



(11) **MX 350491 B**

(12)

PATENTE

(43) Fecha de publicación: **07/09/2017** (51) Int. Cl: **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **19/12/2012** **A01H 5/10** (2006.01)
(21) Número de solicitud: **2015008803** **C12N 15/63** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(86) Número de solicitud PCT: **US 2011/041897**

(87) Número de publicación PCT: **WO 2011/163632 (29/12/2011)**

(30) Prioridad(es): **24/06/2010 US 61/358,314**

(71) Solicitante:
DOW AGROSCIENCES LLC
9330 Zionsville Road 46268-1054 Indianapolis Indiana
US

(72) Inventor(es):
Terence A. WALSH
11845 Durbin Drive Carmel Indiana 46032 US
Ann Owens MERLO
Scott BEVAN
Daniel J. GACHOTTE
Mark A. THOMPSON

(74) Representante:
César RAMOS DE MIGUEL
Pedro Luis Ogazón 17 ALVARO OBREGON Distrito
Federal 01000 MX

(54) Título: **DISMINUCION DE CONTENIDO DE ACIDO GRASO SATURADO DE SEMILLAS DE PLANTA.**

(54) Title: **LOWERING SATURATED FATTY ACID CONTENT OF PLANT SEEDS.**

(57) Resumen

La presente invención se refiere a las composiciones y métodos incluyen codificar y expresar genéticamente una desaturasa delta-9 novedosa en células de planta. En algunas modalidades, los métodos para expresar ácidos nucleicos en una célula de la planta, toman la ventaja de la actividad de la enzima de desaturasa delta-9, de modo que se disminuya el porcentaje en la composición de los ácidos grasos saturados en las semillas de la planta y exista un incremento concomitante en los ácidos grasos ω -7. En otras modalidades, las secuencias de aminoácido tienen actividad de desaturasa delta-9. Los métodos pueden implicar la expresión de la desaturasa delta-9 en células de planta, materiales de planta y plantas completas, con el propósito de incrementar la cantidad de ácidos grasos inusuales en plantas completas, semillas de planta y materiales de la planta, por ejemplo, semillas.

(57) Abstract

Compositions and methods include genetically encoding and expressing a novel delta-9 desaturase in plant cells. In some embodiments, methods of expressing nucleic acids in a plant cell to take advantage of the delta-9 desaturase enzyme's activity, such that the percent composition of saturated fatty acids in plant seeds is decreased and there is a concomitant increase in ω -7 fatty acids. In other embodiments, amino acid sequences have delta-9 desaturase activity. Methods can involve expression of delta-9 desaturase in plant cells, plant materials, and whole plants for the purpose of increasing the amount of unusual fatty acids in whole plants, plant seeds, and plant materials, for example, seeds.

TÍTULO DE PATENTE No. 350491

Titular(es):	DOW AGROSCIENCES LLC
Domicilio:	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana, 46268-1054, E.U.A.
Denominación:	DISMINUCIÓN DE CONTENIDO DE ÁCIDO GRASO SATURADO DE SEMILLAS DE PLANTA.
Clasificación:	CIP: C12N15/82; A01H1/02; A01H5/10; C12N15/09; C12N15/63; C12P7/64 CPC: C12N15/8247; C12N9/0083; C12N15/82
Inventor(es):	ANN OWENS MERLO; DANIEL J. GACHOTTE; MARK A. THOMPSON; TERENCE A. WALSH; SCOTT BEVAN

