

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 106**

51 Int. Cl.:

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014** **PCT/SG2014/000114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14142747**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014** **E 14765272 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 2970993**

54 Título: **Secuencias de polinucleótidos de Rhodosporidium y Rhodotorula y sus usos**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782832 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2019

73 Titular/es:

**TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY
LIMITED (100.0%)
National University of Singapore, 1 Research Link
Singapore 117604, SG**

72 Inventor/es:

**CHENG, HSIN I.;
PENG, NI y
JI, LIANGHUI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 719 106 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuencias de polinucleótidos de *Rhodospiridium* y *Rhodotorula* y sus usos

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología fúngica, más particularmente a sistemas fuertes de expresión de genes en especies de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*.

10 Las publicaciones y otros materiales usados en la presente descripción para mostrar los antecedentes de la invención, y en particular, los casos para proporcionar detalles adicionales con respecto a la práctica, por conveniencia se referencian en el texto siguiente por el autor y la fecha y se enumeran alfabéticamente por el autor en la bibliografía anexa.

15 *Pucciniomycotina* es un subfilo de hongos en el filo de Basidiomycota (Kirk y otros, 2008). Posee muchas especies que tienen importantes aplicaciones industriales. Por ejemplo, un número de especies en los géneros *Rhodospiridium* y *Sporidiobolus*, tal como *Rhodospiridium toruloides* (también conocido como *Rhodotorula gracilis*, *Rhodospiridium glutinis*, *Rhodotorula glutinis*, *Torula koishikawensis* y *Torula rubescens*) y *Sporobolomyces salmonicolor*, son levaduras unicelulares ricas en aceite capaces de fermentación de alta densidad (Hu y otros, 2009; Meng y otros, 2009). Estas especies poseen gran potencial como un huésped para la producción de hidrocarburos de cadena larga, tal como triacilglicerol (TAG, o grasa), ésteres de ácidos grasos (biodiesel), alcoholes grasos, alcoholes, lactonas, terpenoides y vitaminas (Wu y otros, 2010a; Wu y otros, 2010b; Zhao y otros, 2010a; Zhao y otros, 2010b). En otro ejemplo, las especies en el subfilo *Ustilaginomycotina*, en particular, los géneros *Ustilago* y *Pseudozyma*, se conocen por producir glucolípidos, que pueden funcionar como tensioactivos o fungicidas (Hewald y otros, 2005; Teichmann y otros, 2010).

25 Los promotores que son capaces de dirigir la expresión fuerte de genes, tanto de manera constitutiva o inducible, son críticos para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas de un microorganismo. El documento núm. WO 2012/169969, describe varias secuencias de polinucleótidos derivadas de la región aguas arriba del gen de la *gliceroldehído fosfato deshidrogenasa* (*GPD1*), el gen del *factor de iniciación de la traducción* (*TEF1*), y el gen putativo de la *estearoil-CoA-delta 9-desaturasa* (*FAD1*) de especies fúngicas seleccionadas que son capaces de funcionar como un promotor fuerte de la expresión de genes en los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*. Como el uso repetido del promotor idéntico o altamente homólogo corre el riesgo de inestabilidad del genoma, la modificación epigenética y genética de la cromatina resulta de la mutación puntual inducida por repetición (RIP) o al silenciamiento del ARN (Horns y otros, 2012), un grupo de promotores agrandados es altamente deseable para los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*, en donde los promotores funcionalmente verificados son escasos.

35 Los promotores son secuencias de ADN ubicadas en la región 5' adyacente al sitio de inicio de la transcripción. Aloja una combinación de elementos de ADN que actúan en cis para interactuar con los factores de transcripción al activar o reprimir la transcripción de la polimerasa de ARN. Hasta la fecha, han sido publicadas el secuencias aleatorias del genoma para *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091 (Acceso al GenBank: GL989638.1), *Rhodospiridium toruloides* MTCC 457 (Acceso al GenBank: PRJNA112573), *Rhodospiridium toruloides* NP11 (GenBank: ALAU00000000.1) y han sido publicadas secuencias del genoma incompletas para *Rhodotorula graminis* WP1 (http://genome.jgi-psf.org/Rhoba1_1/Rhoba1_1.home.html) y *Sporobolomyces roseus* (<http://genome.jgi-psf.org/Sporo1/Sporo1.home.html>). Las secuencias de ARN, los datos aleatorios proteómicos y del genoma publicados para *Rhodospiridium toruloides* NP11 (Zhu, Z., y otros, 2012) no son capaces de definir la secuencia de promotores funcionales debido a que la actividad de un promotor está influenciada por varios factores, tales como la ubicación de los extremos 5' y 3', el silenciamiento postranscripcional, la influencia de intrón, etc. La actividad de un promotor en una especie heteróloga huésped es incluso más impredecible. Se conocen promotores de organismos diferentes que permiten la expresión de polipéptidos de interés en una especie fúngica, por ejemplo, descritos en los documentos núms. WO 2005/049805 A2; WO 2005/003310 A2; CN 102 268 432 B; Avis T.J. y otros, 2008; Nevau B. y otros, 2007; US 2006/057690 A1, Liu Y. y otros, 2013 y Abbott E.P. y otros, 2013.

Resumen de la invención

55 La presente invención se refiere al campo de la biotecnología fúngica, más particularmente a sistemas fuertes de expresión de genes en especies de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que funcionan como promotores fuertes de la expresión de genes en los géneros *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Pseudozyma* y *Ustilago*. Estas secuencias de polinucleótidos se denominan a veces en la presente descripción como secuencias de polinucleótidos promotoras. Como se reivindica en la reivindicación 9 más abajo, la presente invención proporciona un promotor aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.:6 u 8, o la porción promotora de la misma. En una modalidad, las secuencias de polinucleótidos promotoras comprenden la secuencia establecida en cualquiera de las sec. con núms. de ident.:6 u 8. En otra modalidad, las secuencias de polinucleótidos promotoras comprenden la secuencia promotora de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:6 u 8, es decir, la secuencia sin los sitios de clonación. Cada una de las secuencias de polinucleótidos promotoras contiene al menos un motivo de secuencia GAGGAG, que funciona para potenciar la expresión de genes en dichas especies fúngicas. Cada una de las secuencias

de polinucleótidos es efectiva para llevar a cabo la expresión fuerte de genes en los géneros *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Pseudozyma* y *Ustilago*. Además, los fragmentos operables de estas secuencias de polinucleótidos promotoras pueden aislarse mediante el uso de ensayos convencionales de tamizaje de promotores y pueden tamizarse para la selección eficiente de las células fúngicas transformadas mediante el uso de las técnicas descritas en la presente descripción. En una modalidad, un fragmento operable, también denominado una porción promotora en la presente descripción, tiene aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud comenzando desde la posición -1 del codón ATG. Como se usa en la presente descripción "hasta" se refiere a la longitud de la porción promotora de los promotores establecidos en las sec. con núms. de ident. descritas. Por lo tanto, "hasta" se refiere a la longitud máxima de la secuencia promotora si hay menos de 1100 nucleótidos de los promotores de las sec. con núms. de ident. descritas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ADN, como se reivindica en la reivindicación 1 más abajo, que comprende las secuencias de polinucleótidos promotoras descritas en la presente descripción, un polipéptido unido operablemente que codifica una secuencia y una secuencia de ARN terminadora de la transcripción unida operablemente. Cualquier terminador de la transcripción eucariótico, bien conocido por un experto en la técnica, puede usarse. Tal constructo de ADN permite la expresión fuerte del polipéptido en una especie fúngica en la que el genoma está sesgado en C y G. El constructo de ADN permite la expresión eficiente del polipéptido en una especie fúngica seleccionada de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*. Las especies de particular importancia son aquellas en los géneros *Rhodospodium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Ustilago* y *Pseudozyma*, en los cuales residen un número de especies con gran potencial para la bioconversión de recursos renovables en productos de alto valor, tales como triglicéridos, biodiesel, alcohol graso, vitaminas, lactona, terpenoides y biotensioactivos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los vectores de clonación y transformación para los promotores. Ambos, pPN007 y pRH2031 se basan en pPZP200 y contienen el marcador de selección con higromicina *Urnpgd1::hpt-3*. RtGFP es un gen de GFP de codón optimizado para el genoma rico en GC.

La Figura 2 muestra la ubicación de los motivos GAGGAG. Las líneas verticales con * indican los motivos GAGGAG en orientación sentido, las líneas restantes son en la orientación antisentido.

La Figura 3 muestra la fluorescencia relativa de RtGFP dirigida por los promotores *ENO1* y *FAD1* de varias longitudes, que se definen como el número de nucleótidos que comienza desde el primer nucleótido del codón putativo de inicio de la traducción (ATG) hasta el punto del extremo 5', excluyendo los sitios de restricción añadidos. Los promotores mostraron tendencia similar en los medios YNB y YNB libre de nitrógeno (N⁻). 35S-Ω es un promotor básico que contiene el promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor que comienza desde la caja TATA hasta la posición -1 del UTR 5' y la secuencia omega del potenciador de la traducción del virus del mosaico del tabaco (TMV) insertado de manera inmediata aguas arriba de RtGFP. La fluorescencia basal de la cepa no transformada (*R. toruloides* ATCC 10657) se sustrajo en todos los valores.

La Figura 4A muestra detalles de la secuencia promotora de 519 pb de Rg2*ENO1*. Las flechas indican las posiciones de los extremos 5' de varias delecciones.

La Figura 4B muestra el código y la longitud de cada uno de los promotores Rg2*ENO1* truncados.

La Figura 5A y la Figura 5B muestran la fluorescencia relativa de RtGFP dirigida por los promotores *ENO1* de varias longitudes, que se definen como el número de nucleótidos que comienza desde el primer nucleótido del codón putativo de inicio de la traducción (ATG) hasta el punto del extremo 5', excluyendo los sitios de restricción añadidos. Los promotores mostraron tendencia similar en los medios YNB (Figura 5A) y YNB libre de nitrógeno (N⁻) (Figura 5B). Rg1 Wt se refiere a la fluorescencia basal de *R. glutinis* ATCC 90781.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece la invención.

El término "unido operablemente" o "unido operativamente" se define en la presente descripción como una configuración en la que una secuencia reguladora o de control se coloca apropiadamente en una posición con relación a la secuencia de nucleótidos del constructo de ácido nucleico de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Las secuencias reguladoras o de control pueden colocarse en el lado 5' de la secuencia de nucleótidos o en el lado 3' de la secuencia de nucleótidos como se conoce bien en la técnica.

El término "expresión fuerte" como se usa en la presente descripción significa la expresión de una proteína marcadora o ARNm a un nivel detectable mediante el uso de métodos de detección conocidos, por ejemplo, fluorescencia para GFP, ensayo de actividad para los genes GUS y lacZ.

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología fúngica, más particularmente a sistemas fuertes de expresión de genes en especies de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que funcionan como promotores fuertes de la expresión de genes en los géneros *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Pseudozyma* y *Ustilago*. Estas secuencias de polinucleótidos se denominan a veces en la presente descripción como secuencias de polinucleótidos promotoras. En una modalidad, las secuencias de polinucleótidos promotoras comprenden la secuencia establecida en cualquiera de las sec. con núms. de ident.:6 u 8. En otra modalidad, las secuencias de polinucleótidos promotoras comprenden la secuencia promotora de cualquiera de las sec. con núms. de ident.:6 u 8, es decir, la secuencia sin los sitios de clonación. Cada una de las secuencias de polinucleótidos promotoras contiene al menos un motivo de secuencia GAGGAG, que funciona para potenciar la expresión de genes en dichas especies fúngicas. Cada una de las secuencias de polinucleótidos es efectiva para llevar a cabo la expresión fuerte de genes en los géneros *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Pseudozyma* y *Ustilago*. Además, los fragmentos operables de estas secuencias de polinucleótidos promotoras pueden aislarse mediante el uso de ensayos convencionales de tamizaje de promotores y pueden tamizarse para la selección eficiente de las células fúngicas transformadas mediante el uso de las técnicas descritas en la presente descripción. En una modalidad, un fragmento operable, también denominado una porción promotora en la presente descripción, tiene aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud comenzando desde la posición -1 del codón ATG. Como se usa en la presente descripción "hasta" se refiere a la longitud de la porción promotora de los promotores establecidos en las sec. con núms. de ident. descritas. Por lo tanto, "hasta" se refiere a la longitud máxima de la secuencia promotora si hay menos de 1100 nucleótidos de los promotores de las sec. con núms. de ident. descritas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ADN que comprende las secuencias de polinucleótidos promotoras descritas en la presente descripción, un polipéptido unido operablemente que codifica la secuencia y una secuencia de ARN terminadora de la transcripción unida operablemente. Cualquier terminador de la transcripción eucariótico, bien conocido por un experto en la técnica, puede usarse. Tal constructo de ADN permite la expresión fuerte del polipéptido en una especie fúngica en la que el genoma está sesgado en C y G. De particular importancia son las especies de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*. Las especies de particular importancia son aquellas en los géneros *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Ustilago* y *Pseudozyma*, en los cuales residen un número de especies con gran potencial para la bioconversión de recursos renovables en productos de alto valor, tales como triglicéridos, biodiesel, alcohol graso, vitaminas, lactona, terpenoides y biotensioactivos.

La hibridación de ácidos nucleicos, una técnica bien conocida por aquellos con experiencia en la técnica de la manipulación del ADN, puede usarse para identificar otros polinucleótidos adecuados. De acuerdo con la invención otros promotores adecuados para su uso pueden obtenerse mediante la identificación de polinucleótidos que hibridan selectivamente con los promotores descritos anteriormente por hibridación bajo condiciones de baja rigurosidad, condiciones de moderada rigurosidad, o condiciones de alta rigurosidad. Las secuencias que hibridan selectivamente, típicamente tienen al menos 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia, y con la máxima preferencia 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia entre sí.

Las búsquedas en bases de datos y las búsquedas de homología de las bases de datos de genomas y nucleótidos identifican moléculas similares de ADN o ARN basadas en la alineación de nucleótidos mediante el uso de algoritmos o programas de computadoras y estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica. De acuerdo con la invención otros polinucleótidos adecuados para su uso pueden obtenerse mediante la identificación *in silico* de polinucleótidos para las secuencias reguladoras con al menos 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia, y con la máxima preferencia 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia entre sí.

La invención proporciona una secuencia de polinucleótidos promotora seleccionada de las sec. con núms. de ident.:6 u 8, o la secuencia promotora de la misma, es decir, la secuencia sin los sitios de clonación. En una descripción, una secuencia de polinucleótidos promotora se proporciona que tiene al menos 60 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos promotoras. En otra descripción, una secuencia de polinucleótidos promotora se proporciona que tiene 70 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos promotoras. En una descripción adicional, una secuencia de polinucleótidos promotora se proporciona que tiene 80 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos promotoras. En una descripción adicional, una secuencia de polinucleótidos promotora se proporciona que tiene 90 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos promotoras. En otra modalidad, una secuencia de polinucleótidos promotora se proporciona que tiene 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos promotoras. En otra modalidad, una secuencia de polinucleótidos promotora se proporciona que tiene 98 % de identidad con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos promotoras. En una modalidad, una secuencia promotora en la presente descripción, tiene aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud que comienza desde la posición -1 del codón ATG. Como se usa en la presente descripción "hasta" se refiere a la longitud de la porción promotora de los promotores establecidos en las sec. con núms. de ident. descritas. Por lo tanto, "hasta" se refiere a la longitud máxima de la secuencia promotora si hay menos de 1100 nucleótidos de los promotores de las sec. con núms. de ident. descritas.

