacc aactactctt taccggtttg tcttctgata tcactaggta ttataacgag 660
 ttggttgtgg aaggcgtgcc ggtggtcttt tgggacgctg ccggcattac tttgcatcac 720
 gctggtgaag aatatttttc gaattcttac attcaaaaga ttcttcaatg a 771

10

<210> 63
 <211> 389

ES 2 636 487 T3

<212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 63

5

```

Met Val Ile Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe
 1           5           10           15

Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu
 20           25           30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
 35           40           45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
 50           55           60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
 65           70           75           80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
 85           90           95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
 100          105          110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
 115          120          125
  
```


ES 2 636 487 T3

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
130 135 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe
145 150 155 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
165 170 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
180 185 190

Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
195 200 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
210 215 220

Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
245 250 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
260 265 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
275 280 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
305 310 315 320

Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
325 330 335

Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
370 375 380

ES 2 636 487 T3

Thr Glu Lys Glu Lys
385

5 <210> 64
<211> 281
<212> PRT
<213> Limnanthes alba

<400> 64

Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys
1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met
20 25 30

Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu
35 40 45

Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp
50 55 60

Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly
65 70 75 80

Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser
85 90 95

Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro
100 105 110

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

Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr
130 135 140

Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala
145 150 155 160

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

Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu
180 185 190

Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu
195 200 205

10

ES 2 636 487 T3

Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys
 210 215 220

Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro
 225 230 235 240

Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val
 245 250 255

Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys
 260 265 270

Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys
 275 280

<210> 65
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

5

<400> 65

Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val
 1 5 10 15

Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile
 20 25 30

Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala
 35 40 45

Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys
 50 55 60

Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala
 65 70 75 80

Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro
 85 90 95

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

Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser
 115 120 125

Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val
 130 135 140

10

ES 2 636 487 T3

Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser
 145 150 155 160

Tyr Thr Ser Glu Leu Thr Met Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His
 165 170 175

Leu Ala Gln Gln Gly Lys Ile Pro Ile Val Pro Val Val Val Ser Asn
 180 185 190

Thr Ser Thr Leu Val Ser Pro Lys Tyr Gly Val Phe Asn Arg Gly Cys
 195 200 205

Met Ile Val Arg Ile Leu Lys Pro Ile Ser Thr Glu Asn Leu Thr Lys
 210 215 220

Asp Lys Ile Gly Glu Phe Ala Glu Lys Val Arg Asp Gln Met Val Asp
 225 230 235 240

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

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

Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
 275 280 285

Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
 290 295 300

5 <210> 66
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Micromonas pusilla
 <400> 66

ES 2 636 487 T3

Met Thr Pro Tyr Gln Trp Phe Asn Val Val Ser Ser Leu Gly Tyr Val
1 5 10 15

Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Met Leu Val Pro Ala Ile
20 25 30

Ile Leu Leu Arg Pro Val Ser Ala Asn Leu Tyr Ala Arg Cys Thr Ser
35 40 45

Trp Ile Phe Ala Cys Trp Trp Thr Ser Cys Leu Phe Ile Thr Glu Arg
50 55 60

ES 2 636 487 T3

Leu Asn Gly Val Lys Val Arg Val Thr Gly Asp Ala Leu Pro Leu Asn
 65 70 75 80
 Ala Pro Leu Leu Ile Met Ser Asn His Lys Cys Asn Leu Asp Trp Met
 85 90 95
 Phe Leu Trp Ser Ser Ala Ile Arg Thr Gly Ser Met Phe His Val Gly
 100 105 110
 Val Phe Lys Ala Val Ala Lys Ser Glu Ile Arg Val Ile Pro Ile Phe
 115 120 125
 Gly Trp Gly Cys Lys Leu Asn Gly Phe Ala Tyr Val Arg Arg Arg Trp
 130 135 140
 Ser Ser Asp Ala Ser His Leu Thr Ser Trp Ile Gln Ser Gln Ile Arg
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Asn Ala Asn Trp Thr Leu Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg
 165 170 175
 Tyr Thr Asp Arg Asn Lys Glu Arg Ser Asp Leu Ser Cys Ala Lys Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Pro Met Ala Gly Glu Ile Leu Arg Pro Arg Thr Lys Gly
 195 200 205
 Leu Ala Leu Leu Leu Arg Glu Ser Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Arg
 210 215 220
 Lys Ile Val Asp Met Thr Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Pro
 225 230 235 240
 Leu Lys Gly Ala Ala Leu Gly Thr Arg Cys Phe Gly Gln Leu Ala Lys
 245 250 255
 Gly Gln Leu Pro Val Ala Thr Cys His Val His Phe Asp Val Phe Ser
 260 265 270
 His Lys Asp Val Pro Ala Gly Glu Asp Glu Asp Glu Val Glu Ala Trp
 275 280 285
 Val Trp Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ala Asn Met Leu Glu Ala Cys Ala
 290 295 300
 Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr

ES 2 636 487 T3

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

Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
20 25 30

Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
35 40 45

Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
50 55 60

Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu
65 70 75 80

Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
85 90 95

Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
100 105 110

Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
115 120 125

Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys
130 135 140

Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile

ES 2 636 487 T3

Met Ala Met Ala Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe
1 5 10 15

Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
20 25 30

Leu Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val
35 40 45

Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp

ES 2 636 487 T3

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

ES 2 636 487 T3

Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
 305 310 315 320

Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile
 325 330 335

Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
 340 345 350

Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
 355 360 365

Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
 370 375 380

Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
 385 390

<210> 69
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Braccisa napus

5

<400> 69

Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
 1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Ile Cys Tyr Val Leu
 20 25 30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
 35 40 45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
 50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
 65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
 85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
 115 120 125

10

ES 2 636 487 T3

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
 130 135 140

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

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
 165 170 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
 180 185 190

Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
 195 200 205

Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
 210 215 220

Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
 225 230 235 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
 245 250 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
 260 265 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
 275 280 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
 290 295 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Met
 305 310 315 320

Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala
 325 330 335

Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
 340 345 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
 355 360 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
 370 375 380

ES 2 636 487 T3

Glu Val Glu Lys Gln Lys
385 390

5 <210> 70
<211> 361
<212> PRT
<213> Phytophthora infestans

<400> 70

```

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
1          5          10          15

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

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

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
          50          55          60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
65          70          75          80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
          85          90          95

Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu
          100          105          110

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
          115          120          125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
          130          135          140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly
145          150          155          160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val
          165          170          175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
          180          185          190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
          195          200          205

```

ES 2 636 487 T3

Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
 210 215 220

Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu
 225 230 235 240

His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr
 245 250 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu
 260 265 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu
 275 280 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe
 290 295 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
 305 310 315 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
 325 330 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
 340 345 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
 355 360

<210>71
 <211>418
 5 <212>PRT
 <213>Thalassiosira pseudonana

<400>71

Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser
 1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys
 20 25 30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu
 35 40 45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp
 50 55 60

10

ES 2 636 487 T3

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met
85 90 95

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val
100 105 110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr
115 120 125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp
130 135 140

Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp
145 150 155 160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr
165 170 175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His
180 185 190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu
195 200 205

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg
210 215 220

Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile
225 230 235 240

Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val
245 250 255

Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys
260 265 270

Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr
275 280 285

Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met
290 295 300

Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp
305 310 315 320

ES 2 636 487 T3

Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser
 325 330 335

Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His
 340 345 350

Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu
 355 360 365

Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys
 370 375 380

His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val
 385 390 395 400

Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys
 405 410 415

Arg Glu

- <210> 72
- <211> 363
- 5 <212> PRT
- <213> Pythium irregulare
- <400> 72

Met Ala Ser Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ala Ala Pro Tyr Glu Phe Pro
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Ile Lys Arg Ala Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala
 20 25 30

Ser Val Pro Leu Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala
 35 40 45

Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Ser Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Leu Val
 50 55 60

Gln Ala Asn Ala Leu Leu Asp Ala Thr Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Ile Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys
 85 90 95

Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly
 100 105 110

10

ES 2 636 487 T3

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

355

360

REIVINDICACIONES

1. Lípido vegetal extraído, que comprende ácidos grasos en una forma esterificada, comprendiendo los ácidos grasos ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos $\omega 6$ que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos $\omega 3$ que comprenden ácido α -linoleico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es del 7 % al 20 % y en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %.
2. El lípido de la reivindicación 1 que tiene una o más o todas las siguientes características:
- i. el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 15 %,
 - ii. el nivel de ácido oleico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 3 % y el 30 %,
 - iii. el nivel de ácido linoleico (LA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 35 %,
 - iv. el nivel de ácido α -linolénico (ALA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 7 % y el 40 %,
 - v. el nivel de ácido γ -linolénico (GLA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %
 - vi. el nivel de ácido estearidónico (SDA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %,
 - vii. el nivel de ácido eicosatetraenoico (ETA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %,
 - viii. el nivel de ácido eicosatrienoico (ETRA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %,
 - ix. el nivel de ácido eicosapentaenoico (EPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %,
 - x. el nivel de ácido docosapentaenoico (DPA) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 4 %,
 - xi. el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 11 % y el 20 %,
 - xii. el nivel de ácidos grasos saturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 25 %,
 - xiii. el nivel de ácidos grasos monoinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 4 % y el 35 %,
 - xiv. el nivel de ácidos grasos poliinsaturados totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 20 % y el 75 %,
 - xv. el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 20 %,
 - xvi. el nivel de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 10 %,
 - xvii. el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 40 % y el 60 %,
 - xviii. el nivel de ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 9 % y el 33 %,
 - xix. la relación de los ácidos grasos $\omega 6$ totales:ácidos grasos $\omega 3$ totales en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0,
 - xx. la relación de ácidos grasos $\omega 6$ nuevos:ácidos grasos $\omega 3$ nuevos en el contenido de ácidos grasos del lípido extraído es de entre 1,0 y 3,0,
 - xxi. la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficiencia de la conversión del ácido oleico en DHA de al menos el 10 %,
 - xxii. la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficiencia de la conversión del LA en DHA de al menos el 15 %,
 - xxiii. la composición de ácidos grasos del lípido se basa en una eficiencia de la conversión del ALA en DHA de al menos el 17 %,
 - xxiv. el ácido graso total en el lípido extraído tiene menos del 1 % de C20:1,
 - xxv. el contenido de triacilglicerol (TAG) del lípido es de al menos el 70 %,
 - xxvi. el lípido comprende diacilglicerol (DAG),
 - xxvii. el lípido comprende menos del 10 %, de ácidos grasos libres (no esterificados) y/o fosfolípido, o menos del 0,5 % de ácidos grasos libres (no esterificados) y/o fosfolípido,
 - xxviii. al menos el 70 % del DHA esterificado en forma de TAG está en las posiciones sn-1 o sn-3 del TAG,
 - xxix. el lípido comprende tri-DHA TAG (TAG 66:18).
3. El lípido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 que comprende adicionalmente uno o más esteroides, y/o que está en forma de un aceite, y que comprende menos de 10 mg de esteroides/g de aceite, menos de 7 mg de esteroides/g de aceite, entre 1,5 mg y 10 mg de esteroides/g de aceite o entre 1,5 mg y 7 mg de esteroides/g de aceite.

4. El lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el lípido es aceite de *Brassica sp.* o aceite de *Camelina sativa*.

5. Un proceso para producir un lípido vegetal extraído, que comprende las etapas de

- i) obtención de una parte de una planta que comprende lípido, comprendiendo el lípido ácidos grasos en una forma esterificada, comprendiendo los ácidos grasos ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω_6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ -linolénico (GLA), ácidos grasos ω_3 que comprenden ácido α -linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) y opcionalmente uno o más de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble en la parte de la planta es del 7 % al 20 %, y en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble es de entre el 2 % y el 16 %, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraíble es inferior al 1 %, y
- ii) extracción de lípido de la parte de la planta,

en donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es del 7 % al 20 %, y en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2 % y el 16 %, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1 %,

6. El proceso de la reivindicación 5, en el que el lípido extraído tiene una o más de las características definidas en las reivindicaciones 2 a 4.

7. El proceso de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en el que la parte de la planta comprende polinucleótidos exógenos que codifican una $\Delta 12$ -desaturasa, una ω_3 -desaturasa o una $\Delta 15$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa, y en donde cada polinucleótido está enlazado operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en una célula de la parte de la planta.

8. El proceso de la reivindicación 7, en el que la parte de la planta tiene una o más o todas las siguientes características

- i) la $\Delta 12$ -desaturasa convierte el ácido oleico en ácido linoleico en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 60 %,
- ii) la ω_3 -desaturasa convierte los ácidos grasos ω_6 en ácidos grasos ω_3 en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 65 %,
- iii) la $\Delta 6$ -desaturasa convierte ALA en SDA en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 30 %,
- iv) la $\Delta 6$ -desaturasa convierte el ácido linoleico en γ -linolénico en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 5 %,
- v) la $\Delta 6$ -elongasa convierte SDA en ETA en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 60 %,
- vi) la $\Delta 5$ -desaturasa convierte ETA en EPA en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 60 %,
- vii) la $\Delta 5$ -elongasa convierte EPA en DPA en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 80 %,
- viii) la $\Delta 4$ -desaturasa convierte DPA en DHA en una o más células de la planta con una eficiencia de al menos el 80 %,
- ix) la eficiencia de la conversión del ácido oleico en DHA en una o más células de la parte de la planta es de al menos el 10 %,
- x) la eficiencia de la conversión de LA en DHA en una o más células de la parte de la planta es de al menos el 15 %,
- xi) la eficiencia de la conversión de ALA en DHA en una o más células de la parte de la planta es de al menos el 17 %,
- xii) una o más células de la parte de la planta comprenden al menos el 15 % más de ácidos grasos ω_3 que las células correspondientes que carecen de los polinucleótidos exógenos,
- xiii) la $\Delta 6$ -desaturasa desatura preferentemente el ácido α -linolénico (ALA) con respecto al ácido linoleico (LA),
- xiv) la $\Delta 6$ -elongasa también tiene actividad $\Delta 9$ -elongasa,
- xv) la $\Delta 12$ -desaturasa también tiene actividad $\Delta 15$ -desaturasa
- xvi) la $\Delta 6$ -desaturasa también tiene actividad $\Delta 8$ -desaturasa,
- xvii) la ω_3 -desaturasa también tiene actividad $\Delta 15$ -desaturasa sobre LA,
- xviii) la ω_3 -desaturasa desatura LA y/o GLA,
- xix) la ω_3 -desaturasa desatura preferentemente GLA con respecto a LA,
- xx) el nivel de DHA en la parte de la planta se basa en una eficiencia de la conversión del ácido oleico en DHA en la parte de la planta de al menos el 10 %,

- xxi) el nivel de DHA en la parte de la planta se basa en una eficiencia de la conversión de LA en DHA en la parte de la planta de al menos el 15 %,
- xxii) el nivel de DHA en la parte de la planta se basa en una eficiencia de la conversión de ALA en DHA en la parte de la planta de al menos el 17 %,
- 5 xxiii) una o más o todas las desaturasas tienen una mayor actividad sobre un sustrato de acil-CoA que sobre un sustrato de acil-PC correspondiente,
- xxiv) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene una mayor actividad $\Delta 6$ -desaturasa sobre ALA que sobre LA como sustrato de ácido graso,
- 10 xxv) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene una mayor actividad $\Delta 6$ -desaturasa sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,
- xxvi) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene una actividad $\Delta 6$ -desaturasa al menos 2 veces mayor sobre ALA como sustrato en comparación con LA,
- xxvii) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene mayor actividad sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,
- 15 xxviii) la $\Delta 6$ -desaturasa tiene una actividad $\Delta 6$ -desaturasa al menos 5 veces mayor sobre ALA-CoA como sustrato de ácido graso que sobre ALA unido a la posición *sn*-2 de PC como sustrato de ácido graso,
- xxix) la desaturasa es una desaturasa de extremo frontal,
- xxx) la $\Delta 6$ -desaturasa no tiene ninguna actividad $\Delta 5$ -desaturasa detectable sobre ETA.
- 20 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que se aplican una o más de las siguientes características;
- i) los polinucleótidos exógenos están enlazados covalentemente en una molécula de ADN, preferentemente una molécula de ADN-T, integrada en el genoma de las células de la parte de la planta y, preferentemente, en donde
- 25 el número de dichas moléculas de ADN integradas en el genoma de las células de la parte de la planta no es más de uno, dos o tres, o es dos o tres,
- ii) el contenido de aceite total de la parte de la planta que comprende los polinucleótidos exógenos es de al menos el 40 % del contenido total de aceite de una parte de planta correspondiente que carece de los polinucleótidos exógenos,
- 30 iii) el lípido está en forma de un aceite, preferentemente un aceite de semilla de una semilla oleaginosa, y en donde al menos el 90 % en peso del lípido es triacilgliceroles,
- iv) el proceso comprende adicionalmente tratar el lípido para aumentar el nivel de DHA como porcentaje del contenido total de ácidos grasos, preferentemente el tratamiento es la transesterificación.
- 35 10. Una célula hospedadora que comprende polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;
- i) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\omega 3$ -desaturasa o una $\Delta 15$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- 40 ii) una $\omega 3$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- iii) una $\Delta 15$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- 45 iv) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 6$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- v) una $\omega 3$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- 50 vi) una $\Delta 15$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- vii) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa, o
- viii) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\omega 3$ -desaturasa o una $\Delta 15$ -desaturasa, una $\Delta 8$ -desaturasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 4$ -desaturasa, una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 5$ -elongasa,
- 55 en donde cada polinucleótido está enlazado operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en la célula, y en donde la célula comprende el lípido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 60 11. Una planta transgénica que comprende una célula de la reivindicación 10.
12. Una planta de semillas oleaginosas que comprende
- a) lípido en su semilla, comprendiendo el lípido ácidos grasos en una forma esterificada, y
- 65 b) polinucleótidos exógenos que codifican uno de los siguientes conjuntos de enzimas;
- i) una $\Delta 12$ -desaturasa, una $\omega 3$ -desaturasa fúngica y/o una $\Delta 15$ -desaturasa fúngica, una $\Delta 6$ -desaturasa, una

Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 6-elongasa y una Δ 5-elongasa, o
 ii) una Δ 12 –desaturasa, una ω 3-desaturasa fúngica y/o una Δ 15-desaturasa fúngica, una Δ 8-desaturasa, una
 Δ 5-desaturasa, una Δ 4-desaturasa, una Δ 9-elongasa y una Δ 5-elongasa,

- 5 en donde cada polinucleótido está enlazado operativamente a una o más promotores específicos de semillas que son capaces de dirigir la expresión de dichos polinucleótidos en el desarrollo de la semilla de la planta, en donde los ácidos grasos comprenden ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω 6 que comprenden ácido linoleico (LA) y ácido γ -linolénico (GLA), ácidos grasos ω 3 que comprenden ácido α -linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPA)
- 10 y/o ácido eicosatetraenoico (ETA), y en donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido es del 7 % al 20 %, y en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido es de entre el 2 % y el 16 %, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0) en el contenido total de ácidos grasos del lípido es inferior al 1 %.
- 15 13. La planta de la reivindicación 12, en la que se aplican una o más de las siguientes características;
- i) la planta es una canola, *Glycine max*, *Camelina sativa* o planta de *Arabidopsis thaliana*,
 ii) una o más de las desaturasas son capaces de utilizar un sustrato de acil-CoA,
 20 iii) la semilla madura, recolectada de la planta tiene un contenido de DHA de al menos 28 mg por gramo de semilla.
14. Una parte de la planta que tiene una o más de las siguientes características
- i) comprende un lípido como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
 25 ii) procede de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o
 iii) puede utilizarse en un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
15. La parte de la planta de la reivindicación 14 que es una semilla.
- 30 16. Un método de producción de semillas, comprendiendo el método,
- a) hacer crecer una planta que produce una parte como se define en la reivindicación 14 o en la reivindicación 15, o una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13,
 b) recoger semillas de la planta o plantas, y
 35 c) opcionalmente, extraer lípidos de la semilla, preferentemente para producir aceite con un rendimiento de DHA total de al menos 60 kg de DHA/hectárea.
17. Polvo de semillas obtenido a partir de la semilla de la reivindicación 15.
- 40 18. Un método de producción de un producto alimenticio para consumo humano o animal, comprendiendo el método mezclar uno o más del lípido o del aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la célula de la reivindicación 10, la planta transgénica de la reivindicación 11, la planta de semillas oleaginosas de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, la parte de la planta de la reivindicación 14 o de la reivindicación 15, o el polvo de semillas de la reivindicación 17, con al menos otro ingrediente alimenticio.
- 45 19. Uno o más del lípido o del aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la célula de la reivindicación 10, la planta transgénica de la reivindicación 11, la planta de semillas oleaginosas de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, la parte de la planta de la reivindicación 14 o de la reivindicación 15, o el polvo de semillas de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección médica que se beneficiaría de un PUFA, en donde la afección es arritmia cardíaca, angioplastia, inflamación, asma, psoriasis, osteoporosis, piedras en el riñón, SIDA, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esquizofrenia, cáncer, síndrome alcohólico fetal, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, fibrosis quística, fenilcetonuria, depresión unipolar, hostilidad agresiva, adrenoleucodistrofia, cardiopatía coronaria, hipertensión, diabetes, obesidad, enfermedad de Alzheimer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colitis ulcerosa, reestenosis después de angioplastia, eccema, presión sanguínea alta, agregación plaquetaria, sangrado gastrointestinal, endometriosis, síndrome premenstrual, encefalomielititis miálgica, fatiga crónica después de infecciones virales o una enfermedad ocular.
- 50 20. Un proceso para producir ésteres de etilo de ácidos grasos poliinsaturados, comprendiendo el proceso la transesterificación de triacilgliceroles en lípidos vegetales extraídos, en donde el lípido vegetal extraído comprende ácidos grasos esterificados en la forma, comprendiendo los ácidos grasos ácido oleico, ácido palmítico, ácidos grasos ω 6 que comprenden ácido linoleico (LA), ácidos grasos ω 3 que comprenden ácido α -linolénico (ALA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y opcionalmente uno o más de ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosatetraenoico (ETA), en donde el nivel de DHA en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es del 7% al 20%, y en donde el nivel de ácido palmítico en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es de entre el 2% y el 16%, y en donde el nivel de ácido mirístico (C14:0)
- 60 65

en el contenido total de ácidos grasos del lípido extraído es inferior al 1%, produciendo de este modo los ésteres de etilo.