SOLICITUD

Número:
MX/a/2015/008803

Fecha de Presentación Internacional:
24 de Junio de 2011

Divisional de la Patente Número: 338726

PRIORIDAD

País:
US

Fecha:
24 de junio de 2010

Número:
61/358,314

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 24 de junio de 2031

Fecha de Expedición: 7 de septiembre de 2017

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud internacional y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.): 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695||MX/2017/73938|MX/a/2015/008803|Título de patente normal con divisional PCT|1220|RRGO|Pág(s) 1|VvuT5xCcQDSJazeOQ8s88ryR8A|=
Sello Digital:
Njep9VuekzCW4eHktDA1SrX1zPwcuH2Ywfaz1Qyvl+aR4huaRG6j66fzagkJ4acEqp5KPElwGKyLECLtDlaR71piW959mDI/Sx9OBifbneVSKxBKx48yl1zfUI4C3891R+PFsFqMECvM+FGy2IH3q/TVUMj8XQdI0Z9X22vFnWwVoVbtLK2uqgx1TS/2J/WOX8QjOV2UABHyJwRrhen6HhYe5QZzjDdwF9OU6MNPxDGvKk32FM2/ftnR6JypjCrFq5SBjKdTI4sw0FW17i2ou3usAVZ3nkEE9YpKvPGt8qHViQYIYxsva3RiWf52ZUmVatxA5zkQc8IP6NA==



DISMINUCIÓN DE CONTENIDO DE ÁCIDO GRASO SATURADO
DE SEMILLAS DE PLANTA

Prioridad

5 La presente solicitud es una continuación en parte de la
Solicitud Norteamericana No. U.S.S.N. 11/576,750 también
pendiente, la cual es una entrada de fase nacional de la
Solicitud de Patente Internacional PCT No. PCT/US05/36052,
presentada el 7 de octubre de 2005, de designación en los
10 Estados Unidos de América, y publicada en Inglés, como la
Publicación Internacional PCT No. WO 2006/042049 A2 el 20 de
abril de 2006. La Solicitud de Patente Internacional PCT No.
PCT/US05/36052 es una continuación de la Solicitud de Patente
Provisional Norteamericana No. 60/617,532, presentada el 8 de
15 octubre de 2004. La presente solicitud también es una
continuación de la Solicitud de Patente Provisional
Norteamericana No. 61/358,314, presentada el 24 de junio de
2010.

Campo de la Invención

20 Algunas modalidades se refieren de manera general a
ciertas enzimas de desaturasa delta-9, ácidos nucleicos que
codifican estas enzimas, y métodos para expresar las mismas
en una célula de planta. Algunas modalidades se refieren al uso
de la actividad de ciertas enzimas de desaturasa delta-9 para
25 disminuir el porcentaje en la composición de ácidos grasos

saturados en materiales de planta (por ejemplo, semillas) y al incremento del porcentaje en la composición de ácidos grasos ω -7. También se describen plantas y materiales de planta producidos a través de los métodos de las modalidades
5 particulares.

Antecedentes de la Invención

Los aceites derivados de vegetal tienen aceites y grasas derivados de animal reemplazados gradualmente como la fuente mayor de ingesta de grasa en la dieta. Sin embargo, la ingesta
10 de grasa saturada en las naciones más industrializadas ha permanecido de aproximadamente 15% a 20% del consumo calórico total. En esfuerzos para promover estilos de vida más saludables, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture) (USDA), ha
15 recomendado recientemente que las grasas saturadas abarquen menos del 10% de la ingesta calórica diaria. Para facilitar la toma de conciencia por parte del consumidor, los lineamientos de etiquetado actuales emitidos por la USDA, ahora requieren niveles de ácido graso saturados totales menores a 1.0 g por
20 porción de 14 g para recibir la etiqueta de "bajo en grasa saturada" y menos del 0.5 g por porción de 14 g para recibir la etiqueta de "sin grasa saturada". Esto significa que el contenido de ácido graso saturado en aceites de planta necesita ser menor al 7% y al 3.5% para recibir la etiqueta de "bajo en grasa
25 saturada" o "sin grasa saturada", respectivamente. Debido a la

emisión de estos lineamientos, ha habido una elevación en la
demanda por parte del consumidor de aceites con “bajo en
grasa saturada” y “sin grasa saturada”. Hasta la fecha, esta
demanda ha sido cumplida principalmente con el aceite de
5 canola, y en un grado muy menor con aceites de girasol y
cártamo.