- La invención proporciona un constructo de polinucleótido que comprende un promotor aislado descrito en la presente descripción, tal como uno seleccionado de las sec. con núms. de ident.:6 u 8, o la porción promotora de las mismas, unido operativamente a una secuencia que codifica un polipéptido que se une operativamente a un terminador de la transcripción. En una modalidad, un fragmento operable, también denominado una porción promotora en la presente descripción, tiene aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud comenzando desde la posición -1 del codón ATG. Como se usa en la presente descripción "hasta" se refiere a la longitud de la porción promotora de los promotores establecidos en las sec. con núms. de ident. descritas. Por lo tanto, "hasta" se refiere a la longitud máxima de la secuencia promotora si hay menos de 1100 nucleótidos de los promotores de las sec. con núms. de ident. descritas. En una modalidad, el constructo de polinucleótido permite la expresión eficiente de un polipéptido en una especie fúngica seleccionada de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*. La especie fúngica es preferentemente una seleccionada del género *Rhodosporidium*, *Rhodoturula*, *Ustilago*, *Pseudozyma*, o *Sporobolomyces*, el genoma de los cuales contiene al menos 50 % de C y G, preferentemente más del 60 % de C y G.
- En una modalidad, el constructo de polinucleótido se inserta en un vector T-ADN, un vector transportador, o en un cromosoma fúngico, en donde la secuencia que codifica el polipéptido contiene al menos 50 % de CG, preferentemente 60 % de CG y con la máxima preferencia más del 80 % de CG.
- En otra modalidad, la secuencia de polinucleótidos promotora contiene al menos una secuencia GAGGAG, o invierte la secuencia complementaria de la misma. En otra modalidad, el promotor aislado se une operativamente a un gen que codifica una enzima de resistencia a antibióticos, una enzima de resistencia a herbicida, GFP, GUS, lacZ, terpeno sintasa, ácido graso desaturasa, P450 citocromo oxidasa, glucanasa, xilanasa, mananasa, manosidasa, glucosidasa, glucomananasa, xiluglucanasa, hidroximetilglutaril-CoA sintasa, hidroximetilglutaril-CoA reductasa, acetil-CoA C-acetiltransferasa, mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil-difosfato delta-isomerasa, farnesil difosfato sintasa, geranilgeranil difosfato sintasa, metil transferasa, o glucosil transferasa, beta-carotenoide hidroxilasa, beta-carotenoide oxidasa.
- En una modalidad, puede usarse cualquier terminador de la transcripción operable en las especies fúngicas. Los terminadores se ubican típicamente aguas abajo (3') del gen, después del codón de parada (TGA, TAG o TAA). Los terminadores desempeñan un papel importante en el procesamiento y la estabilidad del ARN así como también en la traducción. La mayoría, pero no todos los terminadores, contienen una secuencia de poliadenilación o sitio de escisión. Ejemplos de secuencias específicas de poliadenilación son AAUAAA o AAUAAU. Estas secuencias se conocen como los elementos próximos aguas arriba (NUE) (Nagaya y otros, 2010). Los NUE usualmente residen aproximadamente 30 pb de una región rica en GU (Mogen y otros, 1990; Mogen y otros, 1992; Rothnie y otros 1994), conocida con elementos lejanos aguas arriba (FUE). Los FUE potencian el procesamiento en la secuencia de poliadenilación o el sitio de escisión, que usualmente es un CA o UA en una región rica en U (Bassett, 2007). Dentro del terminador, existen elementos que aumentan la estabilidad del ARN transcrito (Ohme-Takagi y otros, 1993; Newman y otros, 1993; Gutiérrez y otros, 1999) y pueden también controlar la expresión de genes (Ingelbrecht, 1989; An y otros, 1989).
- La hibridación de ácidos nucleicos, una técnica bien conocida por aquellos con experiencia en la técnica de la manipulación del ADN, puede usarse para identificar otros terminadores adecuados. De acuerdo con la invención otros promotores adecuados para su uso pueden obtenerse mediante la identificación de terminadores que hibridan selectivamente con los promotores descritos anteriormente por hibridación bajo condiciones de baja rigurosidad, condiciones de moderada rigurosidad, o condiciones de alta rigurosidad. Las secuencias que hibridan selectivamente, típicamente tienen al menos 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia, y con la máxima preferencia 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia entre sí.
- Las búsquedas en bases de datos y las búsquedas de homología de las bases de datos de genomas y nucleótidos identifican moléculas similares de ADN o ARN basadas en la alineación de nucleótidos mediante el uso de algoritmos o programas de computadoras y estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica. De acuerdo con la invención otros terminadores adecuados para su uso pueden obtenerse mediante la identificación *in silico* de terminadores para las secuencias reguladoras con al menos 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia, y con la máxima preferencia 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia entre sí.
- Un ADN de interés puede añadirse al constructo de polinucleótido. El ADN de interés se une operativamente al promotor y a un terminador. Cualquier promotor y terminador operable en las especies de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina* puede usarse. En algunas modalidades, el ADN de interés puede usarse para insertar o modificar rutas metabólicas, tales como biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de lípidos, biosíntesis de triglicéridos, y las similares. El ADN de interés puede insertarse en el genoma de las células fúngicas para potenciar la bioconversión de los recursos renovables en productos de alto valor, tales como triglicéridos, biodiesel, alcohol graso, vitaminas, biotensioactivos, lactona, terpenoide y similares.
- Un constructo de polinucleótido puede introducirse directamente en el ADN genómico de la célula fúngica mediante el uso de técnicas tales como electroporación y microinyección de los protoplastos de las células vegetales, o el constructo de polinucleótido puede introducirse directamente al tejido fúngico mediante el uso de métodos balísticos, tal como bombardeo con partículas de ADN. Alternativamente, el constructo de polinucleótido puede combinarse con regiones flanqueantes adecuadas de T-ADN e introducirse en un vector huésped convencional de *Agrobacterium tumefaciens*. Las

funciones de virulencia del huésped *Agrobacterium tumefaciens* dirigirá la inserción del constructo en el ADN de las células fúngicas cuando la célula se infecta por la bacteria. Por lo tanto, puede usarse cualquier método, que proporcione una transformación/transfección efectiva. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 7,241,937, 7,273,966 y 7,291,765 y las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos núms. 2007/0231905 y 2008/0010704 y las referencias citadas en las mismas. Ver además, las solicitudes internacionales publicadas núms. WO 2005/103271 y WO 2008/094127 y las referencias citadas en las mismas.

Los hongos transformados se transfieren a medio de cultivo estándar (por ejemplo, medio de nutrientes sólidos o líquidos, grano, vermiculita, compost, turba, madera, aserrín, paja, etc.) y se crecen o se cultivan en una manera conocida por el experto en la técnica.

Después de que el polinucleótido se incorpora establemente en los hongos transformados, puede transferirse a otros hongos por cruce sexual. Puede usarse cualquiera de una serie de técnicas de reproducción estándar, en dependencia de las especies a cruzar.

Puede ser útil generar un número de hongos individuales transformados con cualquier constructo recombinante para recuperar hongos libres de cualquier efecto posicional. También puede ser preferible seleccionar los hongos que contienen más de una copia del constructo de polinucleótido introducido de manera que se obtengan niveles altos de expresión de la molécula recombinante.

Puede ser conveniente producir líneas fúngicas que sean homocigóticas para un gen particular si es posible en las especies particulares. En algunas especies esto se logra mediante el uso de cultivos monospóricos. Al usar estas técnicas, es posible producir una línea haploide que porta el gen insertado y después duplicar el número de cromosomas de manera espontánea o mediante el uso de colchicina. Esto da lugar a un hongo que es homocigótico para el gen insertado, que puede evaluarse fácilmente si el gen insertado porta un gen de marcador de selección adecuado para la detección de los hongos que portan el gen. Alternativamente, los hongos pueden autofertilizarse, lo que conduce a la producción de una mezcla de esporas que consiste en, en el caso más simple, tres tipos, homocigotos (25 %), heterocigotos (50 %) y nulos (25 %) para el gen insertado. Aunque es relativamente fácil clasificar los hongos nulos de aquellos que contienen el gen, es posible en la práctica clasificar los hongos homocigotos de los heterocigotos mediante análisis de la transferencia Southern en el que se presta atención cuidadosa a cargar las cantidades exactamente equivalentes de ADN de la población mezclada, y se clasifica los heterocigotos por la intensidad de la señal de una sonda específica para el gen insertado. Es recomendable verificar los resultados del análisis de la transferencia Southern permitiendo que cada transformante independiente se autofertilice, dado que puede obtenerse evidencia adicional para homocigosis por el simple hecho que si los hongos eran homocigotos para el gen insertado, todas las líneas fúngicas subsecuentes del propio individuo contendrán el gen, mientras que si el hongo era heterocigoto para el gen, la generación que crece de la propia semilla contendrá líneas fúngicas nulas. Por lo tanto, con la simple autofertilización se puede seleccionar líneas fúngicas homocigotas que también pueden confirmarse por el análisis de la transferencia Southern.

La creación de líneas parentales homocigotas hace posible la producción de hongos y esporas híbridos que contendrán un componente proteico modificado. Las líneas parentales homocigotas transgénicas se mantienen con cada parental que contiene la primera o segunda secuencia de ADN recombinante unida operablemente a un promotor. También se incorpora en este esquema las ventajas de cultivar un cultivo híbrido, que incluye la combinación de los rasgos más valiosos y vigor híbrido.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología biología celular, cultivo celular y biología transgénica, que están dentro del estado de la técnica. Ver, por ejemplo, Maniatis y otros, 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning, 2da Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Sambrook y Russell, 2001, Molecular Cloning, 3ra Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Ausubel y otros, 1992, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, incluidas las actualizaciones periódicas); Glover, 1985, ADN Cloning (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, Molecular biology of plants: a laboratory course manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, Nueva York, 1992); Guthrie y Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, Nueva York, 1991); Harlow y Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y otros eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6ta Edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire y otros, ARN Interference Technology: From Basic Science to Drug Development, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, ARN Interference in Practice, Wiley-VCH, 2005; Engelke, RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology, DNA Press, 2003; Gott, RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application, CRC, 2004.

EJEMPLOS

La presente invención se describe con referencia a los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Se utilizaron técnicas estándar bien conocidas en la técnica o técnicas específicamente descritas a continuación.

Ejemplo 1

Cultivo de Cepas Microbianas y Métodos Moleculares Básicos

La cepa *Rhodospiridium toruloides* ATCC10657 (referida como Rt1), y la cepa *Rhodotorula glutinis* ATCC204091 (referida como Rg2), *Pseudozyma aphidis* ATCC32657, se obtuvieron de American Type Culture Collections (ATCC). *Sporobolomyces roseus* FGSC 10293 (IAM13481) y *Rhodotorula graminis* WP1 (FGSC WP1) (referidas como Rg3) se obtuvieron de Fungal Genetics Stock Center (Universidad de Missouri, EE.UU.). La cepa de *Ustilago maydis* y la cepa *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 han sido descritas (Ji y otros, 2010; Lazo y otros, 1991). La cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue se usó para la manipulación y amplificación de rutina de plásmidos. Las cepas fúngicas se cultivaron a 28 °C en caldo YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 2 % de glucosa) o en agar patata-dextrosa sólido (PDA). *A. tumefaciens* se cultivó a 28 °C en medio líquido o sólido 2YT (1,6 % de triptona, 1 % de extracto de levadura, 0,5 % de NaCl). *E. coli* se creció en caldo LB o en agar sólido LB.

El ADN genómico se extrajo en base al método descrito para *U. maydis* (Ji y otros, 2010) con algunas modificaciones. En resumen, el cultivo celular en fase exponencial se recogió y se lavó con 1 M de sorbitol. Las células se resuspendieron en 0,1 ml de tampón SCS (1 M de sorbitol, 20 mM de citrato de sodio, pH 5,8) y se suplementaron con perlas de vidrio (1 mm de diámetro, Sigma-Aldrich, EE.UU.). La lisis de las células se produjo por agitación vorticial y el ADN genómico se aisló después de la extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN extraído se cuantificó con el Espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, EE.UU.) y la calidad del ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Ejemplo 2

Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)

ATMT se realizó esencialmente como se describió anteriormente para *R. toruloides*, *S. roseus*, *U. maydis* y *Pseudozyma aphidis* (Ji, y otros, 2010; Liu, y otros, 2012). El cocultivo de las células fúngicas y de los donantes *Agrobacterium* se realizó a pH 5,6, 24 °C durante 2,5-3 días en membranas de nailon y la selección se realizó en placas YPD que contienen 300 µg/ml de cefotaxima y 150-300 µg/ml (150 µg/ml para *R. toruloides*, *R. glutinis*, y 300 µg/ml para *P. aphidis* y *S. roseus*) de higromicina B a 28 °C durante 3-5 días.

Ejemplo 3

Clonación de los promotores

Basado en la abundancia de la secuencia EST publicada en varios medios (Ho y otros, 2007), seleccionamos un número de genes (Tabla 1) como fuente potencial de promotores fuertes para *Rhodospiridium* y *Rhodotorula*. Otros genes candidatos incluyen aquellos que codifican proteínas de la biosíntesis de ácidos grasos en *Rhodospiridium* y *Rhodotorula*, por ejemplo, acetil-CoA sintasa (*ACC1*), proteína portadora de acil-CoA (*ACP1*), piruvato descarboxilasa (*PDC1*) y el gen regulado por nitrato (*NAR1*). Las secuencias CDS de *Ustilago maydis* se buscaron contra la base de datos genómica de *Rhodospiridium* y *Rhodotorula*.

Tabla 1

Genes Candidatos con Promotor Fuerte					
Medio Completo*	medio sin carbono*	Medio sin nitrógeno*	teliospora latente*	Descripción	ID de MUMDB
7	18	22	3	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	um02491
35	54	22	11	TAL1 - transaldolasa probable	um04138
8	12	6	0	Actina probable	um11232
107	79	65	32	proteína de fusión ubiquitina/proteína ribosomal S27a probable	um04588

5	146	54	16	8	FPR1 - peptidil-prolil cis-trans isomerasa, proteína de unión a FK506 probable	um11054
10	35	37	14	17	CPR1 - ciclofilina (peptidilprolil isomerasa) probable	um03726
15	48	13	29	4	cadena alfa del factor de elongación de la traducción eEF-1 probable	um00924
	0	0	0	2	PDC1 - piruvato descarboxilasa, isoenzima 1 probable	um03994
	17	6	11	1	ENO1 - enolasa I (2-fosfoglicerato deshidratasa) probable	um03356
Nota: * Los números indican el total de aciertos en la biblioteca de EST del medio respectivo.						

20 Para definir el extremo 3' de los promotores, se realizó RACE 5' mediante el uso del kit de Amplificación de ADNc BD SMARTer™ RACE (Clontech, California, EE.UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos
 25 promotores de ADN se obtuvieron por PCR mediante el uso de un cebador del extremo 3' que se diseña en el primer ATG en las regiones 5' no traducidas, usualmente con un sitio de solapamiento *Nco*I (CCATGG) o *Bsp*HI (TCATGA) en el codón ATG. *Bam*HI se usa si la secuencia de ADN contiene los sitios *Nco*I y *Bsp*HI. Los cebadores 5' se diseñaron a 1-2 kb del ATG. Los cebadores se enumeran en la Tabla 2. Los fragmentos de PCR se digirieron con las enzimas correspondientes, se clonaron en pPN006 o pRH2031 (Figura 1), que es un vector T-ADN que contiene el casete *RtGPD1:RtGFP:nos* (Liu y otros, 2012).