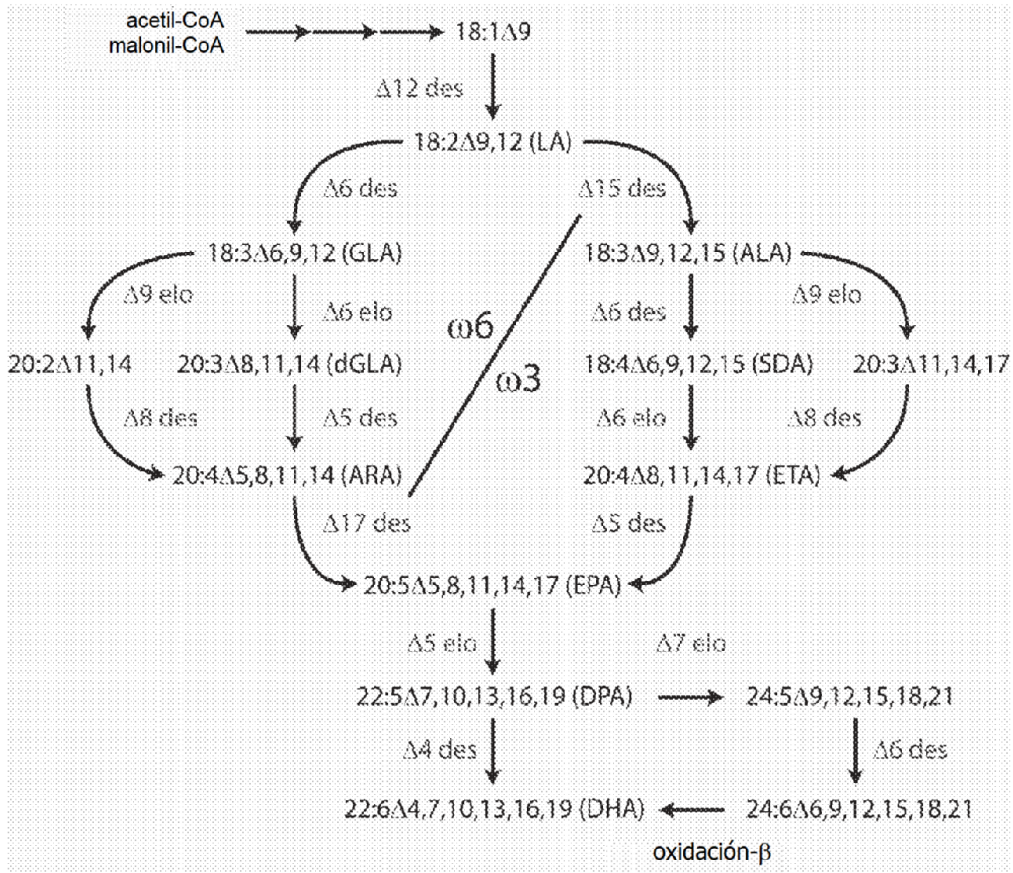


Figura 1

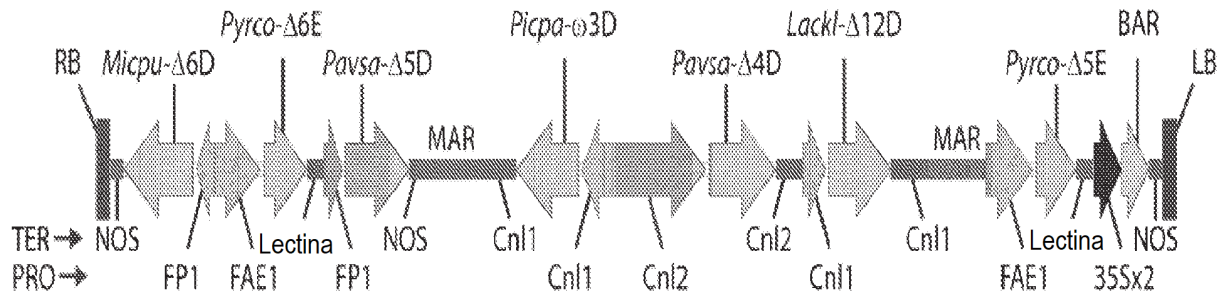


Figura 2

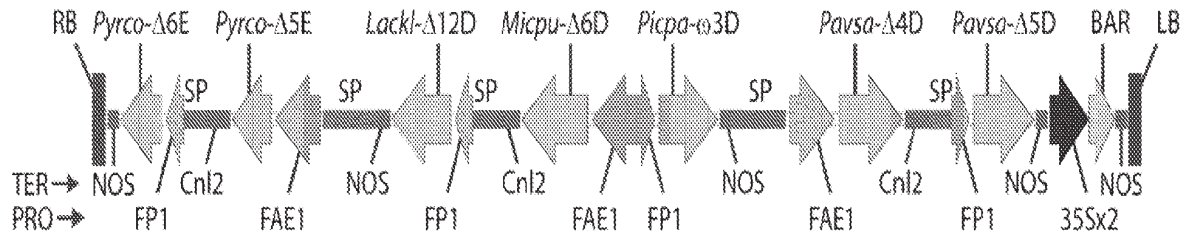


Figura 3

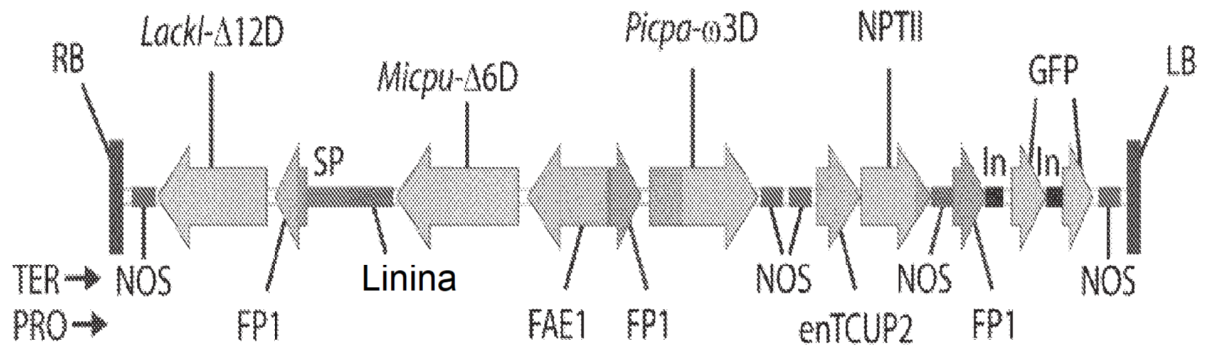


Figura 4

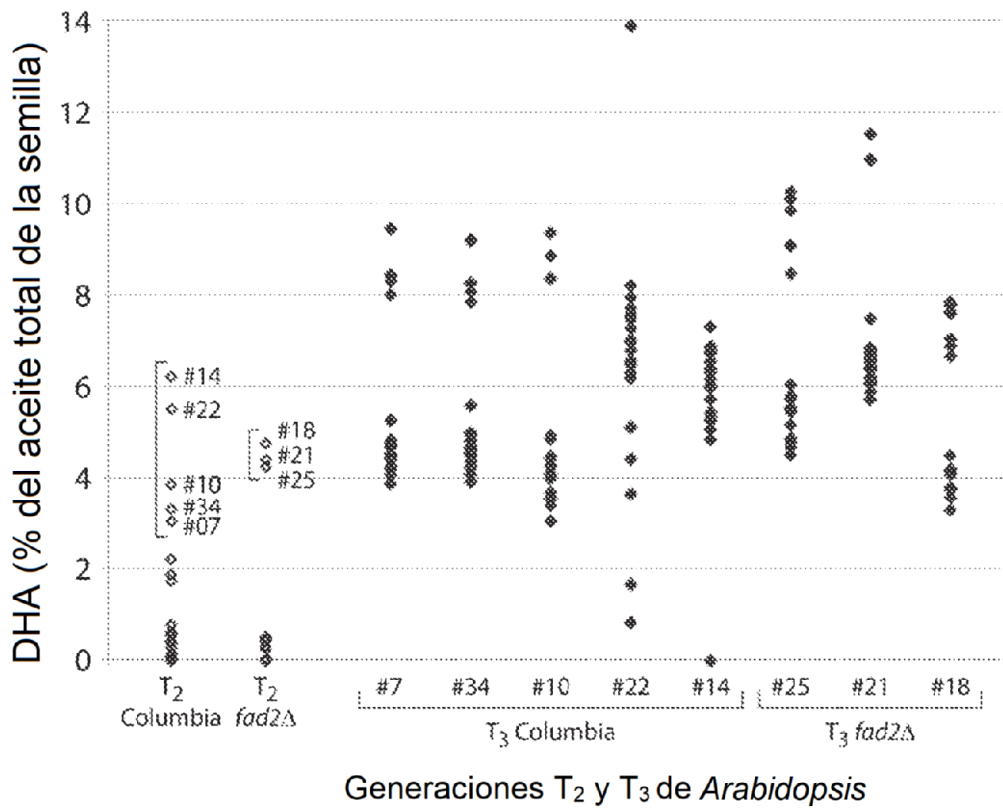


Figura 5