Aunque las grasas no saturadas (monoinsaturadas y poli-
insaturadas) son benéficas (especialmente cuando se consumen
con moderación), las grasas saturadas y trans no lo son. La
10 grasa saturada y la grasa trans, eleva niveles indeseables de
colesterol LDL en la sangre. El colesterol en la dieta también
eleva el colesterol LDL y puede contribuir a enfermedades del
corazón incluso sin elevar el LDL. Por consiguiente, es
recomendable elegir alimentos bajos en contenido de grasa
15 saturada, grasa trans, y colesterol como parte de una dieta
saludable.

Las características de los aceites, ya sea de origen de
plantas o animales, son determinadas predominantemente por el
número de átomos de carbón e hidrógeno en la molécula de
20 aceite, así como por el número y posición de enlaces dobles
comprendidos en la cadena de ácido graso. La mayor parte de
los aceites derivados de plantas, están compuestos de diversas
cantidades de ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0),
oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3).
25 Convencionalmente los ácidos palmíticos y esteáricos son

designados como "saturados", debido a que sus cadenas de carbono están saturadas como átomos de hidrógeno, y por lo tanto no tienen enlaces dobles; contienen el número máximo posible de átomos de hidrógeno. Sin embargo, los ácidos oleico, linoleico, y linolénico tienen cadenas de ácido graso de 18 carbonos que tienen uno, dos, y tres enlaces dobles, respectivamente, en los mismos. El ácido oleico normalmente se considera un ácido graso monoinsaturado, mientras que el ácido linoleico y linolénico se consideran como ácidos grasos poli-insaturados. La definición de la U.S.D.A. de productos de aceite "sin grasa saturada" indicando que tienen menos del 3.5% de contenido de ácido graso, se calcula como el contenido de ácido graso saturado combinado en peso (en comparación con la cantidad total de ácidos grasos).

El aceite de canola tiene el nivel más bajo de ácidos grasos saturados de todos los aceites vegetales. "Canola" se refiere a semilla de colza (*Brassica*) que tiene un contenido de ácido erúcico (C22:1) de cuando mucho el 2% en peso, con base en el contenido de ácido graso total de una semilla (preferentemente cuando mucho el 0.5% en peso, y lo más preferentemente esencialmente el 0% en peso), y el cual produce, después de triturarse, un alimento secado con aire que contiene menos de 30 $\mu\text{mol/g}$ de alimento desgrasado (libre de aceite). Estos tipos de semilla de colza son distinguidos por su comestibilidad en comparación con variedades más

tradicionales de las especies.

Se postula que, en semillas de aceite, ~~la síntesis de ácido~~ graso ocurre principalmente en el plastidio. El producto mayor de la síntesis de ácido graso es palmitato (16:0), el cual parece ser alargado en forma eficiente a estearato (18:0). Aún en el plastidio, los ácidos grasos saturados posteriormente pueden ser desaturados a través de una enzima conocida como desaturasa delta-9 acil-ACP, para introducir uno o más enlaces dobles de carbono-carbono. Específicamente, el estearato puede ser desaturado rápidamente a través de una enzima de desaturasa delta-9 plastidial para producir oleato (18:1). De hecho, el palmitato también puede ser desaturado a palmitoleato (16:1) mediante la desaturasa delta-9 plastidial, aunque este ácido graso aparece únicamente en cantidades residuales (0-0.2%) en la mayor parte de los aceites vegetales. Por lo tanto, los productos mayores de la síntesis de ácido graso en el plastidio son palmitato, estearato, y oleato. En la mayor parte de los aceites, el oleato es el ácido graso mayor sintetizado, ya que los ácidos grasos saturados están presentes en proporciones mucho menores.

Los ácidos grasos recientemente sintetizados son exportados del plastidio al citoplasma. La desaturación subsecuente de los ácidos grasos de planta en el citoplasma, parece estar limitada al oleato, el cual puede ser desaturado a linoleato (18:2) y linolenato (18:3) mediante desaturasas

microsomales que actúan en los substratos de oleilo o
lineoleilo esterificados para colina de fosfatidilo (PC).
Además, dependiendo de la planta, el oleato puede ser
modificado en forma adicional mediante elongación (a 20:1,
5 22:1, y/o 24: 1), o mediante la adición de grupos funcionales.
Estos ácidos grasos, junto con los ácidos grasos saturados,
palmitato y estearato, posteriormente se ensamblan en
triglicéridos en membranas endoreticulares.