Tabla 2

Clonación de los Promotores Seleccionados					
sec. con núm. de ident.:	Nombre del promotor	Origen	Longitud (pb)	Cebadores 5' del PCR (sec. con núm. de ident.):	Cebadores 3' del PCR (sec. con núm. de ident.):
1	Rg2TEF1	<i>R. glutinis</i> ATCC 204091 factor de elongación de la traducción	1017	AAAGGTACCGTGCG AGAAGAAGCGAGG C (13)	AAACCATGGTTCCCC CCCAGTACACAGTAC AGTA (14)
2	Rg3TEF1	<i>R. graminis</i> cepa WP1 factor de elongación de la traducción	946	AAAGGTACCCATGC TGCTGCTGCCCTC A (15)	ATACCATGGTGGATG AAGTGAGATTGAGT G (16)
3	Rg3S27	<i>R. graminis</i> cepa WP1 proteína ribosomal S27	1464	AAAGGTACCCAAAG GGAGAGGAGCGGG CG (17)	AAACCATGGTGACCT ACGCCTACACAAGGG TGC (18)
4	Rg2ACP1	<i>R. glutinis</i> ATCC 204091 proteína portadora de acil-CoA	1321	AAAGGTACCTGAGC GGGCGAGCCGCGAG (19)	aaaTCATGACTGAACA AAGTTTTCTGCGGC GC (20)
5	Rg2NAR1	<i>R. glutinis</i> ATCC 204091 nitrato reductasa	1499	AAAGGTACCGCTCA TCATCGAGCGAGGG CAG (21)	AAACCATGGCGGCGG GTGATTCTTCTGGTT C (22)

6	Rg2ENO1	<i>R. ATCC 204091 enolasa (fosfopiruvato hidratasa)</i>	1596	gactagtcGCCAGGGAA CGCAGAGAAGG (23)	aaaccatgGCTGTGAGAG GAGTATCGCAG (24)
7	Rg2PDC1	<i>R. glutinis ATCC 204091 piruvato descarboxilasa</i>	1391	gactagtcGGCGAAGAG GAGGGGTGTTAGG (25)	aaaggatccgcatTGC GGT TCAAAGGCTGGGCG (26)
8	Rg3ENO1	<i>R. graminis cepa WP1 enolasa (fosfopiruvato hidratasa)</i>	1500	gactagtcCGTGCAGAAG GAACCCGAGGAG (27)	aaaccatgGCGAGGCGAG AGGGGTTGAG (28)
9	Rg3PDC1	<i>R. graminis cepa WP1 piruvato descarboxilasa</i>	1500	gactagtcGGGAGGATT GATGATCGGGTTGC (29)	aaacCATGGTGGTCGA GCTTGTGAGG (30)
10	Rg3PP1	<i>R. graminis cepa WP1 peptidilprolil isomerasa</i>	1222	AAAGGTACCGCGAG GGGAAGGGCAGGA GAGTCG (31)	AAACCATGGTCGGAC GGTGGGAAGGGGGG GGA (32)
11	Rg3TAL1	<i>R. graminis cepa WP1 transaldolasa</i>	1507	AAAGGTACCACTAC CTCGTCACGACCCA GGGTG (33)	AAACCATGGTGTAGG TAGCTGCGCGGGT (34)
12	Rg2ACC1	<i>R. glutinis ATCC 204091 acetil-CoA sintasa</i>	1646	AAAGGCGCGCCTGA AGCTGTACATCGAG GTGGAC (35)	aaaCCATGGTCCCACA ATCAGTAGTTGTCT CGGAAG (36)

Ejemplo 4

Actividad del promotor en *Rhodospiridium* en medio de producción lípidos

Los constructos reporteros GFP del promotor se transformaron a *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10657 por el método ATMT. Las colonias transformadas (>100) se agruparon, se cultivaron en medio YPD con 150 µg/ml de higromicina B y 300 µg/ml de cefataxoma y se diluyeron a aproximadamente 0,1 de DO600 en el medio de producción lípidos [10 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, (pH 6,13), 4 g/L de extracto de levadura, 0,3 g/L de urea, 0,1 g/L de Na₂SO₄, 10 mg/L de tirosina, valina y vitamina B (B1+B6), 8 % de glucosa] sin antibióticos adicionados. Las cepas se cultivaron a 28 °C con agitación (280 rpm) durante 2 días y después se diluyeron a aproximadamente 0,1 de DO600 durante 24 horas y los cultivos se ajustaron a 0,6 unidades de DO600 antes de someterlos a la medición de la fluorescencia en un lector Tecan M200 mediante el uso de 476 nm como longitud de onda de excitación, y 509 nm como longitud de onda de emisión; valor de ganancia 100. La intensidad de la fluorescencia se normalizó a DO600 y se sustrajo contra los cultivos celulares no transformados bajo las mismas condiciones. Rg3TAL1 es débil mientras que Rg2ACC1 no mostró actividad evidente (Tabla 3). Los transformantes del reportero Rg2ACC1 en *Rhodospiridium glutinis* ATCC 90781 que no mostraron fluorescencia de la GFP se cultivaron en un medio limitado de nitrógeno (glucosa 70 g/l, extracto de levadura 0,75 g/l, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g/l, KH₂PO₄ 1,0 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,5 g/l, pH 5,6) durante 24 horas (no mostrado). El promotor RtGPD1 se establece en la sec. con núm. de ident.:38.

Tabla 3

Fluorescencia Relativa de la GFP de los Promotores seleccionados en <i>Rhodospiridium toruloides</i>								
Promotor	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3TAL1	Rg3S27	Rg3PPI	Rg2ENO1	Rg2ACC1	RtGPD1
Lectura de fluorescencia	183	616	83	316	566	383	0	1100

Ejemplo 5

10 Actividad del Promotor en Medio rico en N y libre de N en *Rhodospiridium*, *Pseudozyma*, *Ustilago* y *Sporobolomyces*

Un conjunto seleccionado de constructos reporteros GFP del promotor se transformaron mediante el método ATMT a *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10657, *Ustilago maydis* L8, *Pseudozyma aphidis* ATCC32657 y *Sporobolomyces roseus* FGSC 10293. Las colonias transformadas (>100) se agruparon, se cultivaron en medio YPD con 150 µg/ml (o 300 µg/ml para *Pseudozyma aphidis*) de higromicina B y 300 µg/ml de cefataxoma durante 2 días a 28 °C y se diluyeron a aproximadamente 0,1 DO600 en medio YNB y también en medio YNB N- (ambos medios con 5 % de glucosa) y se continuó el cultivo durante 1-3 días con agitación. La DO600 y la fluorescencia de la GFP se midieron con Tecan infinite200. La intensidad de la fluorescencia de la GFP (normalizada contra la DO600) se indica en las Tablas 4-11. Los promotores Umgpd1, RtGPD1, Rg3GPD1, Rg2FAD1 y SrGPD1 se establecen en las sec. con núms. de ident:37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente. El aislamiento de estos promotores se describe en el documento núm. WO 2012/169969.

Tabla 4

Intensidad de la Fluorescencia en <i>R. toruloides</i> ATCC 10657 en Medio YNB														
	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umcpd1	RtGPD1	Rg3GPD1	R2FAD1	SrGPD1
Día1	67098,1±4 810,2	493314,2± 17949,6	315280,7±1 3486,8	822714,3±2 9975,4	76162,8±5 196,2	1229511,5±3 8057,0	439906,8±2 0026,2	310853,1±1 1379,8	524990,1±1 9316,2	185894,4± 5956,8	647267,9±1 7825,0	482273,0±1 7080,6	790204,6±2 6581,6	94929,5±3 664,8
Día2	90051,8±5 580,0	324001,3± 15528,4	138885,1±5 578,8	328422,2±1 3168,4	77194,7±5 304,6	960118,3±35 167,0	195357,6±1 4536,8	49159,7±24 73,8	318157,8±1 3705,8	23430,4±1 1392,6	470829,4±1 9049,2	302113,7±2 7780,8	622505,2±2 4257,0	57888,5±3 134,6
Día3	125629,1± 5884,6	109829,4± 5871,2	71034,5±37 93,6	391254,0±1 5650,6	72916,9±5 191,4	1080769,4±3 7277,4	186096,4±1 5397,2	69658,8±27 17,4	179610,3±7 379,4	52504,2±2 197,4	417595,6±1 6078,8	294063,5±1 6996,2	678405,8±2 5364,6	72393,3±3 358,4

Tabla 5

Intensidad de la Fluorescencia en <i>R. tortuloides</i> ATCC 10657 en Medio YNB libre de N														
	Rg2TEF	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO	Rg3PDC1	Umcpd1	RIGPD 1	Rg3GPD1	R2FAD1	SrGPD1
Día1	70881,8 ±5110,9	380951,5±1 8050,3	365547,6±1 3587,5	815919,4±3 0076,1	272301,0± 5296,9	1424622,6± 38157,7	446260,0±2 0126,9	146494,1±1 1480,5	521271,4±1 9416,9	179467,0± 6057,5	798469,1±1 7925,7	543617,9±1 7181,3	1046580,2± 26682,3	208402,0± 3765,5
Día2	85225,0 ±5880,7	154658,6±1 5629,1	229116,8±5 979,5	194767,0±1 3269,1	96375,2±5 405,3	1023479,6± 35267,7	189373,9±1 4637,5	87625,2±25 74,5	229565,0±1 3806,5	70298,9±1 1493,3	559941,0±1 9149,9	325267,7±2 7881,5	729764,3±2 4357,7	74769,4±3 235,3
Día3	101884, 6±6085, 3	75616,7±59 71,9	131082,7±3 894,3	274152,1±1 5751,3	49724,9±5 292,1	1045808,5± 37378,1	175901,0±1 5497,9	41721,8±28 18,1	116966,8±7 480,1	42892,0±2 298,1	240704,2±1 6179,5	143840,6±1 7096,9	495414,9±2 5564,6	27930,9±3 459,1

Tabla 6

Intensidad de la Fluorescencia en <i>P. aphidis</i> en Medio YNB														
	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umcpd1	RtGPD1	Rg3GPD1	Rg2FAD1	SrGPD1
Día1	20710,7±535,5	24954,1±1347,7	17864,7±903,2	25694,5±1084,7	11741,6±577,1	15870,6±783,5	21807,7±790,4	19768,3±978,4	27733,8±986,7	22180,7±1009,0	29319,0±465,9	37495,4±1774,8	16309,0±215,5	23103,0±1455,1
Día2	5617,3±268,1	7829,7±612,5	4804,2±403,4	7541,3±629,4	3854,7±311,2	4634,5±306,2	6430,8±595,9	5748,1±519,0	8123,9±617,0	6537,3±584,8	9876,9±803,1	9713,0±709,4	4859,7±615,0	7830,9±752,6
Día3	3738,0±173,8	3980,9±298,1	3106,8±240,7	3793,1±699,3	1679,0±137,9	2504,6±301,5	3504,2±410,4	3165,2±396,5	4602,1±780,2	3260,7±324,1	4542,3±154,2	5781,1±478,1	2671,1±167,1	3900,5±290,0

Tabla 7

Intensidad de la Fluorescencia en <i>P. aphidis</i> ATCC 10657 en Medio YNB libre de N														
	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umcpd1	RtGPD1	Rg3GPD1	Rg2FAD1	StGPD1
Día 1	4030,5±45 5,2	17201,3±114 5,5	4757,5±36 7,8	14666,9±32 2,0	5485,1±49 0,5	13203,8±46 6,0	10218,7±27 1,8	12705,6±83 1,7	11338,6±33 8,7	9034,5±257 7,7	11511,6±39 6,1	9322,7±208 6	13410,0±38 3,1	21144,1±93 6,9
Día 2	5247,5±21 4,5	14281,5±290 0	7093,2±32 2,7	7835,6±503 6	6845,8±54 9,0	6734,8±245 0	5801,6±476 7	3302,7±415 2	9382,1±193 6	13731,3±46 7,8	10564,5±14 2,5	10390,4±56 7,5	16069,0±49 2,0	16013,3±20 2,1
Día 3	5762,8±53 0,3	12371,9±223 6	1983,5±18 0,5	2564,9±224 5	2014,3±20 3,4	2791,4±226 1	2013,8±187 8	5876,3±297 4	5874,1±585 2	5004,3±243 1	7856,3±215 7	9851,7±233 6	12774,0±22 5,3	14045,7±31 7,5

Tabla 8

Intensidad de la Fluorescencia en <i>U. maydis</i> L8 en medio YNB														
	Rg2TPF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umcpd1	RtGPD1	Rg3GPD1	Rg2FAD1	SrGPD1
Día 1	4497,4±40 5,1	31255,7±19 74,8	8744,3±74 3,4	16705,1±9 87,7	5663,0±59 8,1	10351,3±6 08,5	17224,0±8 13,1	18699,4±6 89,9	30749,5±16 58,1	12977,4±97 8,4	38101,5±10 12,5	16539,8±5 40,3	35361,2±12 90,8	20121,3±9 32,4
Día 2	2237,4±19 0,0	20291,8±10 64,2	12961,1±7 89,4	7046,8±58 4,2	1899,9±25 2,3	3508,0±18 3,5	1948,5±26 8,4	4185,3±23 6,9	10692,2±45 2,9	14498,0±10 96,3	33043,3±92 4,6	5729,0±29 0,4	13483,6±72 8,5	13639,8±5 67,3
Día 3	728,7±142 ,3	29221,7±19 35,6	2132,4±19 6,8	1651,0±12 5,3	6453,6±29 5,7	1885,2±13 8,7	1610,0±19 8,6	10261,0±8 58,7	13449,8±68 9,7	10667,8±10 8,7	37663,7±83 9,4	4328,0±49 8,1	19667,2±12 82,3	7559,5±21 9,2

Tabla 9

Intensidad de la Fluorescencia en <i>U. maydis</i> L8 en Medio YNB libre de N														
	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umugd1	RtGPD1	Rg3GPD1	Rg2FAD1	SrGPD2
Día 1	2736,3±19 5,3	23444,3±16 74,3	4848,0±743 4	14420,4±78 5,7	4965,9±29 1,7	3393,2±25 8,4	5099,7±36 3,5	13592,6±90 7,9	20887,7±10 43,2	8457,1±275, 2	36784,6±90 9,4	5161,0±20 4,5	27948,4±10 73,6	19682,9±11 36,5
Día 2	4635,9±20 0,5	22335,2±98 4,7	11189,0±62 8,3	12643,8±78 4,1	8929,3±33 2,9	8782,8±38 4,2	6278,8±43 5,4	16443,4±10 23,5	18643,1±85 3,6	15615,6±10 01,7	31362,0±93 1,9	9944,7±30 0,1	19059,7±83 9,1	10507,5±50 9,5
Día 3	4778,9±24 2,3	21945,0±15 31,6	5243,9±171 1	3563,5±105 ,6	1052,9±99 ,3	402,1±138 ,7	2136,7±10 8,1	3832,4±251, 7	10741,0±61 9,2	5416,3±157, 7	22029,0±79 1,3	5116,4±33 2,8	14070,9±81 2,8	5509,8±293, 1

Tabla 10

Intensidad de la Fluorescencia en <i>S.roseus</i> en medio YNB														
	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Pg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umppd1	Rg3PD1	Rg3GPD1	Rg2FAD1	SrGPD2
Día1	34433,7± 2961,3	62781,0±50 13,6	49396,6±39 65,7	35726,2±30 12,6	44850,3±76 39,8	54393,9±20 13,6	45625,4±39 68,1	75257,5±30 86,3	75080,8±30 15,7	61607,3±23 45,1	115602,4±4 598,7	36185,9±28 45,2	55143,4±54 23,9	76783,0±19 46,3
Día2	7223,1±1 025,8	7997,9±116 9,4	5486,4±103 2,6	11336,9±69 8,1	7453,9±854 ,1	16829,3±85 2,3	7401,2±897 ,5	7108,0±108 7,6	7110,1±521 ,7	13471,3±36 9,3	7832,5±496, 8	6434,0±963 ,4	10613,7±10 15,8	24326,0±87 6,5
Día3	9874,2±1 356,9	6212,6±159 8,7	7978,3±164 8,1	6425,8±963 ,7	8653,9±158 7,5	9632,8±897 ,6	9013,8±125 8,4	9898,4±169 8,7	9985,6±765 ,1	8013,7±965 ,4	11231,1±10 65,8	4931,2±125 9,8	7469,8±134 59	16036,7±18 97,4

Tabla 11

Intensidad de la Fluorescencia en <i>S. roseus</i> en Medio YNB libre de N														
	Rg2TEF1	Rg3TEF1	Rg3S27	Rg2ACP1	Rg2NAR1	Rg2ENO1	Rg2PDC1	Rg3ENO1	Rg3PDC1	Umugd1	PIGPD1	Pg3GPD1	Rg2FAD1	SrGPD2
Día 1	30415,8±21 11,3	38195,6±21 63,4	34075,9±31 15,7	37998,4±21 62,6	39594,0±46 78,3	38138,8±11 63,6	25733,8±31 18,1	43722,6±22 36,3	42986,2±21 65,7	53744,0±14 95,1	60102,2±23 65,9	49641,6±19 95,2	45162,3±45 73,9	47127,7±10 96,3
Día 2	6135,6±905 2,8	9358,5±104 9,4	10507,2±91 2,6	13226,8±57 8,1	9190,2±734 1,1	11034,9±73 2,3	5662,3±777 5,5	11550,1±96 7,6	11959,0±40 1,7	7691,8±249 3,3	12012,4±37 6,8	10303,5±84 3,4	10948,1±89 5,8	14795,5±75 6,5
Día 3	2698,7±120 6,9	5401,2±144 8,7	3012,9±149 8,1	6968,6±813 7,7	2165,8±143 7,5	2857,4±747 6,6	3541,9±110 8,4	4986,2±154 8,4	4879,3±615 1,1	5897,1±815 4,4	7854,3±915 8,8	4013,7±110 9,8	3946,5±119 5,9	9154,6±174 7,4

Ejemplo 6

Identificación de los Elementos Críticos para los Promotores Fuertes

- 5 Las secuencias promotoras de Rg3TEF1, Rg3S27, Rg2ACP1, Rg2ENO1, Rg2PDC1, Rg3PDC1y Rg2FAD1 (estearoil-CoA delta-9 desaturasa) se sometieron a escaneo de motivos promotores mediante el uso de Gibbs Motif Sampler en http://ccmbweb.ccv.brown.edu/cgi-bin/gibbs.12.pl?data_type=DNA&layout=advancedprgm&restore=/var/www/cgi-bin/euk.def.txt.
- 10 Se encontró un motivo conservado que comparte la secuencia núcleo GAGGAG en cada promotor. Notablemente, el promotor Rg2FAD1, que está dentro de los promotores más fuertes contiene el mayor número de motivos. (Figura 2).