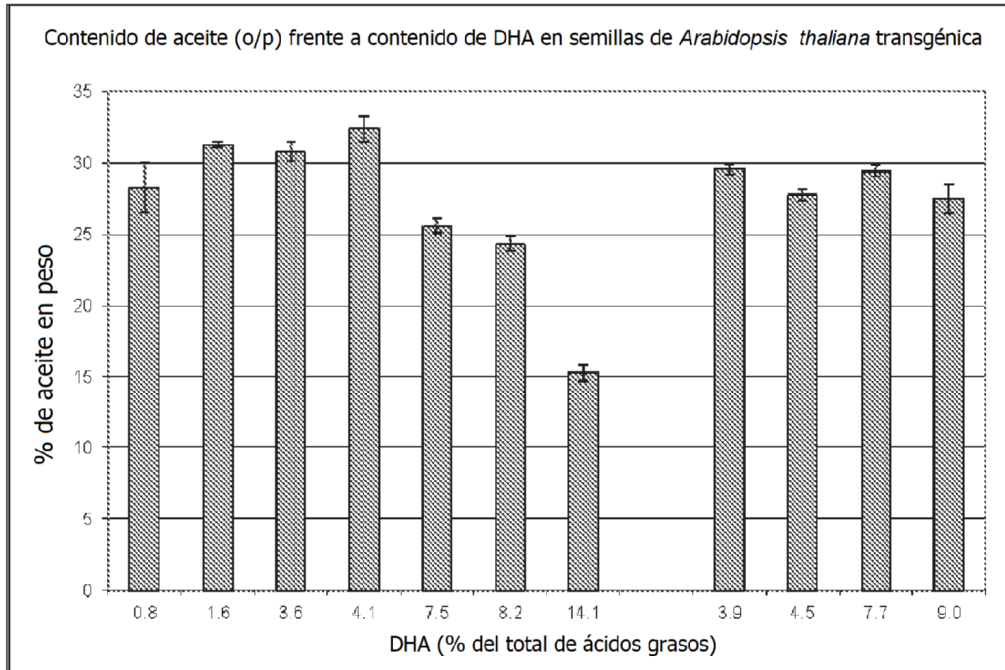


Figura 6

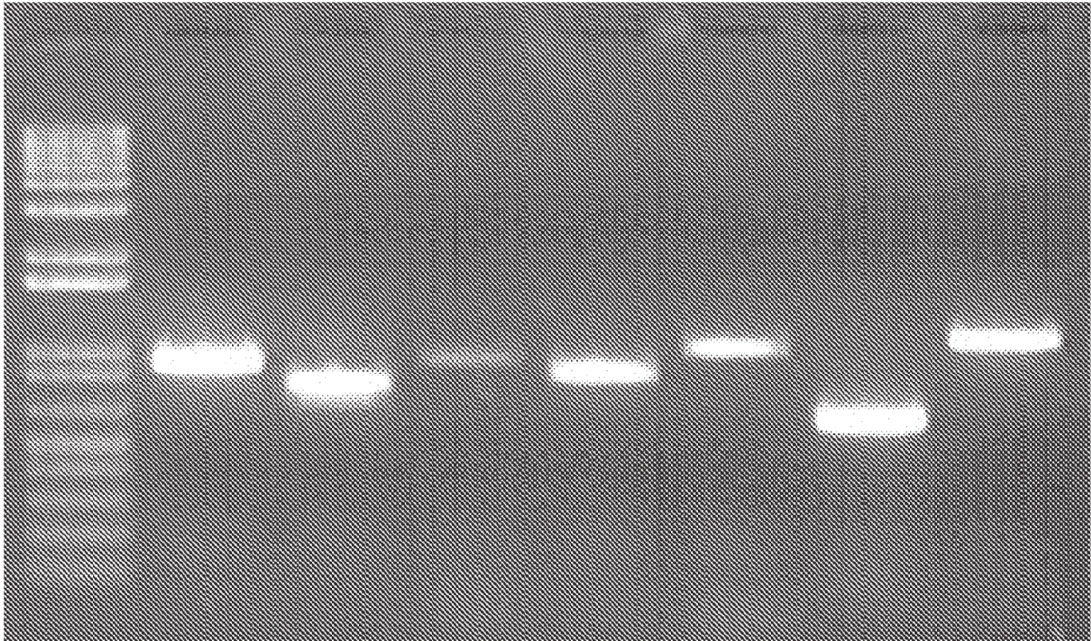


Figura 7

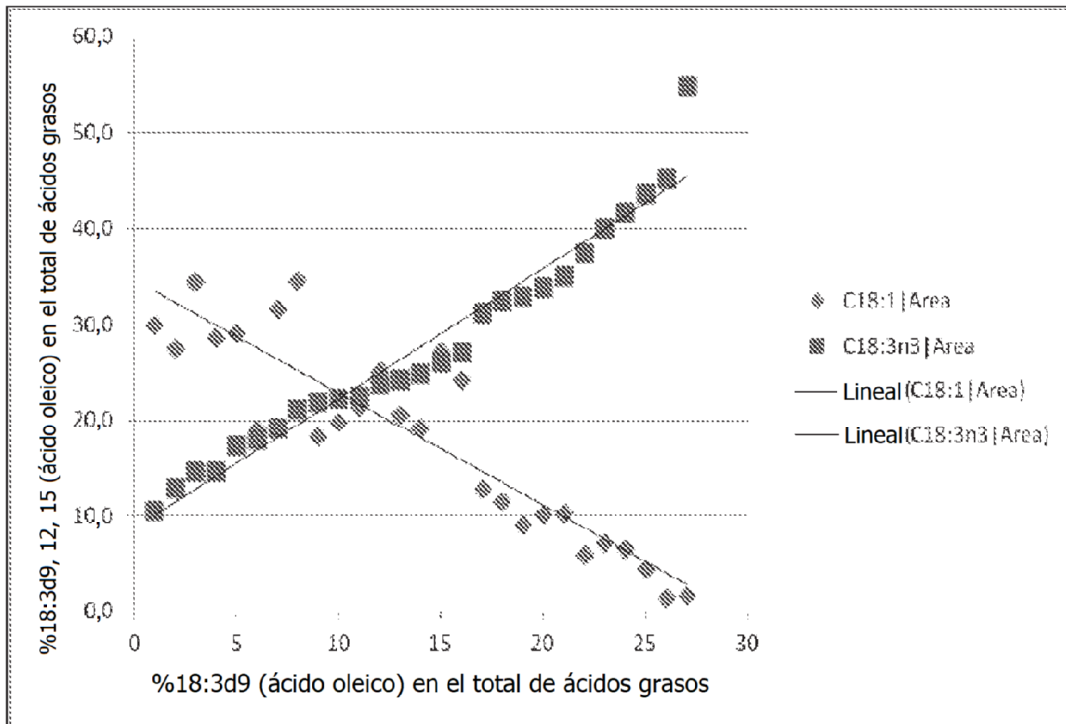


Figura 8

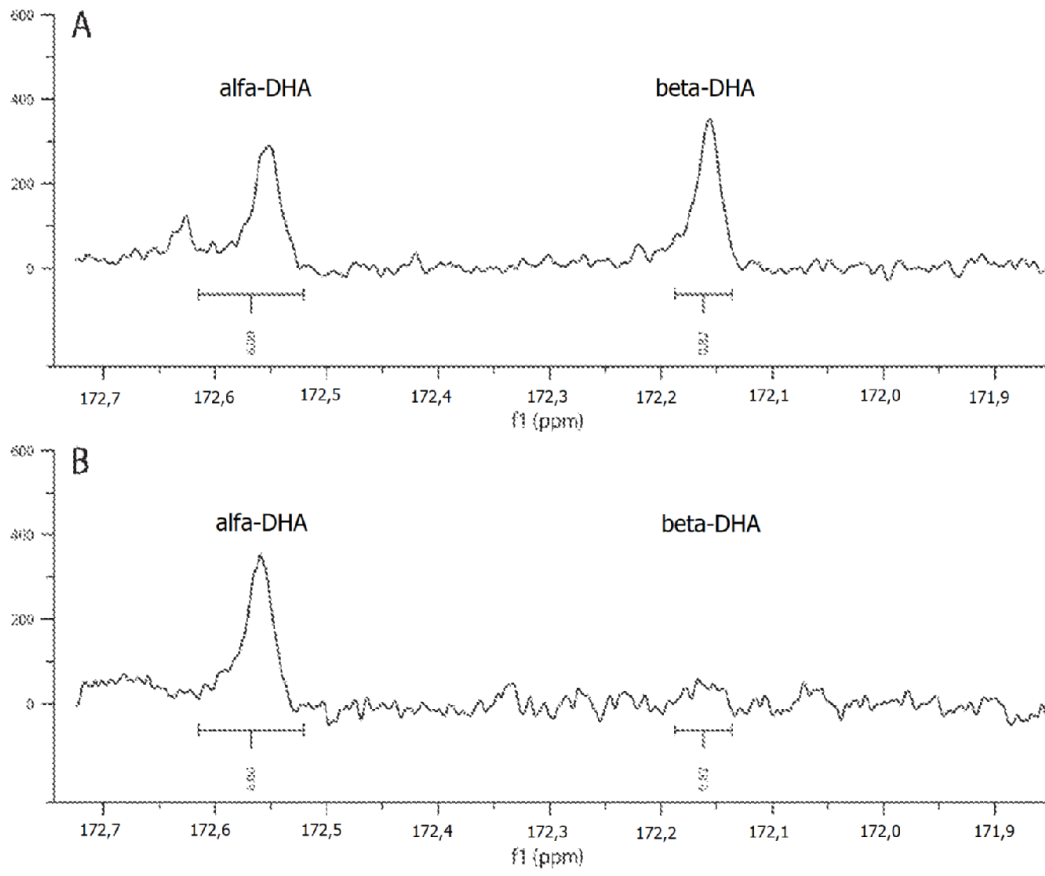


Figura 9

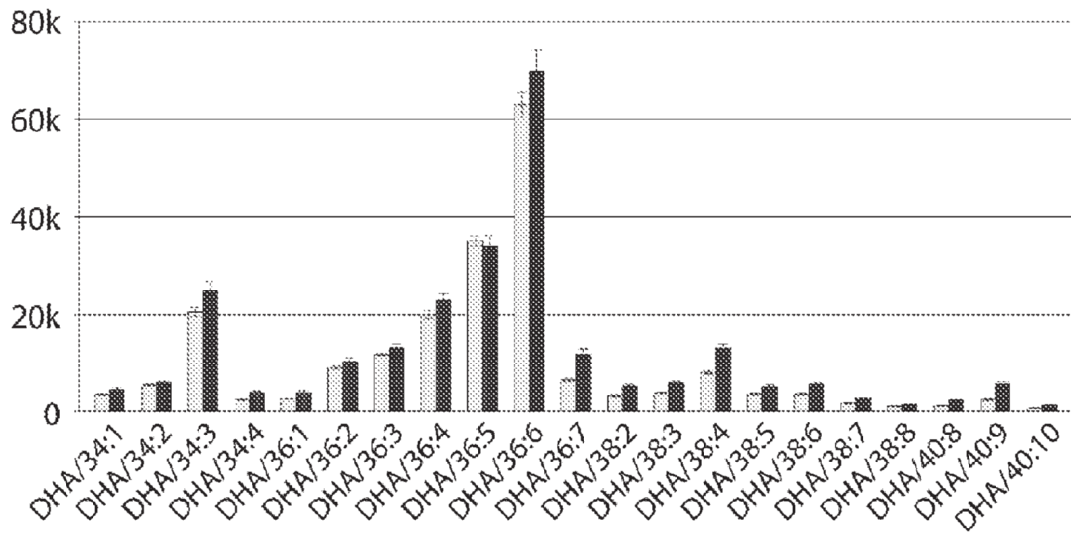


Figura 10

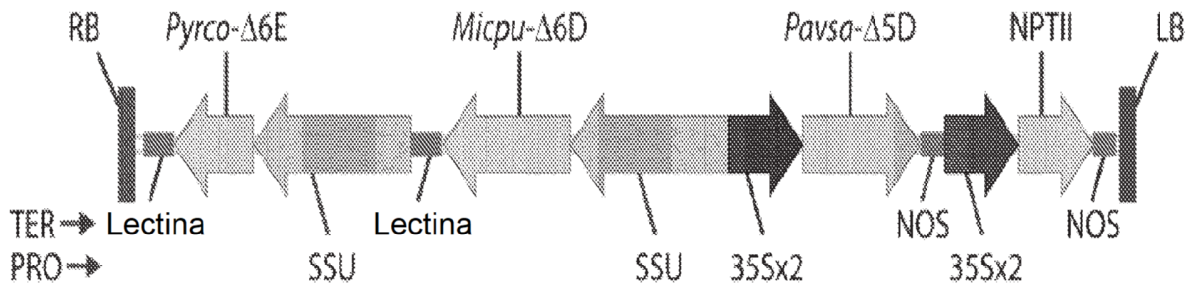