La enzima de desaturasa delta-9 acil-ACP de planta es
10 soluble. Se localiza en el estroma de plastidio, y utiliza ácidos
grasos recientemente sintetizados esterificados para ACP,
predominantemente estearil-ACP, como substratos. Esto en
contraste con las otras enzimas de desaturasa delta-9, las
cuales se localizan en la membrana reticular endoplásmica (ER,
15 o microsomal), que utilizan ácidos grasos esterificados para Co-
A como substratos, y desaturan tanto los ácidos grasos
saturados, como el palmitato y estearato. Las Patentes
Norteamericanas Nos. 5,723,595 y 6,706,950 se refieren a una
desaturasa de planta.

20 El gen de desaturasa delta-9 de levadura ha sido aislado
de *Saccharomyces cerevisiae*, clonado y secuenciado. Stukey et
al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 16537-44; Stukey et al. (1990) J.
Biol. Chem. 265: 20144-9. Este gen de levadura ha sido
introducido en tejido de hoja de tabaco (Polashok et al. (1991)
25 FASEB J. 5: A1157; Polashok et al. (1992) Plant Physiol. 100:

894-901), y fue expresado aparentemente en este tejido.

Además, este gen de levadura fue expresado en tomate. Ver las publicaciones de Wang et al. (1996) J. Agric. Food Chem. 44: 3399-402; y Wang et al. (2001) Phytochemistry 58: 227-32.

5 Aunque se reportaron ciertos incrementos en ciertos ácidos grasos insaturados, y algunas disminuciones en ciertos ácidos grasos saturados, tanto para tabaco como para tomate utilizando este gen de desaturasa delta-9 de levadura, el tabaco y el tomate claramente no son cosechas para aceite. Este gen
10 de levadura también fue introducido en *Brassica napus*. Patente Norteamericana No. 5,777,201.

Una desaturasa delta-9 acil-CoA fúngica diferente procedente de *Aspergillus nidulans*, ha sido introducida en canola, logrando de esta forma niveles de ácido graso saturado
15 reducidos en el aceite de semilla. Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana US 2008/0260933 A1. La desaturasa delta-9 de acil-CoA *A. nidulans* proporcionó un mayor agotamiento de estearato (61% a 90%) que los ácidos grasos de palmitato más abundantes (36% a 49%) en el aceite de semilla.

20 **Breve Descripción de la Invención**

En la presente invención se describen enzimas de desaturasa delta-9 fúngicas novedosas; ácidos nucleicos que comprenden al menos una secuencia de nucleótido que codifica una desaturasa; y plantas, materiales de planta (por ejemplo,
25 semilla), partes de planta, y productos básicos de la planta que

comprenden cualesquiera de los anteriores. Los aspectos de algunas modalidades son ejemplificados mediante enzimas de desaturasa delta-9 fúngica aisladas de *Magnaporthe grisea*, *Leptosphaeria nodorum*, y *Helicoverpa zea*. Algunos ejemplos incluyen desaturasas delta-9 nativas y sintéticas que tienen una preferencia de substrato para ácido palmítico o ácido esteárico.

Algunas modalidades comprenden una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima de desaturasa delta-9 que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos el 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 50, SEQ ID No: 51, SEQ ID No: 52, SEQ ID No: 72, y SEQ ID No: 73. En ejemplos particulares, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos el 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 44, SEQ ID No: 45, SEQ ID No: 48, y SEQ ID No: 49. Estas y otras modalidades pueden incluir un polipéptido de desaturasa delta-9 aislado que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos el 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 50, SEQ ID No: 51, SEQ ID No: 52, SEQ ID No: 72, y SEQ ID No: 73.