Ejemplo 7

- 15 Deleción Anidada de los Promotores Rg2FAD1 y Rg2ENO1

Los constructos reporteros GFP del promotor de longitud completa Rg2ENO1 y Rg2FAD1 (gen de estearoil-CoA delta-9 desaturasa) en pRH2031 se modificaron para tener promotores acortados en serie. Esto se realizó sustituyendo el promotor con fragmentos de PCR de aproximadamente 300, 500, 1000 y 1500 pb del promotor. Todos los cebadores 5' incluyeron un sitio de corte *SpeI* mientras que el cebador 3' contiene un sitio de corte *NcoI*. Los constructos se transformaron mediante el método ATMT a *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10657. Las colonias transformadas (>500) se agruparon, se cultivaron en medio YNB con 150 µg/ml de higromicina B y 300 µg/ml de cefataxoma durante 2 días a 28 °C y se diluyeron a aproximadamente 0,1 DO₆₀₀ en medio YNB y también en medio YNB N⁻ (ambos medios con 5 % de glucosa) y se continuó el cultivo durante 24 horas con agitación. Los cultivos alcanzaron DO₆₀₀ de 0,2 unidades en los medios YNB N⁺ y YNB N⁻. La fluorescencia de la GFP se midió con Tecan infinite M200. El parámetro de ganancia se establece consistentemente a 85; la longitud de onda de Excitación y Emisión son 476, 509. La intensidad de la fluorescencia de la GFP (normalizada contra la DO₆₀₀) se indica en la Figura 3, que muestra que la longitud mínima del promotor ENO1 para la expresión óptima del gen reportero es aproximadamente 320 a 520 pb, mientras que el promotor FAD1 requiere aproximadamente 570 a 1120 pb.

Ejemplo 8

Deleción Anidada del Promotor de 519 pb Rg2ENO1

- 35 Los cebadores se diseñaron en varias ubicaciones en la secuencia promotora de 519 pb de Rg2ENO1, que se usaron para el PCR en combinación con el cebador inverso que se dirige al extremo 3' del promotor (Figura 4A). Todos los cebadores 5' incluyeron un sitio de corte *SpeI* mientras que el cebador 3' contiene un sitio de corte *NcoI*. Las longitudes de los productos del PCR (excluyendo la secuencia enlazadora extra en el extremo 5' y el codón ATG en el sitio 3') se resumen en la Figura 4B. Los fragmentos de PCR se digirieron individualmente con *SpeI* y *NcoI* y se clonaron en pRH2031-Rg2ENO1-RtGFP en los mismos sitios, sustituyendo el promotor ENO1 de longitud completa. Los constructos se transformaron mediante el método ATMT a *Rhodotorula glutinis* ATCC 90781, que es el parental diploide de *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10657 y ATCC 10788. Las colonias transformadas (>500) se agruparon, se cultivaron en medio YNB con 150 µg/ml de higromicina B y 300 µg/ml de cefataxoma durante 2 días a 28 °C y se diluyeron a aproximadamente 0,1 DO₆₀₀ en medio YNB y también en medio YNB N⁻ (ambos medios con 5 % de glucosa) y se continuó el cultivo durante 12 horas con agitación. Los cultivos alcanzaron DO₆₀₀ de 0,5~0,7 en los medios YNB y YNB N⁻. La fluorescencia de la GFP se midió con Tecan infinite M200. El parámetro de ganancia se establece consistentemente a 85; la longitud de onda de Excitación y Emisión son 476, 509. La intensidad de la fluorescencia de la GFP (normalizada contra DO₆₀₀) se indica en la Figura 5A y 5B. El promotor mostró tendencias similares en los dos medios probados. La mayor disminución en la actividad se observó en el promotor M6 y M7. Otra disminución significativa se observó entre M3 y M6, donde pueden encontrarse varios motivos relacionados con GAGGAG (Figura 4A).

El uso de los términos " un", " una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o se contradiga evidentemente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye pero sin limitarse a") a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en la presente descripción tiene meramente la intención de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique de cualquier otra forma en la presente, y cada valor por separado se incorpora en la descripción como si se mencionara individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en la presente descripción simplemente tiene el propósito de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención al menos que se reivindique de cualquier otra forma. Ningún lenguaje en la descripción debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

En la presente se describen modalidades de esta invención que incluyen el mejor modo conocido de los inventores para llevar a cabo la invención.

El término "expresión eficiente" se refiere a la expresión de una proteína reportera a un nivel que es detectable por fluorometría, fotomicroscopía o selección fenotípica de los transformantes mediante antibióticos, tal como higromicina.

Bibliografía

Abbott, E.P. y otros, 2013. Overcoming recalcitrant transformation and gene manipulation in yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, 283-295.

An, G., y otros, 1989. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell*, 1: 115-122.

Avis, T.J., 2008. Usefulness of heterologous promoters in the *Pseudozyma flocculosa* gene expression system. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, pg 456.

Bassett, C.L., 2007. Regulation of Gene Expression in Plants: The Role of Transcript Structure and Processing. New York: Springer Press.

Bölker, M., y otros, 1995. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet*. 248, 547-52.

Boulton, S., y otros, 1999. Interactive effects of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase on cellular responses to DNA damage. *Carcinogenesis*. 20, 199-203.

Boulton, S., y otros, 1996. Wortmannin is a potent inhibitor of DNA double strand break but not single strand break repair in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*. 17, 2285-90.

Bundock, P., y otros, 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 14, 3206-14.

Choi, J., y otros, 2007. Genome wide analysis of T DNA integration into the chromosomes of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology*. 66, 371-382.

Comai, L., y otros, 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science*. 221, 370.

De Groot, M. J. A., y otros, 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*. 16, 839-842.

de Oliveira, M. L. P., y otros, 2009. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*. 28, 387-395.

Durant, S., Karran, P., 2003. Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 31, 5501-12.

Gietz, R.D. and Woods, R. A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*. 350, 87-96.

Goldstein, A. L. y McCusker, J. H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15, 1541-1553.

Gutiérrez, R.A., y otros, 1999. Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci*, 4: 429-438.

Hajdukiewicz, P., y otros, 1994. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*. 25, 989-994.

Haughn, G. W., y otros, 1988. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Molecular and General Genetics*. 211, 266-271.

Heiser, W. C., 2000. Optimizing electroporation conditions for the transformation of mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*. 130, 117-34.

Hentges, P., y otros, 2005. Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 22, 1013-9.

- Hewald, S., y otros, 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 3033.
- Hill, J., y otros, 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research*. 19, 5791.
- 5 Ho, Eric CH, y otros (2007). Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC genomics* 8:334.
- Horns, F., y otros, 2012. Patterns of repeat-induced point mutation in transposable elements of basidiomycete fungi. *Genome biology and evolution*, 4, 240-247.
- 10 Hu, C., y otros, 2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*. 100, 4843-7.
- 15 Ianiri, G., y otros, 2011. Development of resources for the analysis of gene function in Pucciniomycotina red yeasts. *Fungal Genetics and Biology*. 48, 685-695.
- Ingelbrecht, I.L., y otros, 1989. Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell*, 1: 671-680.
- 20 Ito, H., y otros, 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology*. 153, 163-8.
- Ji, L., y otros, 2010. A Simplified and efficient method for transformation and gene tagging of *Ustilago maydis* using frozen cells. *Fungal Genet Biol*. 47, 279-87.
- 25 Kämper, J., 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. 271, 103-10.
- Khanna, H. K., y otros, 2007. Inhibition of *Agrobacterium*-induced cell death by antiapoptotic gene expression leads to very high transformation efficiency of banana. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 1048-1054.
- 30 Kirk, M. P., y otros *Dictionary of the Fungi*. CABI, Wallingford, 2008, pp. 716.
- Krugel, H., y otros, 1988. Analysis of the nourseothricin-resistance gene (*nat*) of *Streptomyces noursei*. *Gene*. 62, 209-217.
- 35 Kück, U. y Hoff, B., 2010. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 86, 51-62.
- 40 Kuo, C. Y., y otros, 2004. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and use of the *gpd* promoter for transformation in *Flammulina velutipes*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65, 593-9.
- Lazo, G. R., y otros, 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)*. 9, 963-7.
- 45 Liu, Y. G., Chen, Y., 2007. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *BioTechniques*. 43, 649-50, 652, 654 passim.
- Liu y otros, 2012, Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *RtGPD1* and development of genetic transformation method by dominant selection in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 10.1007/s00253-012-4223-9.
- 50 Liu, Y. G., Whittier, R. F., 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*. 25, 674-81.
- 55 Maehara, T., y otros, 2010. Improvement of the Transformation Efficiency of *Flammulina velutipes* Fv-1 Using the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene Promoter. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74, 2523-2525.
- 60 Maier, F. J., Schafer, W., 1999. Mutagenesis via insertional- or restriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biol Chem*. 380, 855-64.
- Meng, X., y otros, 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34, 1-5.
- 65 Meyer, V., 2008. Genetic engineering of filamentous fungi--Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*. 26, 177-185.

- Meyer, V., y otros, 2003. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet.* 43, 371-7.
- 5 Mogen, B.D., y otros, 1990. Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient messenger RNA 3'-end formation in plants. *Plant Cell*, 2: 1261-1272.
- Mogen, B.D., y otros, 1992. Several distinct types of sequence elements are required for efficient mRNA 3' end formation in a pea *rbcS* gene. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 5406-5414.
- 10 Nagaya, S., y otros, 2010. The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* Increases Gene Expression in Plant Cells. *Plant Cell Physiol*, 51: 328-332.
- 15 Neveu, B. y otros, 2007. Cloning of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Pseudozyma flocculosa* and functionality of its promoter in two *Pseudozyma* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, Kluwer Academic Publishers, vol. 92, no. 2, 245-255.
- 20 Neveu, B. y otros, 2007. The *Pseudozyma flocculosa* actin promoter allows the strong expression of a recombinant protein in the *Pseudozyma* species. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 74, no. 6, 1300-1307.
- 25 Newman, T.C., y otros, 1993. DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant Cell*, 5: 701-14.
- Ochman, H., y otros, 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.* 120, 621-3.
- 30 Ohme-Takagi, M., y otros, 1993. The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11811-5.
- Pfeifer, T. A., y otros, 1997. Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin (TM) resistance gene for use as a dominant selectable marker in Dipteran and Lepidopteran insect cell lines. *Gene.* 188, 183-190.
- 35 Punt, P. J., y otros, 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene.* 56, 117-124.
- Rosenzweig, K. E., y otros, 1997. Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clin Cancer Res.* 3, 1149-56.
- 40 Rothnie, H.M., y otros, 1994. The contribution of AAUAAA and the upstream element UUUGUA to the efficiency of mRNA 3'-end formation in plants. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*, 13: 2200-2210.
- Schulz, B., y otros, 1990. The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell.* 60, 295-306.
- 45 Scorer, C. A., y otros, 1994. Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High level Foreign Gene Expression. *Nature Biotechnology.* 12, 181-184.
- 50 Skalitzky, D. J., y otros, 2003. Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *J Med Chem.* 46, 210-3.
- 55 Smith, G. y Jackson, S., 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development.* 13, 916.
- Smith, T. L. y Leong, S. A., 1990. Isolation and characterization of a *Ustilago maydis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene. *Gene.* 93, 111-7.
- Soltani, J., y otros, *Agrobacterium-mediated transformation of non-plant organisms*. In: T. Tzfira, V. Citovsky, (Eds.), *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Springer press, New York, USA, 2008, pp. 649-675.
- 60 Spellig, T., y otros, 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.* 252, 503-9.
- Steiner, S. y Phillippsen P, 1994. Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Gen Genet* 242, 263-271.
- 65 Sweigard, J. A., y otros, 1998. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 11, 404-12.

5 Takeno, S., y otros, 2005. Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using Zeocin, and application to arachidonic acid production. *Journal of bioscience and bioengineering*. 100, 617-622.

10 Teichmann, B., y otros, 2010. Molecular characterization of the biocontrol activity of *Pseudozyma flocculosa*. *Phytopathology*. 100.

Tentori, L., y otros, 2002. Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res*. 45, 73-85.

15 Tully, M. y Gilbert, H. J., 1985. Transformation of *Rhodospiridium toruloides*. *Gene*. 36, 235-40.

Turgeon, B. G., y otros, 2010. Protoplast transformation of filamentous fungi. *Methods in molecular biology*. 638, 3-19.

20 van Attikum, H., y otros, 2001. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *Embo J*. 20, 6550-8.

van Attikum, H., y otros, 2003. The *Arabidopsis* AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucleic Acids Res*. 31, 4247-55.

25 Vega, J. M., y otros, 2008. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. *Plant cell reports*. 27, 297-305.

Veuger, S. J., y otros, 2003. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res*. 63, 6008-15.

Willmore, E., y otros, 2004. A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood*. 103, 4659-65.

30 Wu, S. y Letchworth, G. J., 2004. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*. 36, 152-155.

Wu, S., y otros, 2010a. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*. 101, 6124-9.

35 Wu, S., y otros, 2010b. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour Technol*.

40 Ye, X. y Gilbertson, L., use of multiple transformation enhancer sequences to improve plant transformation efficiency. EP Patent 2,038,420, 2009.

Zhao, X., y otros, 2010a. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol*.

45 Zhao, X., y otros, 2010b. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 37, 581-5.

Zhu, Z., y otros, 2012, A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Nature Communications*, 3, 1112.

50 Listado de Secuencias

<110> Temasek Life sciences Laboratory Limited

55 <120> Secuencias de polinucleótidos de *Rhodospiridium* y *Rhodotorula* y sus usos

<130> 2577-230

<150> US 61/782,832

60 <151> 2013-03-14

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

	<211> 1027	
	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091	
5	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación KpnI	
10	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1022)..(1027)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
15	<400> 1	
	ggtagcgtgc gagaagaagc gaggcacgcg aagcggtaga agcaatgaag cgaggcgaga	60
	gcgagagagg cagggttca gccatgtcca gctgatcggc tgtaacgtcg cgccgggcca	120
20	gtctgttgaa tttgttgcgt cgcctgagcg taatagaagt gcagtagtct actccgcatg	180
	ccgagaacgt cgaagagcgc gaagtaggga gtcgagggaa gcgaggggtgg caaacacagc	240
	aacgacaagc ggttccgctt cgctcaaaag ctcgttgacg ttgttttgac gttttgaaga	300
25	cagtacaaca gcagcaagag gcgtgcgaag cgttgggtggc gagagcagcg acaaggaggg	360
	aggaatgagg gagtgggtggc gagggtcgc aaacgggcgt acgcctcgaa tggagacgtg	420
	cgagtcgttc ttcgacgtcc gagggatgcc gagcgccgag acggagcacg caacgagcga	480
30	gaggagagca gccgcgcaag gtgattcgag tggcgcaagc ggaggacgac gaggagacgg	540
	acgagggagg aggagggatg gcgagcgagc atcgagcggc ggggcgcgag agacggcgtg	600
	aggagccggg tgtggagagt ttgaggaggc gcgggatgag aagtggctgg gtgtgaggag	660
35	tgagcgggtgg caaagagcgc acttagagtc tagagcgagg cagtagtagt agagctgtat	720
	gaatgaatac aaagtgtgaa tacaacagtt tgtaatgcga ttctgagctt ggacgtgtgc	780
	gcgcgagagg gcgacttgca agccagcgcc cgctcgctct tcttccttct gcacctcgcg	840
40	tcaaccctcg catctcacac ctacactcgc attcaaagtg cgtacactct cccacgacac	900
	acggggacgg cgcacaccac cgcgcgtcgc ttgaacggcg tcgccacttc gagccgtcac	960
	tgacttcgtc ctcgtcctcc ctcctctact ctcttgtagt gtactgtgta ctggggggga	1020
45	accatgg	1027
	<210> 2	
	<211> 956	
50	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091	
	<220>	
	<221> misc_característica	
55	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación KpnI	
	<220>	
	<221> misc_característica	
60	<222> (951)..(956)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
	<400> 2	
65		