Figura 11

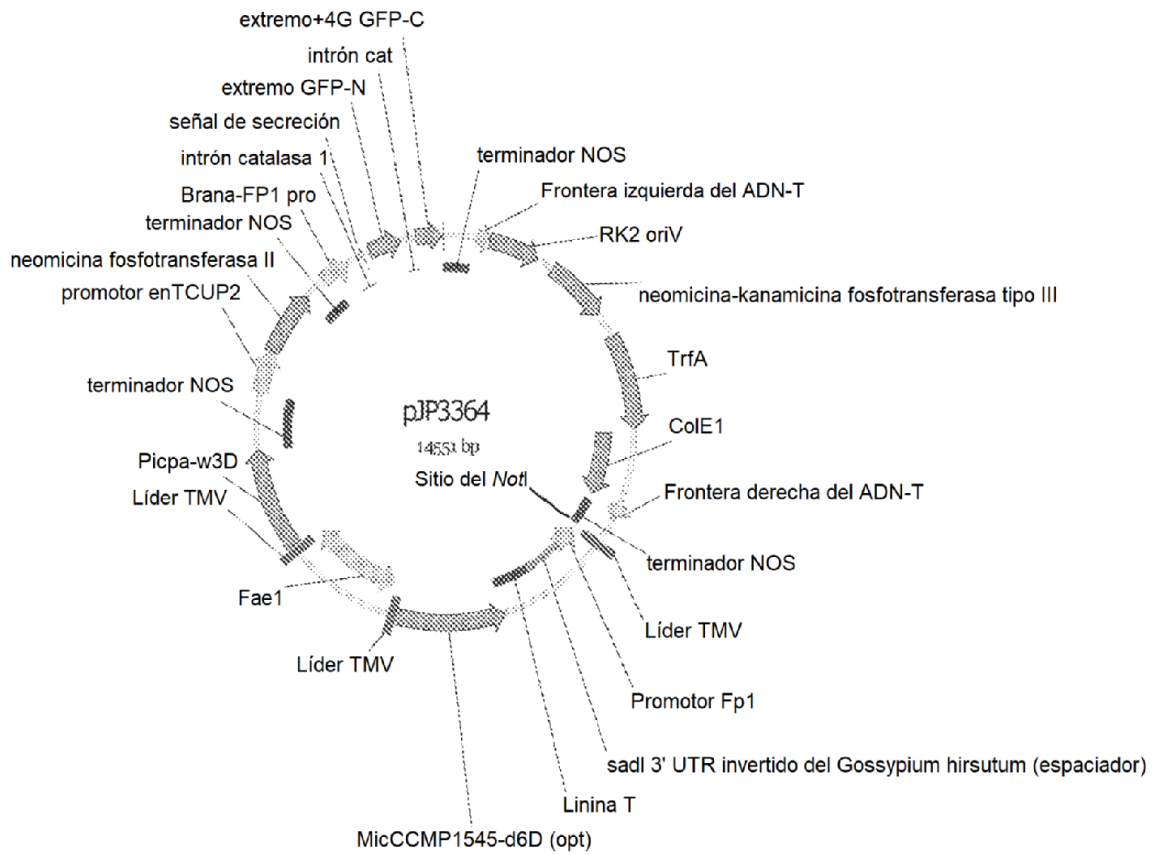


Figura 12

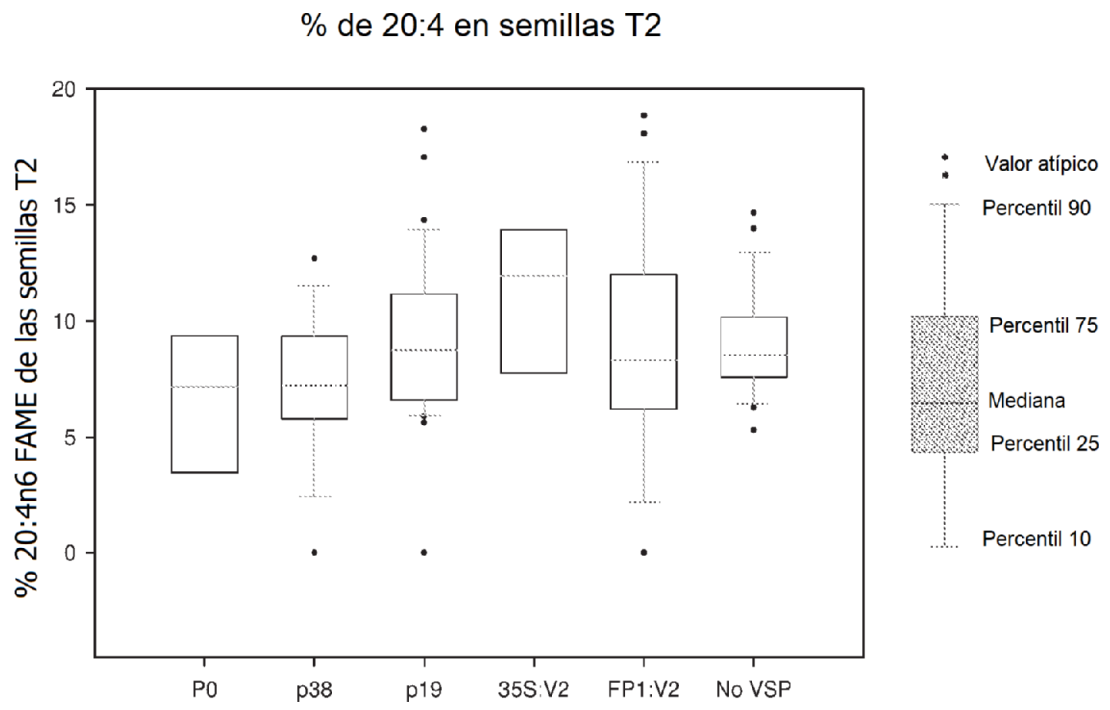


Figura 13

Promedio de 20:4 en semillas T2

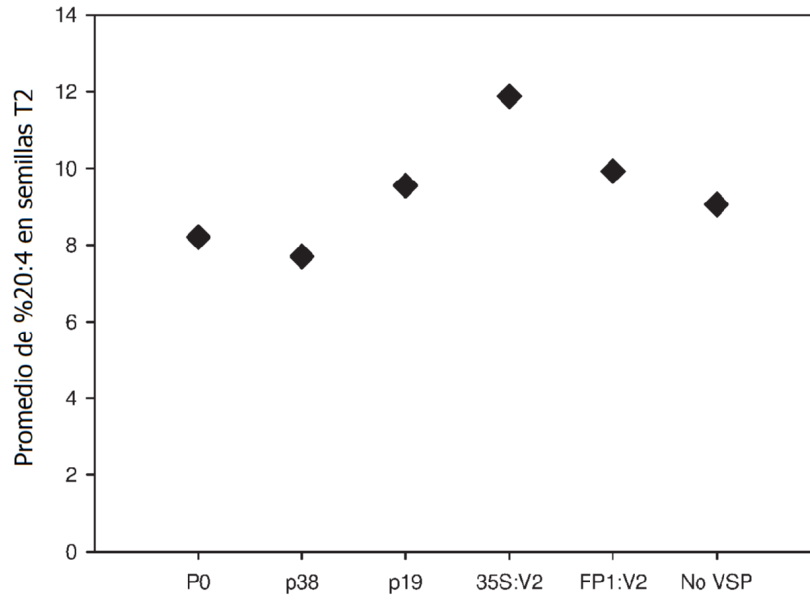


Figura 14

% de 20:2 en semillas T2

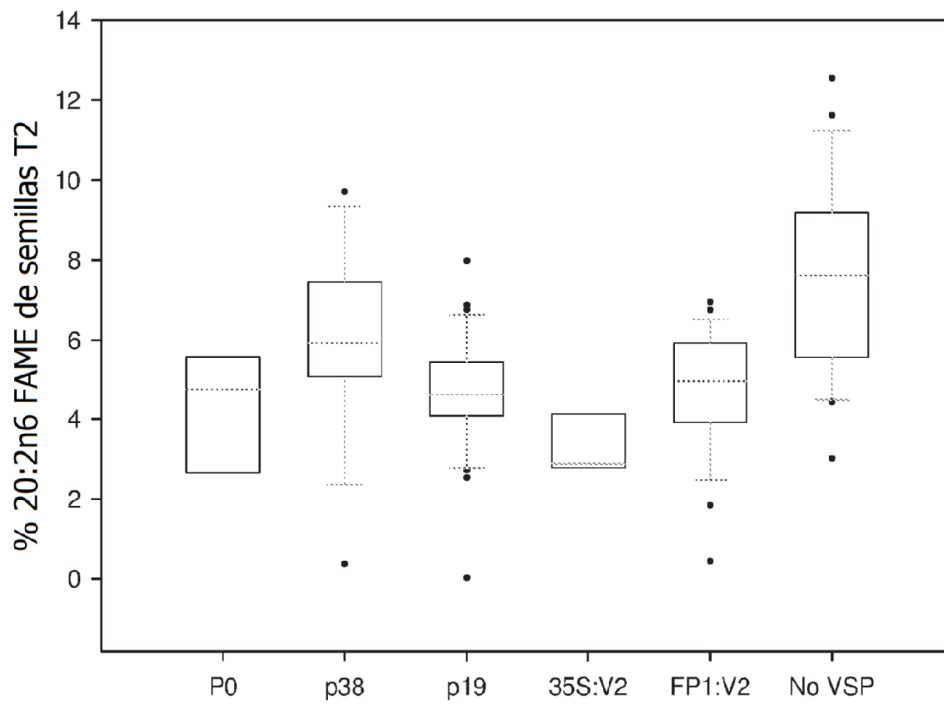