También se describen métodos para ~~expresar al menos~~
uno de los ácidos nucleicos y/o polipéptidos antes mencionados
en la célula de planta. Las modalidades particulares toman la
ventaja de la actividad de una enzima de desaturasa delta-9, de
5 modo que el porcentaje en la composición de ácidos grasos
saturados puede ser disminuida en una planta, material de
planta (por ejemplo, semilla), y/o parte de planta que
comprende la célula de planta, y/o un producto básico de la
planta producido de cualquiera de los anteriores. En ciertas
10 modalidades, los ácidos grasos ω -7 pueden ser incrementados
en forma concomitante en la planta, material de la planta, parte
de la planta, y/o producto básica de la planta.

Algunas modalidades incluyen un método para disminuir la
cantidad de ácidos grasos saturados en una planta, material de
15 la planta, parte de la planta, y/o producto básico de la planta,
en donde el método comprende transformar una célula de planta
con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido
de desaturasa delta-9 de la presente invención, de modo que se
disminuye la cantidad de los ácidos grasos saturados en la
20 célula. Algunas modalidades incluyen un método para crear una
planta genéticamente diseñada que comprende cantidades
disminuidas de ácidos grasos saturados en la planta, en
comparación con una planta tipo silvestre de la misma especie.
El método puede comprender transformar un material de planta
25 (o célula de planta) con una molécula de ácido nucleico que

codifica el polipéptido de desaturasa delta-9 de la presente invención, y cultivar el material de planta transformado (o célula de planta) para obtener una planta. En ejemplos particulares, una célula de planta y/o material de planta de una especie *Arabidopsis* sp., puede ser transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de desaturasa delta-9 de la presente invención.

Lo anterior y otras características podrán ser mejor apreciadas a partir de la Descripción Detallada de las diversas modalidades, que se encuentra más adelante, la cual procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1, incluye un análisis filogenético esquemático de diversas secuencias de proteína de desaturasa fúngica. Las secuencias de proteína completas de las desaturasas ilustradas fueron alineadas utilizando ClustalX y mostradas utilizando MEGA.

Las figuras 2a a 2d, incluyen una alineación de secuencias de gen de desaturasa delta-9 fúngica. Las letras mayúsculas representan nucleótidos conservados en esta alineación. Las letras sombreadas representan nucleótidos idénticos en esta alineación.

Las figuras 3a y 3b, incluyen una alineación de los polipéptidos de desaturasa delta-9 fúngica.

Las figuras 4a, 4b a 18, incluyen mapas de plásmido de

plásmidos de ejemplo que comprenden secuencias de nucleótido que codifican el polipéptido de desaturasa delta-9 fúngica que puede ser útil en algunas modalidades. Las figuras 4a y 4b, incluyen de manera específica mapas de plásmido de plásmidos de ejemplo que comprenden secuencias de nucleótido que codifican LnD9DS-2 (figura 4a; pDAB110110) y que codifican HzD9DS (figura 4b; pDAB110112), que comprenden en forma adicional las PvPhas 5' UTR y PvPhas 3' UTR.

La figura 19, incluye datos que muestran el contenido de ácido graso saturado total (%FAMES) de la semilla de *Arabidopsis* T₂ de ejemplo, de plantas transformadas con ciertas secuencias de gen de desaturasa delta-9 fúngica de ejemplo.

La figura 20, incluye datos que muestran el contenido de ácido palmítico (C16:0) (%FAMES) de la semilla de *Arabidopsis* T₂ de ejemplo de plantas transformadas con ciertas secuencias de gen de desaturasa delta-9 fúngica de ejemplo.

La figura 21, incluye datos que muestran el contenido de ácido esteárico (C18:0) (%FAMES) de la semilla de *Arabidopsis* T₂ de ejemplo de plantas transformadas con ciertas secuencias de gen de desaturasa delta-9 fúngica de ejemplo.

La figura 22, incluye datos que muestran el contenido de ácido palmitoleico (C16:1) (%FAMES) de la semilla *Arabidopsis* T₂ de ejemplo de plantas transformadas con ciertas secuencias de gen de desaturasa delta-9 fúngica de ejemplo.