ES 2 719 106 T3

	ggtacccatg ctgctgctgc cctcacaagg tcctctcgtc cacgtccgac gagtctggac	60
	agctttcaca gtcccagagag tgcaagagcg aggcgggctc acggttccgc aaaggagcgc	120
5	gaggtccgac cgccggccgg tctccttgcc cgcctcgcct cacctcctct tgcagcaggt	180
	tcacctcttc gaggtcactc gatcgctcgc agcgatgctc aggtacaagt acgctaggcg	240
	agagcgtcga aagcgggggtt ctgagagggg ctggacgctg cagagcgagg tcgagagagg	300
10	ctcgagtggc gctttgaccg ctcgacgcaa ggcattgcgt cctccgtttg agctcgcaga	360
	tactgccgtg cgaagacgag cataggctgt ggctgcggtg gcaaggagcc ggcgagagaa	420
	agctgtgctc gagcaggacg agagacggtc cgcgcgcttg agaaggctga ggtgaggcgt	480
15	cgcaaccggg ttggatctcg attctcggcg aactacggct tcggcgaggg ccaaagcgac	540
	ggcaggccgc gcaagctggc caggcgagag cgcgagagtc gcgagctgaa gcgggcgcgg	600
	ggtagagcaa gctggggaag cgagagaggg agagagagag agtgaggggg tggcgagggtg	660
20	gagacgaggc gagcgggttg cttgcgcgcg cgcgagaggg atcgaggcga gaggcgagcc	720
	ccgagagtgg aaggaaggac gaggaacact gcgtgcggag gcgccgcgcg cgcgtgccac	780
	ctggctgagc acggggccga gcttgaggga gctgggggcg cgcgagcgag acgagggcag	840
25	ggcgagcccg cgcgtggcgg ccgcctcgca acccaaggct cgccttgcc gccgtcttg	900
	ctctctttcc tccaccttcg cgtctcacca ctcgaatctc acttcatcca ccatgg	956
	<210> 3	
	<211> 1474	
30	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula graminis cepa WP1	
	<220>	
	<221> misc_característica	
35	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación KpnI	
	<220>	
	<221> misc_característica	
40	<222> (1469)..(1474)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
	<400> 3	
45	ggtacccaaa gggagaggag cgggcggagg atggtggtgc cggacagggc gagaggaag	60
	gtcgagggag agatgggagc gcgaaaggct gaggcgggga gaggaggggt ggggtcggga	120
50		
55		
60		
65		

ES 2 719 106 T3

ccaagggggc agagaggctc acaaggacgg aggagcttac tccgccttga ccttgcgggg 180
 ggcgggtggtg ccctcgcgga agctgcggcg cgaggaaggt cgtcagggcc gggcccaggg 240
 5 gaggaacgag gacggcgacg acgacgcacc cgttcttgaa gcggcgcgag acgcccttca 300
 ggtgctgcat gcggccagtg ccagtgggtg ggcggcgctt ggccttctgt cccactcgt 360
 ctgcgcggcg agggagaagg cgaggtgagc acgacggcg gcgagggccg gacgaggctg 420
 10 agagggggac gcacacgagc ggagcttggc cgcggggtag ccgcacgaag cgcacgactt 480
 gtgctgcttg tggaacgagc ggcggccgca gcgacggcac agactgtggg accacgaggg 540
 tcaaccgggt gctcgcgaga caggagcgcg gcttgtctcg aagcacgggc aaagagagcg 600
 15 ttggacgcac gtgtgactct tgggtgtggcg gagaccgaac gaggtggtac cttcgtctg 660
 tggggcgcaa ggaggagtgg gtcagcgctg ggcctcgagg cgcctgggtc gtcgacctcg 720
 cccgctccc atcctcgcgc cgtcctgctc ctctctctc caaccctgcg acgtgttgcg 780
 20 gcagcagcag cttgctggga catgtggga ggcgggcaag gcgaggggag gtcgaggtgc 840
 gaatgtgggt ggtcgcgctt ggcggggcag catgtcgtcg cgcctcgag ccgggcgggc 900
 gacctggtgg ccgggtcgag cgagaggcgt gggagggagt ggcgcaaag gcgtgcgctc 960
 25 agaggcgggt tgtcagggcg tcgagcgga cgaggtcgag gaggtcgagg tgggaagctg 1020
 ctgtgctgc tcgggctcg tcgccgctc ccgagtgcc cgtgcgcgcc cctgctgccg 1080
 ctcttgggc cgtcctggc ccacctgcc gtgccgtcct ccacgagagc gcgagtgagg 1140
 30 ctgtgcgcc ggttgcgctc caactttgcg agagagcgag gacgggggca tggctcgctc 1200
 gccggcctcg ggtcgttcga ggggtcggg gcgggttgcg ggagggtggt gcgaggtggc 1260
 gggcttacca ttgtcgcgtc ggagaggggg gtttggcctg cgagaagacg aggagacgag 1320
 35 aggccggggg aggcgagggc gcgagggcgc gagacggctc ggaccaagcg cgcgcccca 1380
 aagtctgcct cgcgcctcg gctcgcctc ctcttgctct ccacctctc ctaggaccac 1440
 aaaggcacc ttgtgtaggc gtaggtcacc atgg 1474

40

<210> 4

<211> 1327

<212> ADN

45 <213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(6)

50 <223> sitio de clonación KpnI

<220>

<221> misc_característica

<222> (1322)..(1327)

55 <223> sitio de clonación BspHI

<400> 4

60

65

ES 2 719 106 T3

	ggtacctgag cgggagagcc gcgagcgagg agcgttgagg aggaagggag ggagggagga	60
	gggagagggga gggagggggac ccccatcttt ctattcattc acaaagacga cggtagcgag	120
5	gggtccctcg agtgtttggg ctgggcttcg gagtctcgta gcgagcaagt agtgtttctc	180
	tccgtttcga cagctcgat tgtcatttct tgttcattgt cgtttccggc gactgcaggt	240
	acgctgattt tcggcgagga cgacaagcac gtgggttggt agcagcgagt tgagcaagaa	300
10	aaagcggacg aaggccctcg tcgggggctt caagtcaaga ttctgcgag attctgcgag	360
	agactgcaag cgttgaacct gttgagatct cgtcggacga cagcacagtg tccgtctcgc	420
	tcaatgcgat aggaagcgag agagaggagg aggatatcgg aggaaggcgt gtttgcgttc	480
15	gctccaggcg tcgcaagatc cggcgtagag cacaatcgtc gttggttcga cgtttgtagt	540
	tcgtcacgag tgagggcgaa gcctggcaag caaagaaggg gacgagcgac tcggcagcta	600
	tcgctggagg agggcgactt tgtggcccgt ttccgtcgag ctcgacgcga gtgagcgag	660
20	ggtcggtccg aaccgatgcc atggacgcag tgagcgaggc cggatgtgcg atgctgtttc	720
	aagcgagcga aggaagggag aaagcgagcg agaggtcctc ctctgtctt cctcacgcct	780
	tccaaggcc gacaagaggc gtagacgtcg acgagtcaac ggtttgacgt cgctcaggcc	840
25	tgtagcgggt cgtcggaagc tgggaaagag aggaaccaac gagtaacaag cgcgagagtc	900
	tcctcaaggc ggacaattgc ctgcgttcgg tcccggtcga gctcttccag taccagcgag	960
	ggcgaaagtc gtcgatgcgt gcgcatccaa ggccaagcgt cgcagtcgag aagagcgaga	1020
30	gtgaagcgag tgaagcggga gagtgcgagc gggtaatccg cgtacttacg agtggttgt	1080
	attccttctt gtaatggcag attacctcga ttggccacgt caggttccgg gagtgcggg	1140
	gcgtgggcaa aaggcgagc gcggcgctc tctctcttgc ttctcagca gagcagctct	1200
35	cccctcgagt acgtcgacgg gctcactaca gctagcaaca gcaaggctac cacgccagct	1260
	acacgccagc tcaccaact cacaccgctc gttgtcgccg cgcgccgag gaaaactttg	1320
	ttcagtc	1327
40	<210> 5	
	<211> 1509	
	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091	
45	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación KpnI	
50	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1504)..(1509)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
55	<400> 5	
60		
65		

ES 2 719 106 T3

	ggtaccgctc atcatcgagc gagggcagca gcgacctgcg gactggccga agaacttccc	60
	cggccagcgc ttcgaggaca aggacattcg cacgcctcgc tctcagtggc ggtacatcaa	120
5	gctggcgacc acagacgacc tctcgccgac tgaggagaac acgacgtcct gcgccgtccg	180
	gtacggcgag gactcgcagc tcgccatctt ccacgttccc ggcaaggggt acttctgcac	240
	gcagcagatg tgcctcgtg cgtcgcgcct gctctctctt tctttatttg ctggctgact	300
10	cgtgctgact cgcccgaaac ctcagacaag cgcgccttca tcctcgagca tggcatcgtc	360
	tcggacgacg ggagtggcca cctctacgtc tcctgcccgc tccacaagcg caacttccgc	420
	ctcgacaacg gcgactgcct caacgacgag gagtacaaga tcctcgcgtt tgatgtcaag	480
15	gaggagaacg gcgacttgct cgttcagggt cctccgcctg acgagctcga cgctttgatt	540
	gggtgctgct cgcttagccc tctctcaaag acctgagctg acccttctga ttgtccgcag	600
	ctcgtcgaag tggatgggtc gcaaagcgac cgccgaagcc ttcggtcgca acgcagcgac	660
20	agccatcgag tgcgtcccct ccaagcttct gttttccgcg cgcacactag gctgacgaca	720
	agtctctgca ggatcgtcgg accgtcaggc gaggttgacg aggacaagaa ggcagcggga	780
	acagagtgcg gcgaagcggg taagtcttgc gggacgcaca agctcgagtg gtgattcttg	840
25	cgggtccgctc acagccaatg tatctatctc tagatgtcct tctcgggtat atcagttggt	900
	cgtgcatcgt agacgtcgtt tagcagctct cgttcagcca cttgcgaagg cccgcttctt	960
	cgacgacaag gacggcttcg cttcctttac ctcgtcgtct gagcgttctc aagggaccct	1020
30	cctacgccct tcttcgcaca ggagcggcgg acgaggcagc cttgctggct tatcgtcgct	1080
	tccgcctttc atgctcgagc aagtcctcct gcgagtgtcc cgacgtcggc ccgccttgcc	1140
	caaggtcgcc gactgtccta tcgcgacact gcgaatgcac tgctgtccgc gccggagact	1200
35	gtgcggcgcg aattgagggc aaagtctgtc atttgcgaaa cggtatccgc tcgaagggcc	1260
	cacgatagac ctccaccggc ctcaaacttg gcgacagggg cgcttccgac ggcggacagc	1320
	aagttaggct ttggcgtcgt cgctgcgac cgctttgcgg gacccttat cgcgactgcc	1380
40	ggattcgatt ggcgatatct ctcgctcgct ggcctcgtg gacagctgga cagtctctgc	1440
	agcgtcgaag cgacgtcgat aaagtacgag acgtcctcgc gaaccaagaa gaatcacccg	1500
	ccgccatgg	1509
45	<210> 6	
	<211> 1606	
	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091	
50	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación SpeI	
55	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1601)..(1606)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
60	<400> 6	

ES 2 719 106 T3

actagtcgcc agggaaacgca gagaaggcgg gacgagcgag ggtgagtcgc gcaagtcgac 60
gaagaagccg aggtcaacgt cgaggggtgt caagttcttg cagacggaca gcagccacac 120
5 taatcgctgc cgacttctga tgcacgctgc cgcgggtgtc agctcctagc cgtggaagga 180
ggaagccagg acgttctcac cgggagcgac attgcttggt ccagacctcg aggcgagctt 240
gtcgcgtcga aagaccggcg acctcgctcg gctcaaattc cagcccaggt gattgccctg 300
10 acaacaaagg cgaaaagctg aagccggtac caaaggctcg tccatcgaaa gtcgcgctcc 360

gaagactggc gtcgacggat ctgaccatcg ctgcccctcc tgcgtctgct ttgaggcacc 420
ttacagcctg ctgctctcgt tcggagcctc cgcacccgct tggcaggacc acctcgcgac 480
15 cagtgccttc ccttgcatg gctcgccaag tcttgcatat tccggcgacg ttgagggaagg 540
cgcagggtggg gcaggagatg cggagcgttg tgaactgtcc gttgacgagg agtgcgagcg 600
aaagaagggc ggtggtgaga gagtaggtga ggtccttgag gaggagtcca ggaggaagtg 660
20 aggaagggc tgcgggtgac tggttaaggct gaagcatgat ggcgagtga gccaaagtat 720
ccgagcgacg atcaagagac gaaggacgag acaacgcttc agcgcgcgaa gagagcgagc 780
gaggaccttc ctggtcgaga ggctatccag tcgccaaccg gtacctatcc agtttgagc 840
25 gttgaaacac agctgagagg atcagcgagt ggtagcgcaa actcctaagg cgctgaacgt 900
caaggacagc gagcgtgagc gtgtggaagc gacttgcgaa ggccaaactc gtgtcgcgct 960
ggccaaaccg cgtgcccgtt tgacgcgctt ctgcccctc cgcctattca gagagtatgc 1020
30 ttcgtcacgg cgtgggcgcc aacatcgcg caggagctgg cgggacggga agaaagccgc 1080
aaccgcggtc ctgcaccttc aacgtcccgg gaggcccgtc cagactccc agacgtctct 1140
gcttgttgtt ctacgtcgtc gcggcgttgt gcagagtcca gcgcgcgcc gtcgtcgact 1200
35 tctgacaagc gataaattcc gagaccagcg ggagaaggcg gaacgagagg aggaggcgag 1260
ctggcgctct tgcgacctcg ttgagcagtt caagcgagca gattgagcag cagtgcgtcg 1320
agtgaagcaa ctcacgttct catatcggtc cctgagcgat atcgatgagg cgaaggacga 1380
40 cgacgagcga actgatctcg cgctctccct ctccccctc actctttcca ctcaaaaaca 1440
acacgtgctt cttctctgaa cgctatcaga caatccagga ccatcgctga ccgcgcgctc 1500
actcgtcgcc tgacttcac gcccaaccaa cccgctcgtc accgactgga tctctccctc 1560
45 ccctcacacc acctgttgcg ctgcgatact cctctcacag ccatgg 1606

<210> 7

<211> 1408

<212> ADN

50 <213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(6)

55 <223> sitio de clonación spel

<220>

<221> misc_característica

<222> (1403)..(1408)

60 <223> sitio de clonación BamHI

<400> 7

65

ES 2 719 106 T3

	actagtcggc gaagaggagg ggtgttagga gggagagctg tgcgaggggg agaggtcagt	60
	ccgagcacga tacgagagca ggccaagcgg cttcatgttc actccaagct cgatgcggtc	120
5	gagaagtacg agctccttga cgagtgaaag ggagagaaga gagactcacc aaccccgcg	180
	cgaccttcac gaaccgcaac ttcccctcac acgcctcact acacgccctc tcaaacacct	240
	cgagcgtcgc gtagtgagag agcttgaaga ataggtaggc gaggaaggag gaggcgaaga	300
10	gggcggccat ctagcgaaca agttgggtta gctgggtggg ggaaaggga gaggggagga	360
	agagggggag ggtaccatga tccagcctat gtcgacttgc agttggaggg gcatcctgtg	420
	cgcgtactgg cgtcagcggc ggacgacaag gcaggtagac gagagagggg gccggggaac	480
15	gcactcgcag ttgcgacgt ccgagaggaa catgtacgag tagccggccc acatgacgt	540
	cagcagcgcc gcaagcgtgt agtgaagat gagcctgccc attggcagtc agcggcgacg	600
	cggacaaact ctgggtgaag agaaaggaga gaacgcacca cttctcctcc ttcagcactc	660
20	ccctcgccca gaccgcccc aacacaatac agacgagatc gatagttgcc ccagtcacag	720
	cgagcgcgag ttggctgtag acgaggtgtt tgagccgtct gtgggcggga gaggtgcgga	780
	tgcgctggat ctgcgcgagg gagagtttt ggacgaagtt ggggtcgtcg gccatggtga	840
25	gcccgtcgta gtagctgtct gagcgcgct agtagtgcg tggacgagca gagcccagag	900
	tcgagacgag cgtgagcagg agacgaggtt cggagtgtcc gcggagggcg acgagacgac	960
	gagcgcgctt gggagaagcg cgagcatgtc cagcagcgta gtctcgaggc cgccagcagt	1020
30	agtagagcac agcaatgagg caggaaggag cgcaaggag ggaaagagcg cgacgaagg	1080
	tcgaggtgat gaagtccaag gacaggggga ccaccctcgc ccgcttctcc ctgctctcc	1140
	ccacgaagtg accacttgta aggctggtta ttcatccat acagtctaca tacacttgca	1200
35	gccatccgct tcccctgcga tgccagtgtt ggtcaccgtg ggactccgat gcgatgatgc	1260
	ggccgagttg gcttcctcga cccgctctca cagctcata ccagcctctc ccagcctgct	1320
	accgctctct ggctctgcca aacaccact cgagcacacc caccacaacca gcgaactcgc	1380
40	ccagcctttg aaccgcaatg gcggatcc	1408

<210> 8

<211> 1480

<212> ADN

45 <213> Rhodotorula graminis cepa WP1

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(6)

50 <223> sitio de clonación Spel

<220>

<221> misc_característica

<222> (1475)..(1480)