Figura 15

% de 20:2 en semillas T4

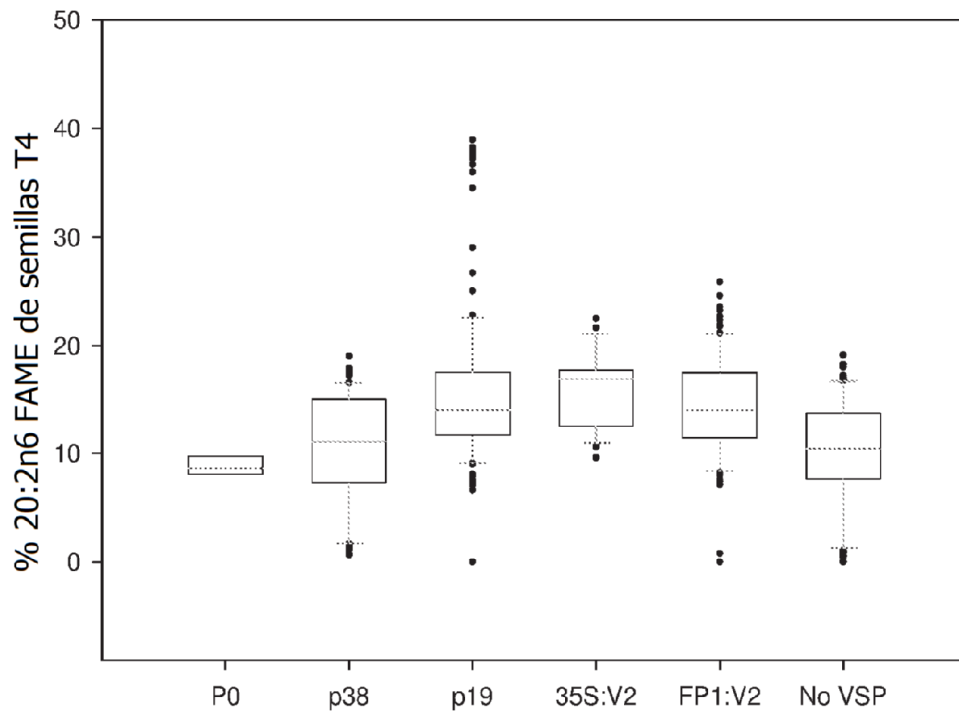


Figura 16

Promedio de 20:4 en semillas T4

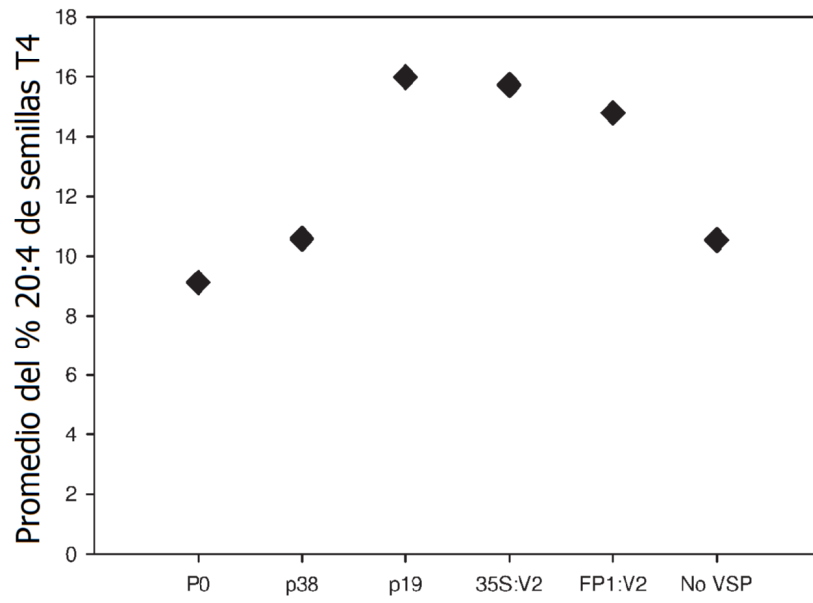


Figura 17

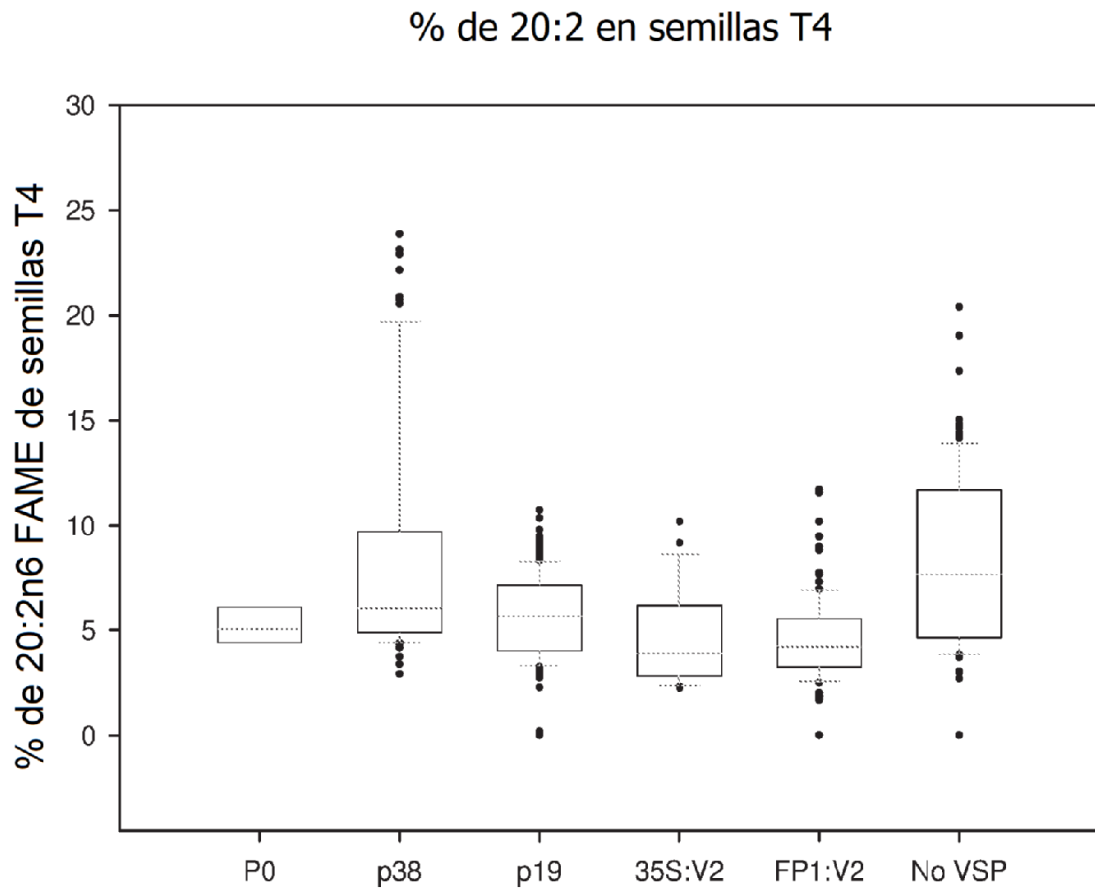
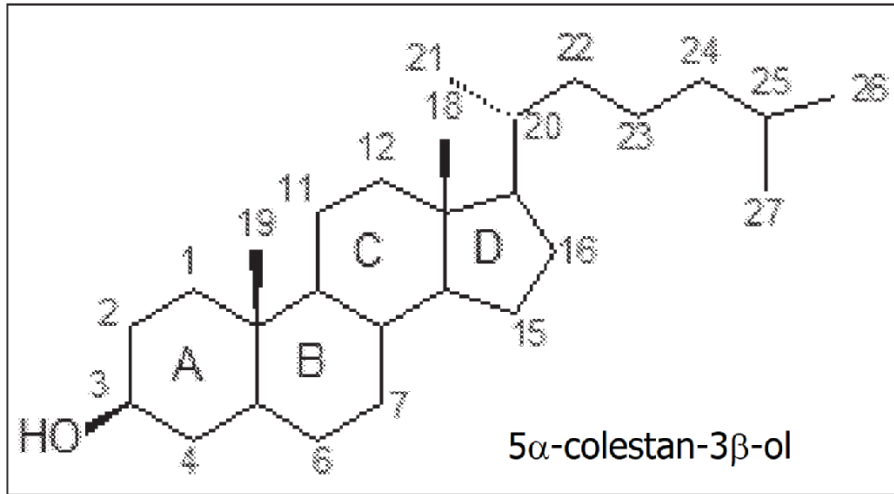