La figura 23, incluye una representación gráfica de la acumulación de transcripciones de mRNA HzD9DS y LnD9DS-2 (relativas a las transcripciones AnD9DS) en el desarrollo de semillas de plantas de canola transformadas con pDAB7319 (AnD9DS v3 y LnD9DS-2 v2) o pDAB7324 (AnD9DS v3 y HzD9DS v2). El qRT-PCR $\Delta\Delta C_t$ de cada gen fue determinado en forma relativa al nivel de transcripción de actina, y la cantidad de transcripción para HzD9DS y LnD9DS-2, posteriormente fue normalizada al nivel de transcripción AnD9DS en cada muestra.

10 **Listado de Secuencias**

Las secuencias de ácido nucleico descritas en el listado de secuencias adjunto, se muestran utilizando abreviaturas de letra estándar para bases de nucleótidos, tal como se define en 37 C.F.R. § 1.822. Se muestra únicamente una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria estará incluida a través de cualquier referencia a la hebra mostrada. En el listado de secuencias adjunto:

La SEQ ID No: 1, muestra un cebador directo utilizado para amplificar mediante PCR un fragmento de un gen de desaturasa delta-9 acil-CoA *Magnaporthe grisea* (referido en algunos lugares como MgD9DS).

La SEQ ID No: 2, muestra un cebador reverso utilizado para amplificar mediante PCR un fragmento de un gen de desaturasa delta-9 acil-CoA *M. grisea* (referido en algunos lugares como MgD9DS).

La SEQ ID No: 3, muestra un fragmento de ejemplo de un gen de desaturasa delta-9 acil-CoA *M. grisea* (referido en algunos lugares como MgD9DS) que fue amplificado mediante PCR.

5 La SEQ ID No: 4, muestra un clon MgD9DS sin intrón de ejemplo.

La SEQ ID No: 5, muestra una secuencia de ácido nucleico de ejemplo que codifica una primera desaturasa delta-9 acil-CoA *Leptosphaeria nodorum*, referido en algunos lugares como
10 LnD9DS-1.

Las SEQ ID Nos: 6 y 7, muestran secuencias de cebador que pueden ser útiles en algunas modalidades.

La SEQ ID No: 8, muestra una secuencia de ácido nucleico de ejemplo que codifica una segunda desaturasa delta-9 acil-CoA *L. nodorum* de ejemplo, referida en algunos lugares como
15 LnD9DS-2.

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

20 La SEQ ID No: 10, muestra una región de codificación de un gen de desaturasa delta-9 nativo de ejemplo de *Helicoverpa zea* (etiquetado como HzD9DS v1).

La SEQ ID No: 11, muestra una región de codificación de un gen desaturasa delta-9 nativo de ejemplo (LnD9DS-2 v1) de
25 *L. nodorum*.

La SEQ ID No: 12, muestra la secuencia de aminoácido de una desaturasa delta-9 nativa de ejemplo de *M. grisea* (MgD9DS).

La SEQ ID No: 13, muestra la secuencia de aminoácido de una desaturasa delta-9 nativa de ejemplo de *H. zea* (HzD9DS).

La SEQ ID No: 14, muestra la secuencia de aminoácido de una desaturasa delta-9 nativa de ejemplo de *L. nodorum* (LnD9DS-2).

La SEQ ID No: 15, muestra la secuencia de un gen de desaturasa delta-9 optimizado por canola de ejemplo de *M. grisea* (MgD9DS v2).

La SEQ ID No: 16, muestra la secuencia de un gen de desaturasa delta-9 optimizado por canola de ejemplo de *H. zea* (HzD9DS v2).

La SEQ ID No: 17, muestra la secuencia de un gen de desaturasa delta-9 optimizado por canola de ejemplo de *L. nodorum* (LnD9DS-2 v2).

Las SEQ ID Nos: 18 a 39, muestran la secuencia de cebadores y sondas que pueden ser útiles en algunas modalidades.

Las SEQ ID Nos: 40 a 43, muestran secuencias Kozak alternativas de ejemplo que pueden ser utilizadas para incrementar la expresión en algunas modalidades.

La SEQ ID No: 44, muestra la secuencia de un gen de desaturasa delta-9 optimizado por canola de ejemplo adicional

de *L. nodorum* (LnD9DS-2 v3).