55 <223> sitio de clonación NcoI

<400> 8

60

65

ES 2 719 106 T3

	actagtcgtg cagaaggaac ccgaggaggt cagtgcgcgg tcgagagagg aaaaggagag	60
	agagacgcac cgagcgaggc attgcgcgtg ccagcgctca gcctgtacct cgcgactgct	120
5	gatgaaagcg tcgtcgccgc ccgacatgac cgccgcctcg ctcgactggt cgccgacgac	180
	gtcgacgccg gaaggaggtg cgcgccagcc gcaggcggcg cgcctcaggc tcacgtcgac	240
	gtgccggacg ttcgacgctc gccacgggtc gtgctcgagg gctttgacga cgagctcgtc	300
10	gcgctcggcg ctgccgcacc cattggcgaa cgtgacgtcc tggccgagca cctcctgcgc	360
	gatggcgcgc cacaggcggc agacggacgc gacctggcgg taggcgcacg tgcgacaggt	420
15	gaccgtgagg tgcgcaaact ggccgtggac gaggagaggc tcagagatga gcgaggtcgt	480
	gagggcggtg cggtatgacct tgaggaggag ctcgtcgccg acggcagaga gggtcggcat	540
	gatggtgtgc ggcgcggtcg gcagtctcga gagagatgtg tagaggaaga acgatgtcgc	600
20	cagatcggtc gagcaggagc cggtgcgagg cggctcgagg accgtcgcgg tcgaggaccg	660
	gtcacggctg gacgatcgag gagacgcgcc cccgtcgagc gcagcggcca gacgcaagcg	720
	agcacccttg aggctgtact ccaaaacccg gagcgccggc tcgggagccg tgcctcgcga	780
25	ggatcctcgg tcgacagcgc cgagtcggag agggccagcc gacctcgggc cgcccgacgc	840
	ccggccgcag ctcctccggt ccgacctgca gtcaccca gcagatcgac ttgagagcg	900
	aagccccag gaagctgcct gagcgacctc gaggcttggg aaggctcgcc agccacggct	960
	gggagagcga gctccctcac agtcgagacc ggctccaagt cgaatcgac actcgtagct	1020
30	gcaccgcaaa agtgtgtgca gagctggagc gagcgaccgc gcgaggcgcg agggtcgcga	1080
	gaaagcgggc gagcgggtgc agtgcgcccg agacgccgag agagggcgcg agggcgagcg	1140
	ggcctcgcga gccctctgga gcgtgcagag gcggcgggga ggagcagagt gagggaggga	1200
35	agaccctcca gagctggcag gagccaacgg agcgcggaat tcagtgagat cgatgcggtt	1260
	ctcgagacga ttcgaccgcc ctcgtcgtca acgtcgccg ctcgtccctc tcctcttccc	1320
	accacctctc cggtacctct acacgagtgc gttctgtccc gagatctgat ctcgacgccg	1380
40	cacggcactg actgaccgcc cacctcgtct cctcgccccg tcccacactc tcccttccga	1440
	cctccacact cctcgctcaa cccctctcgc ctcgccatgg	1480

45 <210> 9
 <211> 1532
 <212> ADN
 <213> Rhodotorula graminis cepa WP1

50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de clonación Spel

55 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1527)..(1532)
 <223> sitio de clonación NcoI

60 <400> 9

65

ES 2 719 106 T3

	actagtcggg aggattgatg atcgggttgc ggtacaaggc gaggccgagg acgagctgga	60
	gggcgcccag gacgaggggc gagatgccga gctgcgaggg gacgagggccg ccaatcgagg	120
5	tcgtgtcaga cggccgtacc gagtgatctc atagcgggtc cgccgacgca gaaagacgaa	180
	gagaaactca cgacgagggg gctcagcttg acaaagtga gctttgtcgt gcagccagac	240
	gagctgcgat aggagcgagg gtcagtgcgc ccgctctcgg atgaatgcgc agtcgaggag	300
10	ggacaggggc gcaccaggtg acgatgaaca tgtcgaggac gccgtactgc agcatcttgc	360
	ggaagaggta gaaatgccac gccgaagcga aggtgacggc aaactgcgag agggacgagg	420
	tcagtgcgag ggtccgcaac agggagaggg cactcgtcac ggaccatcat ccagcccagg	480
15	tcgatctgta gctgatcagg gaagctgtgc cgggtgcgag agaggccaat gtcgaagctt	540
	ggcagctcgt cgaggaagaa gaggacggcg agggacgcac gccatgaact tgatgtgacg	600
	ctcgaagacg accgagtagc cgagccacat cattgtgagg acgccggcgc agacgtagt	660
20	gaagatgaac ctgagagggc aagaggtcag tctcgaacg agggaggaag ccggctcgag	720
	caggacgagg cgggcgcaac ggacgcacca tttctcggcg gcgacgatat tgcgagcca	780
	cacggccccc agcactagac aggtgatgtt ggcgaccgcg ccgccgacgg cgagagcgag	840
25	aacgctgtag acgaagtgtg tgatgcgtcg gtggattggc gctcgtcggg tcctcgcgat	900
	ctgggccttg gtgagcgggtg gtggcggggc aagcgggtgg ccagcagctg tgctcatcgc	960
	agcagcgggtg cggcgcaaga gcgactgtgg agctcgaggg agaggagcgc ggcaggggaa	1020
30	agcgagaccg agggaggagc agcgcggaaca ggcgagggcg accggacgtt ccggtgcggc	1080
	tcgactggcg tgcgagacga gcaggccgtc gccggaagca gccgtgtccg gcggaaagag	1140
	ccaggcgcgcg gagcggggcg gagcagacag cggcgggtccg agcgcgcggg gcaggttcga	1200
35	cgaaagtcgg gctcgggtca ggctcgcgcg agcgcatgag atgccgtcga gcgagcccat	1260
	gtacagagtc gagcgagaga gcgaagtgcg tgggaaggaga gtggtccaag agtggagcgc	1320
	cgtggagatg agacagatga tggcgaaact cggccacagc ctctcgggtcc tgccacagca	1380
40	gctctgtgag tctccctgac ccgccagccc gcgcttcaga actcacagac cacctacaca	1440
	gactcgcgca ccagctcgaa ccgcgccaga ccaccgcctc gccgcctccc cacctcgact	1500
	gcttccgaac ctcaaaagct cgaccaccat gg	1532
45	<210> 10	
	<211> 1222	
	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula graminis cepa WP1	
50	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación KpnI	
55	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1217)..(1222)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
60	<400> 10	
65		

ES 2 719 106 T3

	gggtaccgcga ggggaagggc aggagagtcg ccggaacacc gggcaaggag acaaggacaa	60
	agagcgagcg cgcacgcacc gtctggcggg cgggctgggt ggggcgggtc cgagtagcgc	120
5	tgaccgaaga gcgaggagga ggaaaagcga gcgcggcggg cgtgggaagg agggcaagga	180
	gggcggcggc gacgccaaaa aaggccagat tcgcggggca gtgatcgagt gccgtccgcg	240
	agctcaacca gcgagcgctc tctcgcgcgc agcgggtgcgc ttctttcgcc agccgatgcg	300
10	caccgttcag aagcacgtcg cccgcaccga gagcgctcc tcgcgagcct gtgaccacct	360
	cgtcgacccg cttcccgcgg cttttctcgc cggcctggac cgccgctatc agatcgtgcc	420
	catgagacaa gcgactcgtc gaaaggacga cgatctcgta gtactgggtc cctgcgcaac	480
15	gctcagccgt ccgtccccgt caaagtgtct cggcggaggg gaccgtgcgc gagacgcca	540
	agttggcctc ctcaagtcgg tagatccagc ttaacgctat caaggggtgc atggtgtagt	600
	tggtcatcac gtcagtttaa cattcagttc actgaaggtc ctcagttcaa acctgggtgc	660
20	gatcaccttt ttggctcggc ggcattgcgc ccttacaccc gcacgggtct acttcccttt	720
	gcaagcgacc aagcgaagca tcctctcgtc cgtaaagctg ccggcgagga ggtcagacgg	780
	gttgcgggc cgtcgaaggt cggctcacc tcaacgctgc cggctgacca cgccaggcga	840
25	gctatcattg ctttgaaagc ttcgaaaacg cccaggcatg cacagaaagc cgcccgag	900
	aggctcaagt tggcgccgag ctgcggtcga gagacgacga cgacgtggga gctccctcgc	960
	ctctctctct ttctctccca cccatcagc ccaagtgagt cgctcgtct tccgcaagg	1020
30	tcagcgacg cgttgctccg cgacagggca gcgcgtgcgc tcaccagggt cccccgttcg	1080
	ccggcgaggt tggcactgac gaggtgcctt gccccctcc gctcccctcc cttttggcct	1140
	cctctctcgc acgcacactc tctccctgca ccccttgca cttcccgaca ctctcccccc	1200
35	ccttcccacc gtccgacat gg	1222

<210> 11
 <211> 1507
 <212> ADN
 <213> Rhodotorula graminis cepa WP1

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de clonación KpnI

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1522)..(1527)
 <223> sitio de clonación NcoI

<400> 11

55

60

65

ES 2 719 106 T3

	ggtaccacta cctcgtcacg acccaggggtg cgttccccctt ctcgcccggt ccacagccac	60
	gacgttgcca gtcctaacg cgtccgctcc cccgtgcagg tggctctccg cacggcgctt	120
5	acacgcagac atcgtcgacg ccgtcgacg acgcccactt tgccgtccag accctgtcgc	180
	gcttcggcct cgcgtacctc ctcgcgtcgt ccaacacgct caaggacacg tggctgagcg	240
	tgtgcgcgcc cggcggcgcc aaggggccccg aaccgcagct cgacgacctc gagctcgaga	300
10	agcgcgagca ccgcgacaag tggctcctcg ggcgcacatc gggccagggc aagcaggact	360
	cggcgctcgg ggacgcagtc gctgtcgtga gtcctctact ctcggccggt ctcgagactt	420
	gggtgtcgag attgaccttg cgctccccgc tctcgcttgc agcaattcca caagcacttt	480
15	ccgcacctgc gctcggcgca cctcttcccc ggctttgtct ttacgtgcgt ccctctcgtt	540
	ccccctctc tccacgtgcg ccaccagcct gactcgcccc tcgcctgccc cgtcccgag	600
	caacgccctc gcgtcgacct cgctcgctcc ctcgccgacg ctgtcgctgt acaacctcgt	660
20	cgggccccctc gcggcgcgca tcctgccctt tggcaacctg cccgagacgt acgccgacgt	720
	gcccgtgtac gtcgcggcca acccggcagc gcgcagccaa gggctcgagt actgcaacga	780
	gcgcataaag ccgctcggga gcccggcggt ggcgcagggc gcgacgggcg caaaggtgtg	840
25	ggacgggctg agggccatga tcgaggagtg agctgggtgg cgggcgagcg aggagccgga	900
	gaggaggggc ggaacgtgtt tgagaaggct gcgctttgct cgtcggtcgc gggcgagcc	960
	gtggctgtag ccagtctcgc ttgtcagtggt cactcttgta catagctgag caaggcctag	1020
30	cgctcgcgaga gagctgcgct gtggcgcttg gtcgagggcc gagagcgtcg cgctcagggg	1080
	cgagctgctc gcggctcacc aagggggctcg agcgggtgcgc gctcgacagg ggaccgagag	1140
	ctgcaggaga cagaccggag gaaaaagctc tggcgagcga ggagcggggc cacactgagt	1200
35	ctggggaagc gacggacgag gatgagcgca tccactcttg agtttcgccg aggcgcgagc	1260
	tggcggtcga caaccgagca agctcctcct cttcctccac cacactcgcc cctagcacac	1320
	gtgagtgctc ctcctcgcg actgtcgacc agcacacgct cgtccaccgc cctgtgcgcc	1380
40	ctgtgcggct tgcggctcag cgaggccgcg ggtcgggtct ctgccacccg aggaaccatc	1440
	gatgtcgctg acgcttcgct cctcgtcctc ctcctcctcc caccgcgcgc agctacctac	1500
	accatgg	1507
45	<210> 12	
	<211> 1646	
	<212> ADN	
	<213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091	
50	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación ASCI	
55	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1641)..(1646)	
	<223> sitio de clonación Ncol	
60	<400> 12	
65		

ES 2 719 106 T3

5 ggcgcgcctg aagctgtaca tcgaggtgga cgacagcgcg ggcaaggatg cgccagcaat 60
 cgtttgtggg tcgcttcttt cctcgagca cgcttttgtc ggctccctga tcagcacaca 120
 agctaactaa cgctctgggt tcgctggcag tcatgcacgg ccttggctcg tcaacctcgt 180
 tctgggaagc gcccttctcc cgctcaaacc tgtcctcccg cttccgcctc atccgctacg 240
 acttcgacgg ccacgggtctc tcgcccgtct cgtccctcga cgcagcagat gacggcgcca 300
 10 tgatcccgtc cgacgacctc gtcggggact tggcggctgt gatcgagtgg gctgggggtg 360
 agaaggttgc gggagttggt ggacactcga tgagcgggct ggtggcgagc acatttgcgg 420
 ccaagtaccg gcagaagctc gacaagctcg gtgagtcgca ttgaaccttc ctccgccgtc 480
 15 tcttctccgc tgacgattcg tcgacttggc cctgcttctc gcgcagtcct cctcggcgca 540
 atgcgtctc tgaaccttac cgtccaaagc aacatgctca agcagagccga tacagtcctc 600
 gaatccggcc tctcagcaat cgtcgacaa gtcgtctccg ccgctttgtc cgacaagtca 660
 20 aagcaggact cgccctctc ggcagcgatg gtgcgaacgc tcgtgcttgg aacggaccgg 720
 agaggttacg cggcggcggt tagggcgctt gcgggtgcga aggaccgga ttactcgagc 780
 atcaaggccg agacgttggg tgcgttcgtt tgttctctt cctctgcttt tctccagca 840
 25 actgacgcaa gcgtctgcaa cacagtcgtc gcaggcgagt ttgactacct ctcgaacaag 900
 gagacgaccg acgcgtggt caacgacatc ccgggcgcgg agaaggtcca gatggacagt 960
 gtcggccact ggcacgccgt cgaggacccc gttggactcg ccaagatcct cgatgggttc 1020
 30 ttcttgcagg ggaaatgagg ttgggaaggg gggatagact ggggagaacg gcagggtgct 1080
 acgcagcgga cgtcggtcgg gaggactttt tcggggagga tattcgctga ctgactccga 1140
 cgtcgtttc ctcttgcag tatcttcaga agggatggga ggaggcgaac tgcaagggtg 1200
 35 atgaacgaga caacgccgag ggaggaagcg ccggaactct cggggcgaa gaaggagtgg 1260
 tgtcttcgcc agcgaacagc ttccggggtg ggttggacag cgccagtaga attccagcgt 1320
 cgcaacagag ctctagtcga ccgcgacac ccacaaggac gagagcgggt cgcgccttgt 1380
 40 ccgcttcccc atctctgtcc tgctcttgt ctcttcccta ccacactctc ccgcttgcgg 1440
 gctctctttc tcgcttggcg ctctgtctac cgctactcta gactctcta gtctccctgc 1500
 acaaccatcc ctatccctc cgcctctctc gcacaccccc cacagcttcg ttccccaact 1560
 45 tcacttccga tgccgtgctg cgcctccctt tcgcttggcg ggcccgcgcc tgcttccgag 1620
 gacaactact gattgtggga ccatgg 1646

50 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Cebador del PCR

<400> 13
 aaaggtaccg tgcgagaaga agcgaggc 28

60 <210> 14
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Cebador del PCR

<400> 14
 aaaccatggt tccccccag tacacagta agta 34

 5 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador del PCR

 <400> 15
 aaaggtaccc atgctgctgc tgcccctca 29

 15 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador del PCR

 <400> 16
 ataccatggt ggaatgaagt agattcgagt g 31
 25
 <210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador del PCR

 <400> 17
 aaaggtaccc aaaggagag gagcgggag 29
 35
 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador del PCR

 45 <400> 18
 aaaccatggt gacctagcc tacacaagg tgc 33

 <210> 19
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador del PCR
 55
 <400> 19
 aaaggtacct gagcgggag gccgcgag 28

 <210> 20
 60 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Cebador del PCR

	<400> 20 aatcatgac tgaacaaagt ttctctgagg cgc	33
5	<210> 21 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Cebador del PCR	
	<400> 21 aaaggtaccg ctcatcatcg agcgagggca g	31
15	<210> 22 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Cebador del PCR	
25	<400> 22 aaaccatggc ggcgggtgat tcttcttggc tc	32
30	<210> 23 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Cebador del PCR	
	<400> 23 gactagtcgc caggaacgc agagaagg	28
40	<210> 24 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Cebador del PCR	
	<400> 24 aaaccatggc tgtgagagga gtatcgag	29
50	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Cebador del PCR	
	<400> 25 gactagtcgc cgaagaggag ggggtttagg	30
60	<210> 26 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> Cebador del PCR	