Figura 18

A)



B)

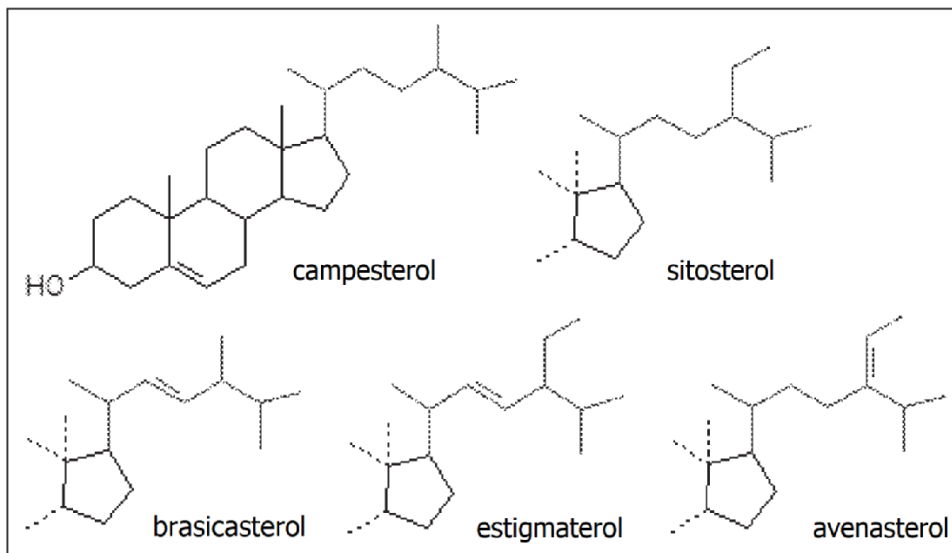


Figura 19

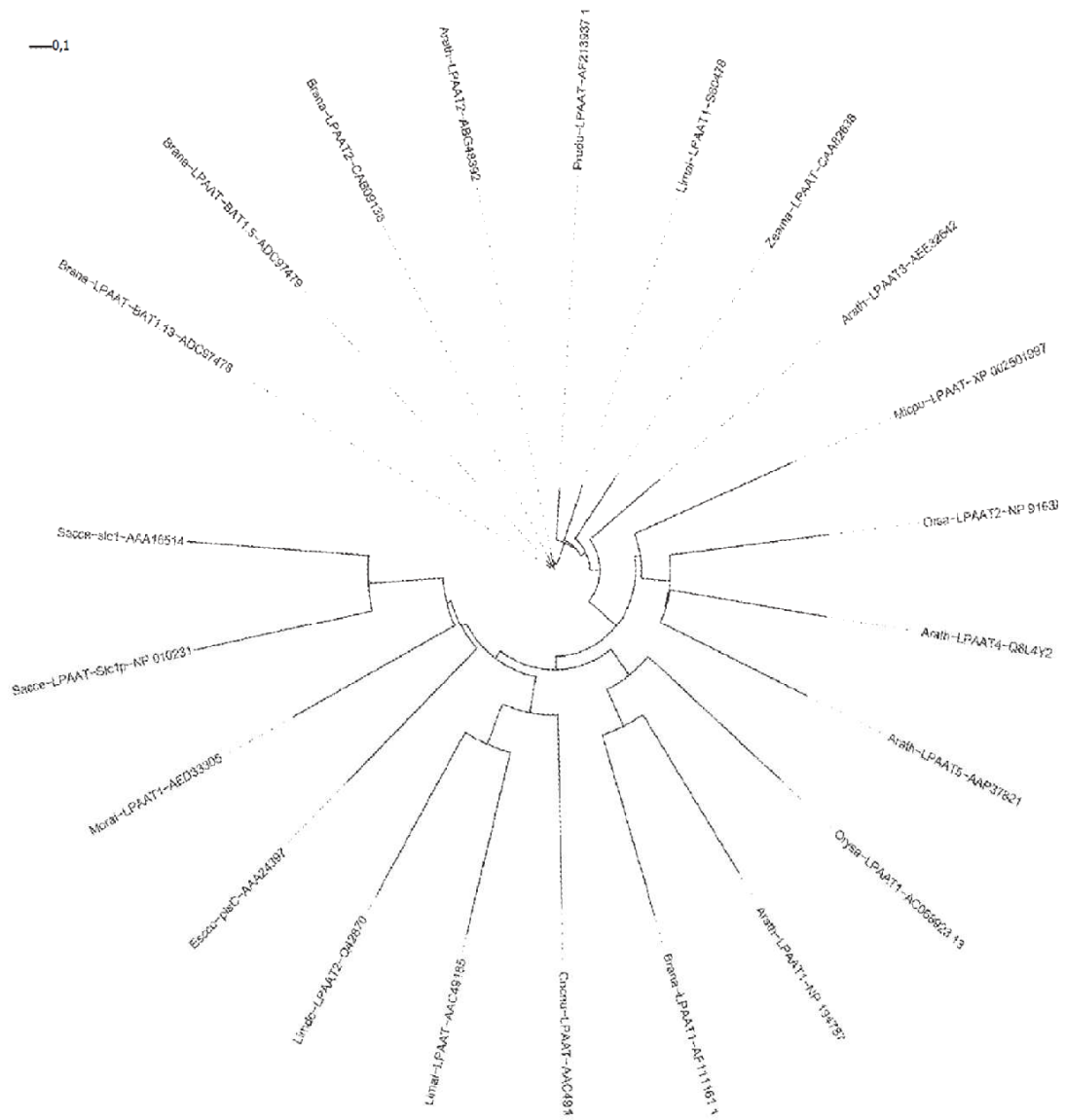


Figura 20

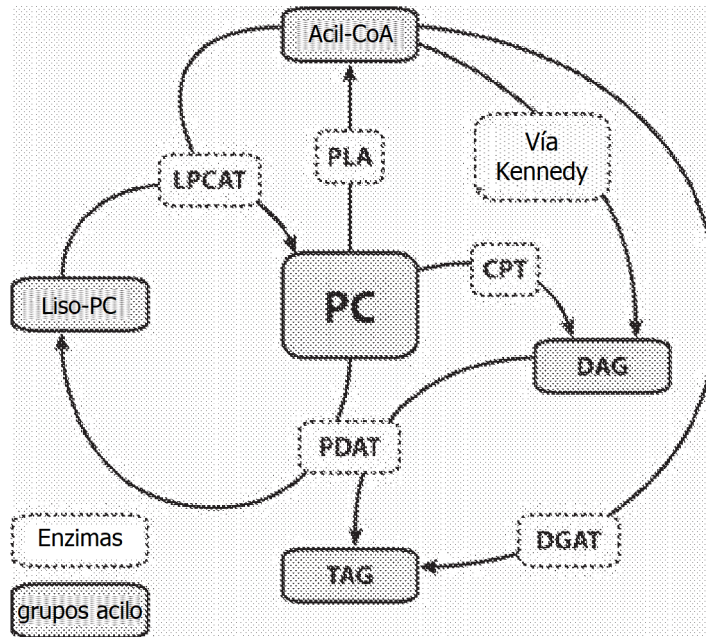


Figura 21