La SEQ ID No: 45, muestra la secuencia de un gen de desaturasa delta-9 optimizado por canola de ejemplo adicional de *H. zea* (HzD9DS v3).

5 La SEQ ID No: 46, muestra la secuencia de aminoácido de una etiqueta Myc.

La SEQ ID No: 47, muestra la secuencia de aminoácido de una etiqueta HA.

La SEQ ID No: 48, muestra una secuencia de ácido nucleico de ejemplo que codifica una desaturasa delta-9 *Aspergillus nidulans*, referida en algunos lugares como AnD9DS v2.

La SEQ ID No: 49, muestra una segunda secuencia de ácido nucleico de ejemplo que codifica una desaturasa delta-9 *A. nidulans*, referida en algunos lugares como AnD9DS v3.

La SEQ ID No: 50, muestra la secuencia de aminoácido codificada por ácidos nucleicos, tal como se ejemplifica mediante las SEQ ID Nos: 48 y 49 (AnD9DS).

La SEQ ID No: 51, muestra la secuencia de aminoácido de otra desaturasa AnD9DS de ejemplo.

La SEQ ID No: 52, muestra la secuencia de aminoácido de una desaturasa delta-9 nativa de ejemplo (ScOLE1) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las SEQ ID Nos: 53 a 66, muestran plásmidos que pueden ser útiles en algunas modalidades.

Las SEQ ID Nos: 67 a 71, incluyen diversos elementos de control reguladores de ácido nucleico que pueden ser útiles en algunas modalidades.

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

La SEQ ID No: 73, muestra los 175 residuos (281 a 455) C-terminales de una desaturasa AnD9DS de ejemplo.

La SEQ ID No: 74, muestra un mapa del plásmido pDAB110110.

La SEQ ID No: 75, muestra un mapa del plásmido pDAB110112.

La SEQ ID NO: 76, muestra una secuencia de ácido nucleico de ejemplo que codifica una desaturasa delta-9 acil-CoA *M. grisea*, referida en algunos lugares como MgD9DS.

La SEQ ID No: 77, muestra una secuencia de aminoácido comprendida dentro de la desaturasa delta-9 nativa de ejemplo de *L. nodorum* de la SEQ ID No: 14.

La SEQ ID No: 78, muestra una secuencia de aminoácido comprendida dentro de la desaturasa delta-9 nativa de ejemplo de *H. zea* de la SEQ ID No: 13.

Descripción Detallada de la Invención

I. Revisión General de Diversas Modalidades

Hemos introducido previamente una desaturasa delta-9 acil-CoA fúngica de *Aspergillus nidulans* en canola, logrando de esta forma niveles reducidos de ácido graso saturado en aceite

de semilla. Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana
No. US 2008/0260933 A1. La desaturasa delta-9 *A. nidulans*
proporcionó un mayor agotamiento de estearato (61% a 90%)
que los ácidos grasos de palmitato más abundantes (36% a
5 49%) en el aceite de semilla. Por consiguiente, la introducción
conjunta de una desaturasa delta-9 que actúa preferentemente
en saturados de palmitato, logrará reducciones adicionales en
los saturados totales complementando la actividad con
preferencia de estearato de la desaturasa delta-9 *A. nidulans*.
10 En algunas modalidades de esta invención, se describen
polipéptidos de desaturasa delta-9 fúngica que tienen un rango
de especificidades de sustrato. Las modalidades particulares
incluyen una desaturasa delta-9 con preferencia de palmitato
(por ejemplo, una enzima fúngica nativa tal como aquí se
15 describe, o un equivalente funcional de la misma; y un
polipéptido sintético designado para tener preferencia por un
sustrato de ácido palmítico).