<400> 26
 aaaggatccg ccattgcggt tcaaaggctg ggcg 34

 5 <210> 27
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador del PCR

 <400> 27
 gactagtcgt gcagaaggaa cccgaggag 29

 15 <210> 28
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Cebador del PCR

 <400> 28
 aaaccatggc gaggcgagag ggggtgag 28

 25 <210> 29
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Cebador del PCR

 <400> 29
 gactagtcgg gaggattgat gatcgggttg c 31

 <210> 30
 <211> 26
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador del PCR

 45 <400> 30
 aaaccatggt ggtcgagctt gtgagg 26

 <210> 31
 <211> 33
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador del PCR

 55 <400> 31
 aaaggtaccg cgaggggaag ggcaggagag tcg 33

 <210> 32
 60 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Cebador del PCR

<400> 32
 aaaccatggt cggacggtgg gaaggggggg ga 32

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

10 <220>
 <223> Cebador del PCR

<400> 33
 aaaggtacca ctacctcgtc acgaccagg gtg 33

15 <210> 34
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador del PCR

<400> 34
 aaaccatggt gtaggtagct gcggcgggt 29

25 <210> 35
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador del PCR

<400> 35
 aaaggcgcgc ctgaagctgt acatcgaggt ggac 34

35 <210> 36
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Cebador del PCR

45 <400> 36
 aaaccatggt ccacaaatca gtagttgtcc tcggaag 37

50 <210> 37
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> ustilago maydis

<220>
 <221> misc_característica
 55 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de clonación KpnI

<220>
 <221> misc_característica
 60 <222> (667)..(672)
 <223> sitio de clonación NcoI

<400> 37

65

ES 2 719 106 T3

	ggtagcggcg cgctagtcct taaaactgaa ggtagggaaac gacaatctga tccaagctca	60
	agctaagctc tagtgattag atcttgctga taggcagggt tgcttgaggaga atgggggggaa	120
5	aagactgacc gaagaaacag cgagatctag aagtgataag cggaaagaat ctgacttgct	180
	gtgatcagca gccaatTTTT ttttcgtttt ttttttttca ctccacatcg tcgtgcgtgc	240
	acggtctgca tgtgtaaatt gtattcatcg aaagccacag ttgaatacat cagcccgatg	300
10	tggatttcga aaaccaatta atcttggaat tcacgcgctc agatcagtc atagagtcga	360
	cttcggctgt ttccaagagc ttcttctctg cgagggtggt gcccggtgtt ctcgctggga	420
15	aaaaaggatc gattattatt cgcttctacc tcgctcgac ccttggcctg ctgaaggaaa	480
	cagcgccgag actcggtcac ggttgctggg ctccgtgttg atgctgggac ggcgcaaagt	540
	ggggcccgcg cactcttcga gccaaaggacc tcactcttca agaacaagcg ctgtcgccat	600
20	cgtcttcttc tttctgctcc accatcgaat ctttctttct cgtttcgaaa ccaaaacact	660
	cttccaccat gg	672

25 <210> 38
 <211> 1450
 <212> ADN
 <213> Rhodosporidium toruloides

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de clonación KpnI

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1445)..(1450)
 <223> sitio de clonación NcoI

40 <400> 38

45

50

55

60

65

	ggtagcggcg cgtagtctg cagaactacg ccctctcaca cccaacttcc gactcgaccg	60
	gcggtacgag cagcactac ttctactgcc tgccatcgac atccgggcgg gtcgctgcct	120
5	accctgtgcg ttctgcgccc tccctcgtct cgggaggcag tgtctgacag aagctttgcg	180
	cgcagtaccc cgtcaagatg caactctacg caacgttcgg cacagaagtc gccaagctcc	240
	gcgcacgcgc gcctcaagct ctcgcgctgc ccgacgggtgt cgtctattac gaggcggaga	300
10	agctcgagtt gccggccttg ccagcggcgg tcaagggtga ggtggagacg gagaaggcgg	360
	gagtagcggg ggaggacaat gaggcgaagg gtgagatggt gctggaggag actcttacgg	420
	tggagcagga ggagattgaa ttgggctcgg gagtcgtgca gattgaggag tcgttgctcg	480
15	tcaagctgga ggtcagcggc tgatccttcc gttcgttgca aggatcgtct gcatgtttcg	540
	cttctctcaa tgacacaacc tggagagcgc tcccgtcagc gagaatcgag gacattccgc	600
	agctcgtgag caagcggagg tgcgaggctc cctcgaaagc tgcgcctctt cagacggctt	660
20	gttctctcct gctctggtgg gctggcctga catgtaatgt gctccgccgc aagtcgcgtcg	720
	tcggtctcaa ttcgacgttg aaagggcata gcgcaaggaa gaaccctctg cggacatgca	780
	gaattactgg ctcgcctgct ccttcgtcta ctggaataag tcctgtctcg ttaaagcccc	840
25	aacgtcgttt ttcgacgttt gtaaggcgca agagggtgta tgggctacgc aggaagctga	900
	gaggacatag aagtcggggg aggaacggcg cagagcggca gttgcggaag catgaggaaa	960
	gcgagacggt ccagcatctg cagcgccaat ccgcaatctc ctggttgagc ctgcaccgga	1020
30	agcgtcggaa cagtatgcgc agagtcgaac gcaagtaaga aagacgcacc ctacactcg	1080
	cttacttcga gccatacaac ggatcaaagc tgcgcgtatc tcggcttgta agggccggaa	1140
	agcaacctcg gagatggaca cgtcacatca ccaacttatc gatctcggcc gtcgacgtcg	1200
35	cagagagggc gagagaagcg gtgaaggagg gaaacaacc ctcgagagca tgatccgacc	1260
	gaatctgcag cgaggaagc cgttacaagc ccgcctcgag cgcaggctcg gtccagccgg	1320
	gggacgaaac gcgcgaggct gattcgtgag cgaaggaagc cgcacgcaca agttcgtcc	1380
40	cctttgccct ctttcccatc acccgttctc gccttaccg ctcagaacaa caccagatca	1440
	ctcaccatgg	1450
45	<210> 39 <211> 963 <212> ADN <213> Rhodotorula graminis cepa WP1	
50	<220> <221> misc_característica <222> (1)..(6) <223> sitio de clonación AscI	
55	<220> <221> misc_característica <222> (958)..(963) <223> sitio de clonación NcoI	
60	<400> 39	

ES 2 719 106 T3

	ggcgcgccta cgtctacgtc aagggcaatg cgcacgtgac caaggccatc ggccaggacc	60
	tcgccttctt ctcggtccct gtcgagctcg gcgtgcgtcc cgccgctctc tctctctctt	120
5	tctctcggcc gcgcctcacg tgatccacga cgtcgtactg acccttgca atgtgcgcgc	180
	ccgcagccca acggcgtcga gaaggtgcac ccgctcggcg acctgacggc gttcgagaag	240
	gagctcctcg aggcgtgcct cggcgagctg cccgggtcca tctccaaggg cgagtcgttc	300
10	atccagggtc ccaagctctg actcgccggc gcatcgacgg gcgcgagcca caaggcgagg	360
	atgtgagagg aggcgtttcc tccaccttgg accccatctg ccgcctccct ttctctctct	420
	ttctttccct tctctctctt ctctctctct ctcgttctcc tccttctggg cctctcggac	480
15	ctcttcctcg ccgtcgactc gtgaaaatgc agtgcgcgtt tctgtacctt gtcctgcgag	540
	agagatctgg ttctgcgagg gtgagtcgtt gccttgggcg tggcacgcct cgccgcagcg	600
	agagagaaga ggccacggtc caggacgacg acgacgagga ggaagcgcaa aaggcgagac	660
20	accgagtgcc atcgattccc cgctcgaacc tgctcacggc tgctgaaggc ggtgcgccac	720
	ggtgcttgcg ggagcgaaag caagctggcg tcgtcctctt gaactggttc gagtccgtga	780
	gggcggcgac gagaactcag gcgaggtgct cgcgtcggaa caagccgggc ttgtggtcga	840
25	gggagcgaga gcgaggcagc gccgtcgtcg ccgaggcaag agcggcatcg acaagtggc	900
	ccgtcgccctc tcgtccctc ttctcctcct cccaccacca cttttctcca gctcgaacca	960
	tgg	963
30	<210> 40 <211> 2148 <212> ADN <213> Rhodotorula glutinis ATCC 204091	
35	<220> <221> misc_característica <222> (1)..(6) <223> sitio de clonación AscI	
40	<220> <221> misc_característica <222> (2143)..(2148) <223> sitio de clonación NcoI	
45	<400> 40	
50		
55		
60		
65		

ES 2 719 106 T3

	ggcgcgccac catctcctcg tcgcttcttc cctctccttc ggcgcccaca ccgcttcgca	60
	gggctcacgg actgctcaca tcgtttgtgt gcgtcgctgt gcatgtccac gcaccactcc	120
5	cagccccac gagcgccctca aaagacgcgg acgcagacgc ccgccgaacg acggcacgcc	180
	cctctttctca ctacgcgcac gaaccagctg cgacgattcg tgcgcttatg ttagccggac	240
	ttctggcttg ctttgcgctg ctgcgtccgt cttgtgggtg ggatcggctc gatgggggtt	300
10	tgctcgtttg ctgggagacg gtcgcctctc cctcctcctc ttcactcctc gttagctttc	360
	tacgctcatt ggttctgcga accatctaca tcacgctcgc tcgtcatgct cgtactacga	420
	tcaacacccc tgctcgctgt gctttccctc ctctccgtcc tctcggccgc gtccagcgac	480
15	ttgccagacc aacttcccc gcacgccggt gagtctccca cacttccttg cgacccaac	540
	ccagcatctg acatccgcat cacgcagccc tcccgccttc ccactcctcc ctcttcaccg	600
	actcctcctc ctctccctt gattcctcgt cctcaaagc cccgcagcct cttcccttca	660
20	aaatcaagcg cccccgctcg ctcgaacaag tgcagcagaa cctcgggaag aggctggcga	720
	agcgcggcga ggaggggagt aagacggaga ggggtccgtt tggtcagagg agtgcgacgg	780
	cggcgagtgc ggggtggacaa ggtggagcgg ggacggggag ggcgacgcag cgcgttacgg	840
25	gcggaggaag cagaggtgca ggaggaggcg gagggagtgt cgcggctgct cagcctgtcc	900
	cttcgactac ccagacggtc gagacaggct ctaagatcgt ctcgactggt cttctgaccg	960
	tagcgtcgcc gtcgacggca gatggaggag gcgggacggt caccaggtc gagacggcct	1020
30	cctcaggggt attgatcacc agcacggcgg gagcggcgag ttcagcggcg gcgtcggacg	1080
	tcgctagcgc acaggcagcg gaggcgacgt cgagtacgag catgatcagc ggaggagcgg	1140
	cggctggcgg gagtttaagc aggatgctgg cgggaggagt tgcgggtgca gccctgatcc	1200
35	tcctcgtgcg gtgagcaggc gaagcgagga gctcatgtag atacagcata gacagtatat	1260
	atcgccagga tagcttgcaa cagccgccgg tcgggtttatt ccattgtcct cgaccccatg	1320
	cgaaggcgag ctctgctcgt cagctggcca agctggccag cagacgagcg ttggggtggc	1380
40	ggaacgccaa cggcatggag taaagcagcc gtgaggatga cggaggagct cggcgagggt	1440
	gatggggatt ctacaggaa cagcagacgc gcgaggagga gaggaaccgg aagcacagtc	1500
	tcgtggccgc ttgttgaga tcccagtgtc gctagagtgc tcgtcgtcat cagagcgagt	1560
45	gaacaaagcg atgccctgaa gaacgatgag cgaatgagtc gaagcggcgt ctaccggtga	1620
	actcgggggtg tggcaaatga gcgagacgag gagtggccgc cagagttgcc acgtcgaccc	1680
	cacgtcgga tgcagcttga tagagtgaac gaagccattg cagaccccag aaggtggcca	1740
50	tggtgtggaa gcgagggcag gagcgagggg agaaggcgag gaggaggagg ggctggggaa	1800
	gcccgtccgg gaatggcgca gctgggtgcc ggggatgtgc gcgagtggcg gaggagtcga	1860
	gcgtgagagt tctggaacac ggggcgcgca caagggtcga gggccgtgac gagttcgccg	1920
55	ggcgggtggc gggctgaggg cgagcgcgcg ttggggacga cgacgccga cgccctcgct	1980
	cttcgtcctc accgcttccc ggagaacttt gctgtactct gcttctcctc tcacactctc	2040
	acacccactc acacaccctt ccattccacac acaagctatc cgcacacctc tcacaccga	2100
60	ccccagctcg ccccatcctc ttcgcacccg gctcatcgaa aaccatgg	2148

ES 2 719 106 T3

	<210> 41	
	<211> 1009	
	<212> ADN	
	<213> Sporobolomyces roseus	
5	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1)..(6)	
	<223> sitio de clonación Ascl	
10	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1004)..(1009)	
	<223> sitio de clonación NcoI	
15	<400> 41	
	ggcgcgccga agttatacct cagaggtctc aaaaacgaaa aagtcatgca agaatctcct	60
20	ttgacgtgag gggtatttct cttcctctag tagtctacga gaatcgaaa gatcggaaaa	120
	ctgatgcac tttgtgttca cgggttagcg atttgatctt ttcgattccc aaaatcgtat	180
	cgttcctgtc gcaggggaact acgctcaaag ccggcactct gatcatcacg ggagtgagtt	240
25	ttgagctctc cctctatgag agtgcaaggc tcgctcgtga tgggtgtaatc cgctcatgcc	300
	ttccccctcta ctttctcctt tgtccattct ctctactacg gttgtcacat cttccttctc	360
	cgacagaccc cgcacggaat tggagcgtac tcgaatcctc cggaattctt caaggacgga	420
30	gacgtcttca gggtcgagat ctcgggaggc atcgggagtt tgggtcaaca gatcgaatat	480
	gaaaagtaga taatccgtta ctcaggtcaa tgggtatggc tcgaagatgc tggaaatcagc	540
	cggaaagcaa agctggagag aaaaatcgag attgcgaaac gtgcgatgtc atttcgtttc	600
35	gagctcgcaa ccatctcgta tccctctgag ctacatacaa acgtcactac ggcctcggag	660
	tgactccctg cgagcggatt gaaggagatc acggtcgaat cagctagacc ttcgcaacgt	720
	tttcgcgctc gcacgttctt atcgatctac tgagattgac tcgaaaaagt cttctctcac	780
40	ggtcgattga actttgaatg aactctcagg ttgcgcgaga gccaatcga gccgaccaga	840
	ggcaattcgg agcttcccgg aacgttccaa ggagagggat tttccgagag attacgattg	900
	cgagatagaa aaaaggctag ctttcgattt cgagagagat tactttcaag ttcgctgctt	960
45	ccaactcttg ctccaacccc ctccactcct tctctacaaa acaccatgg	1009
50		
55		
60		
65		

Reivindicaciones

- 5 1. Un constructo de ADN que comprende una secuencia aislada de nucleótidos seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 6 u 8, o la porción promotora de la misma, unida operativamente a una secuencia que codifica un polipéptido unido operativamente a un terminador de la transcripción, en donde el constructo de ADN permite la expresión eficiente del polipéptido en una especie fúngica seleccionada de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*.
- 10 2. El constructo de ADN de conformidad con la reivindicación 1, en donde la porción promotora es de aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud que comienza desde la posición -1 del codón ATG.
- 15 3. El constructo de ADN de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde las especies fúngicas se seleccionan de los géneros *Rhodospodium*, *Rhodoturula*, *Pseudozyma*, *Ustilago* o *Sporobolomyces*, en donde el genoma contiene al menos 50 % de C y G.
- 20 4. El constructo de ADN de conformidad con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la secuencia que codifica el polipéptido contiene al menos 50 % de CG, preferentemente 60 % de CG y con la máxima preferencia más del 70 % de CG.
- 25 5. Una célula fúngica que contiene al menos un constructo de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la condición de que, la célula fúngica no es de *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091 o *Rhodotorula graminis* WP1.
- 30 6. La célula fúngica de conformidad con la reivindicación 5, en donde la célula preferentemente contiene no más de 3 copias idénticas de una secuencia de nucleótidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 6 u 8, o la porción promotora de la misma, preferentemente no más de 2 copias idénticas de una secuencia de nucleótidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 6 u 8, o la porción promotora de la misma.
- 35 7. La célula fúngica de conformidad con la reivindicación 6, en donde la porción promotora es de aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud que comienza desde la posición -1 del codón ATG.
- 40 8. La célula fúngica de conformidad con la reivindicación 5, 6 o 7, en donde la célula fúngica se selecciona de las especies de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*, preferentemente seleccionada de los géneros *Rhodospodium*, *Rhodoturula*, *Pseudozyma*, *Ustilago* o *Sporobolomyces*.
- 45 9. Un promotor aislado seleccionado del grupo que consiste en:
(i) un promotor que comprende la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 6 u 8, o la porción promotora de la misma;
(ii) un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 6 u 8, o la porción promotora de la misma; y
(iii) un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 6 u 8, o la porción promotora de la misma,
en donde el promotor permite la expresión eficiente de una secuencia que codifica un polipéptido unido operativamente al promotor en una especie fúngica seleccionada de los subfilos *Pucciniomycotina* y *Ustilaginomycotina*.
- 50 10. El promotor aislado de conformidad con la reivindicación 9, en donde la porción promotora es de aproximadamente 400 pares de bases hasta aproximadamente 1100 pares de bases de longitud que comienza desde la posición -1 del codón ATG.
- 55 11. El promotor aislado de conformidad con la reivindicación 9 o la 10, en donde el promotor aislado se inserta en un vector T-ADN, un vector transportador, o en un cromosoma fúngico.
- 60 12. El promotor aislado de la reivindicación 9, 10 u 11, en donde la especie fúngica se selecciona de los géneros *Rhodospodium*, *Rhodoturula*, *Pseudozyma*, *Ustilago* o *Sporobolomyces*, en donde el genoma contiene al menos 50 % de C y G.
13. Un vector T-ADN o un vector transportador que comprende el constructo de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
14. Un cromosoma fúngico que comprende el constructo de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, con la condición de que, el cromosoma fúngico no sea de *Rhodotorula glutinis* ATCC 204091 o *Rhodotorula graminis* WP1.

Fig. 1

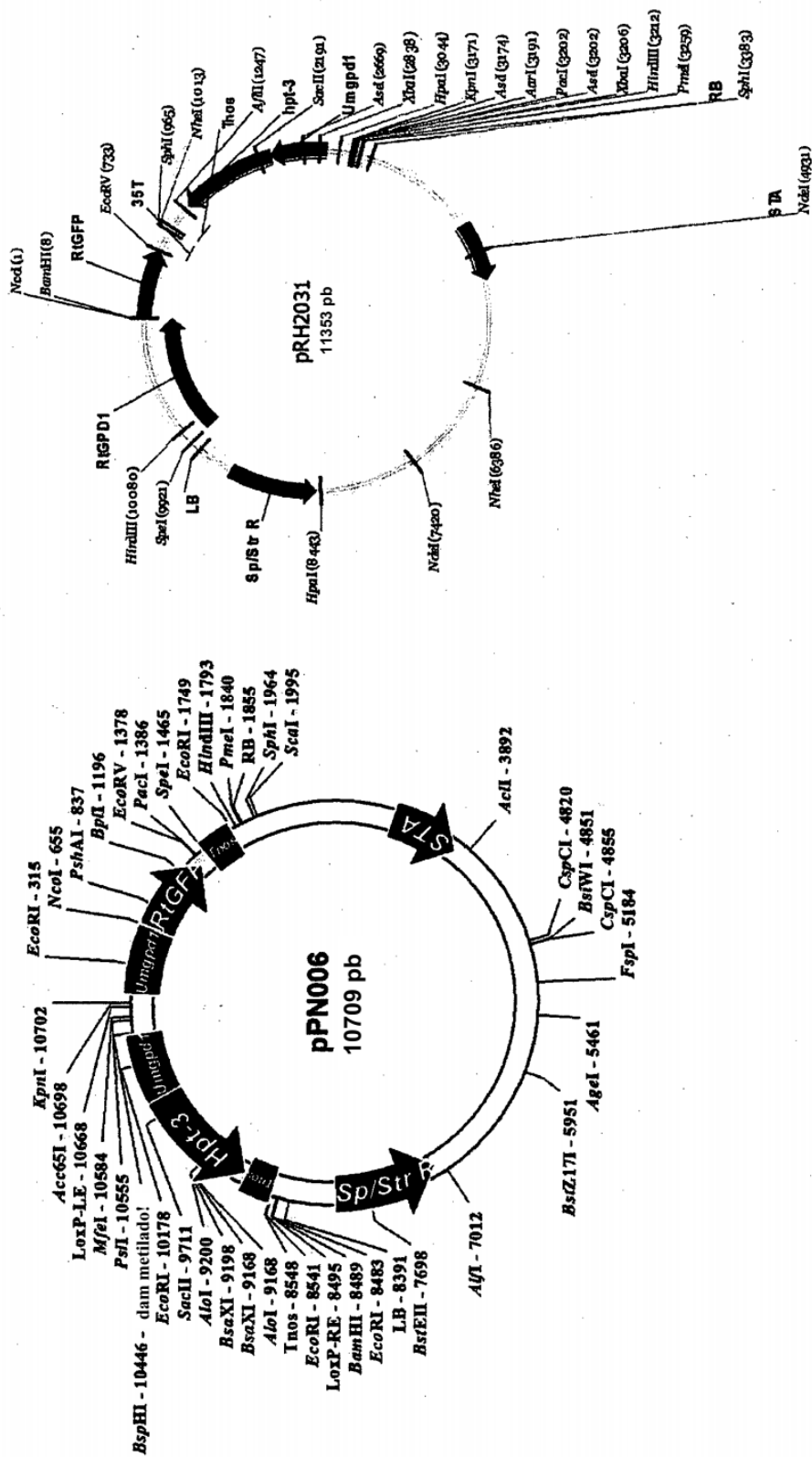


Fig. 2

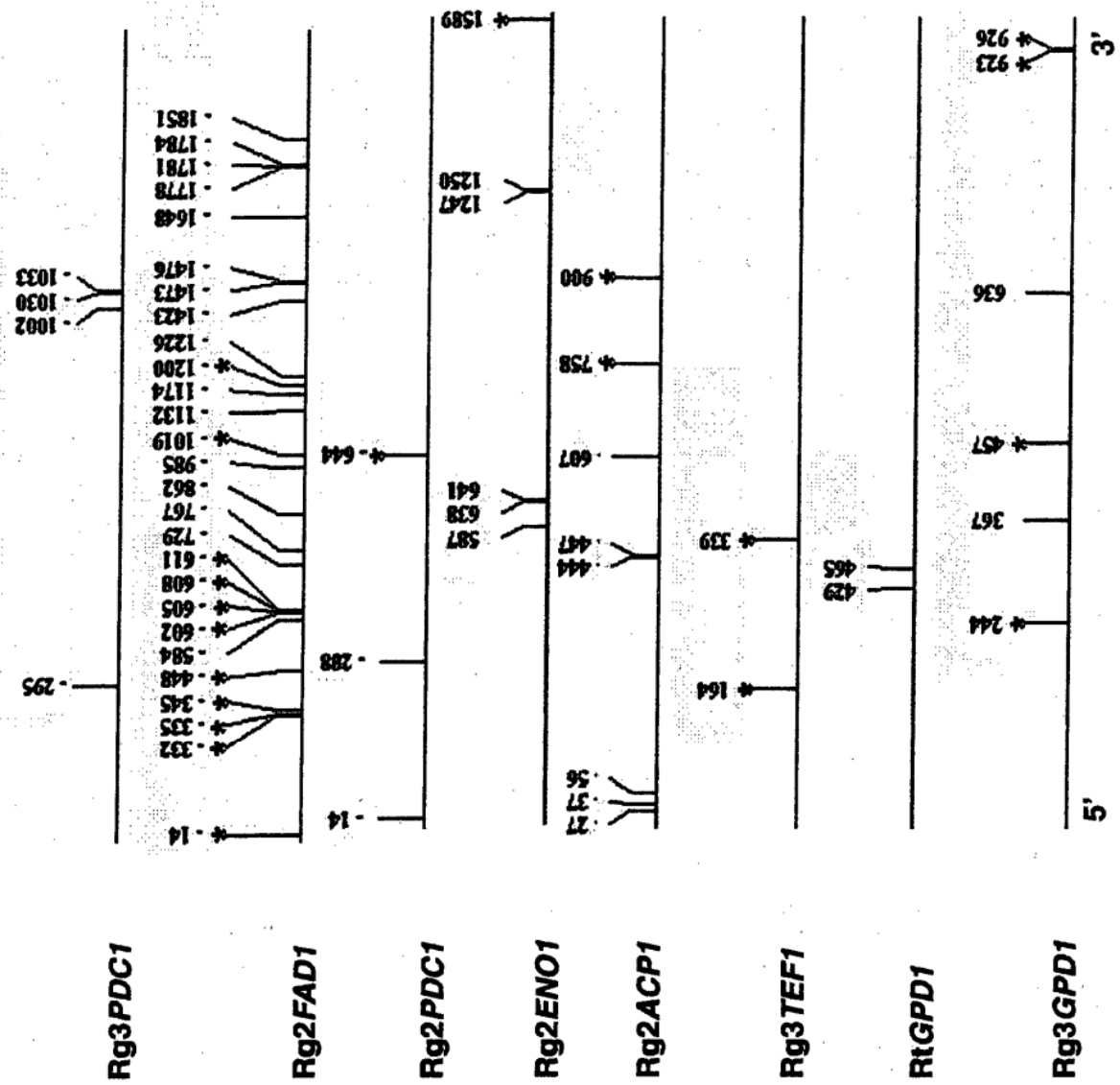


Fig. 3

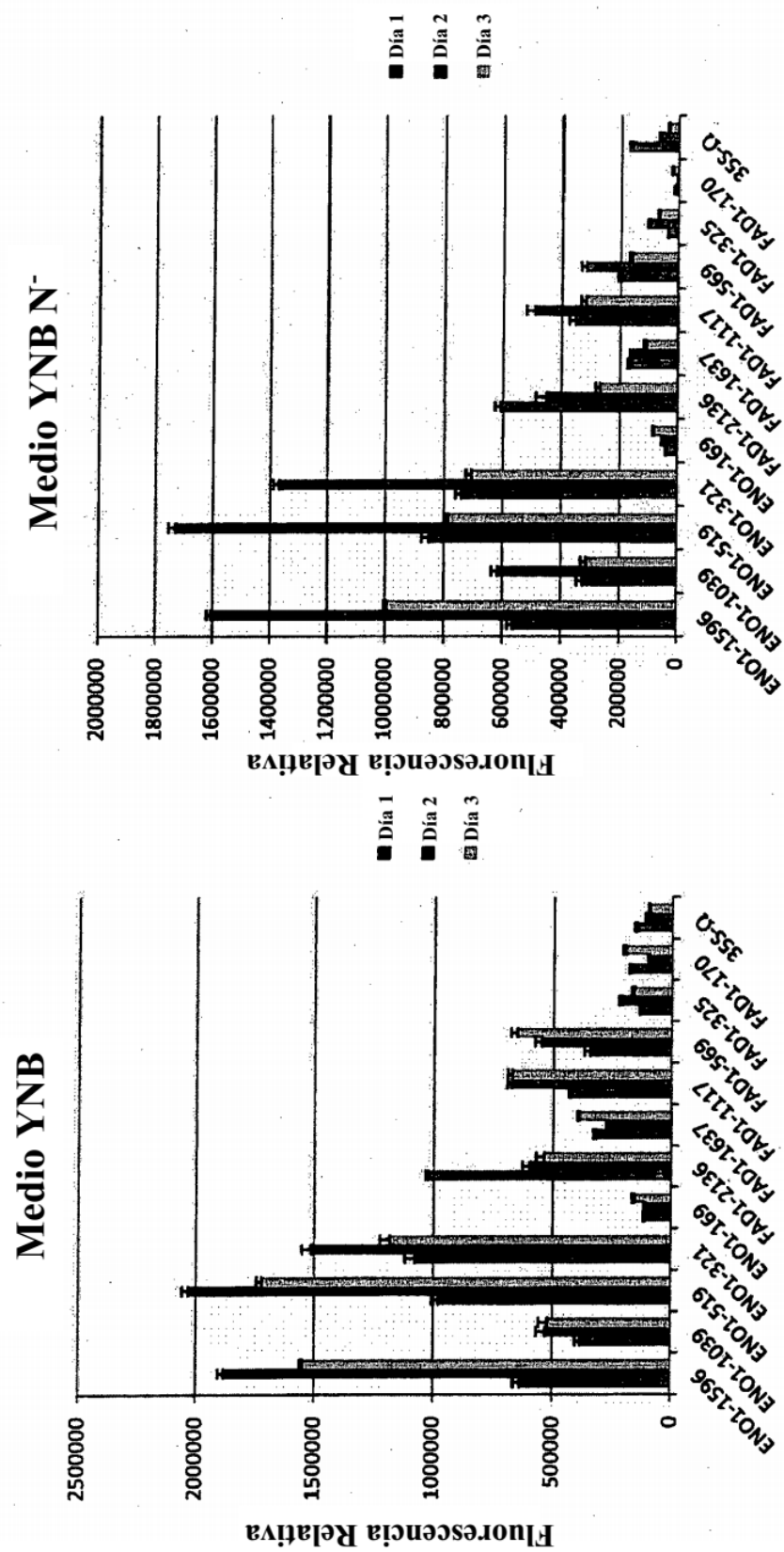


Fig. 4

A

SpeI

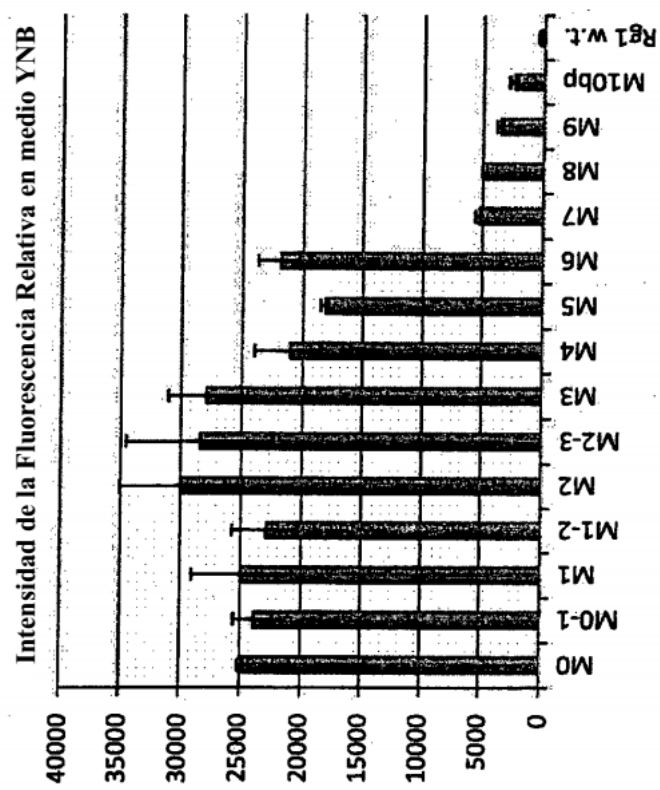
1 ACTATGCGCG TCTCGACCT TCACGTCC GGGAGGCGG TCACGACTC
M1.2 M2
51 CGAGACGCT CTCTTTGTTG TTTACGTCG TCGCGCTT GTGAGAGTC
M2.3 M3
101 CAGCGCGCG CCGTCGTGGA CTCTGACAA GCGATAAATT CCGAGACCG
M4
151 CGGAGAGAG CGGACGAGA GGGAGGCGG AGCTGGCGTC CTTCGACCT
M5 M6
201 CGTGGCGG TTCAGCGCG CAGATTGAG AGCAGTSCGT CAGTGGAGCC
M7
251 AATCAGCTT CTCATATCGG TCCCTGAGCG ATATCGATCA GCGGAGGAG
M8 M9
301 GACGACGAGC GAACTGATCT CGCGCTCTCC CTCTTCCCT TCACCTTTTC
M10
351 CACCTAGAA CAACAGTGC GTCTTCTCTG AACGCTATCA GACAATCCAG
401 GACCATGCT GACGCGCGC TCACCTGTCG CCGTACTTCA TCGCCGACG
451 AACCCGCTCG TCACCGACTG GATCTCTCC TCCCGTCGCA CCGCTGTTG
501 CGCTCGATA CTCCTCTCAC AGCCATGG
McoI

B

Nombre del Promotor	Longitud (pb)	Nombre del Promotor	Longitud (pb)
M0-1	498	M5	321
M1	477	M6	278
M1-2	456	M7	236
M2	441	M8	214
M2-3	417	M9	169
M3	404	M10	10

Fig. 5

A



B