En la presente invención se describen moléculas de ácido
nucleico que codifican un polipéptido de desaturasa delta-9 que
20 comprende una secuencia de nucleótido que es al menos el 60%
idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste
en SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 8,
SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 15,
SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 44, SEQ ID No: 45,
25 SEQ ID No: 48, y SEQ ID No: 49. En algunas modalidades, la

molécula de ácido nucleico puede comprender además un elemento regulador de gen enlazado en forma operable a la secuencia que codifica el polipéptido de desaturasa delta-9. En modalidades particulares, un elemento regulador de gen puede ser un promotor de faseolina, una región no traducida 5' de faseolina, una región no traducida 3' de faseolina, una región no traducida 3' ORF1 de *Agrobacterium tumefaciens*, un promotor de Virus de Mosaico de vena de Tapioca, una Región de Adhesión de la Matriz RB7 de *Nicotiana tabacum*, una secuencia de extremo de hebra-T, un promotor LfKCS3, y un promotor FAE 1.

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

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos de desaturasa delta-9 de la presente invención, incluyen métodos para disminuir la cantidad de ácidos grasos saturados en el material, célula, tejido de la planta, o la planta completa. Dichos métodos pueden comprender transformar un material, célula, tejido de la planta, o planta completa con al menos una de las moléculas de ácido

nucleico antes mencionadas, de modo que la cantidad de ácidos grasos saturados en el material, célula, tejido de la planta, o planta completa, sea disminuida. Las modalidades particulares incluyen métodos para disminuir preferentemente los ácidos grasos palmíticos y/o esteáricos en un material, célula, tejido de la planta, o planta completa.

Se pueden llevar a cabo métodos aquí descritos, por ejemplo, en plantas, o materiales de planta derivados de plantas (por ejemplo, plantas del género *Arabidopsis*, o canola).

Se extrae una modalidad particular para métodos para crear o regenerar una planta genéticamente diseñada, que comprende cantidades disminuidas de ácidos grasos saturados en la planta, en comparación con una planta tipo silvestre de la misma especie, en donde el método comprende transformar una célula o material de la planta con al menos una de las moléculas de ácido nucleico antes mencionadas; y cultivar el material de planta transformado para obtener una planta. También se describen plantas, materiales de planta, células de planta, y semillas obtenidas a través de cualesquiera de los métodos anteriores.

II. Abreviaturas

	$x:y\Delta^z$	ácido graso que contiene x carbonos y y enlaces dobles en la posición z que abarca desde el extremo carboxilo
5	ACP	proteína transportadora de acilo
	CoA	coenzima A
	FA	ácidos grasos
	FAM	fluoresceína
	FAS	sintasa de ácido graso
	FAME	éster metílico de ácido graso
10	KASII	sintasa II β -cetoacil-ACP
	MUFA	ácido graso monoinsaturado
	WT	tipo silvestre

III. Términos

15 Ácido graso: Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ácido graso" se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanóicos) de diversas longitudes de cadena, por ejemplo, de aproximadamente C12 hasta C22, aunque se conocen ácidos con longitudes de cadena tanto más largas como más cortas. La estructura de un ácido graso se representa

20 a través de la notación, $x:y\Delta^z$, en donde "x" es el número total de átomos de carbono (C) en el ácido graso particular, y "y" es el número de enlaces dobles en la cadena de carbono en la posición "z", tal como se cuenta desde el extremo carboxilo del ácido.

25 Trayectoria metabólica: El término, "trayectoria

metabólica”, se refiere a una serie de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula, catalizada por enzimas, para lograr ya sea la formación de un producto metabólico, o el inicio de otra trayectoria metabólica. Una trayectoria metabólica puede implicar diversos o muchos pasos, o puede competir con una trayectoria metabólica diferente para substratos de reacción específicos. En forma similar, el producto de una trayectoria metabólica puede ser un substrato para aún otra trayectoria metabólica.

10 Diseño metabólico: Para los propósitos de la presente invención, el “diseño metabólico” se refiere al diseño racional de estrategias para alterar una o más trayectorias metabólicas en una célula, de modo que se logre la modificación paso por paso de una sustancia inicial en un producto que tiene la estructura química exacta, dentro del esquema general de las trayectorias metabólicas que operan en la célula.

 Desaturasa: Tal como se utiliza en esta invención, el término “desaturasa” se refiere a un polipéptido que puede desaturar (por ejemplo, introducir un enlace doble) en uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso o precursor de interés. Una enzimas de desaturasa de ácido graso soluble en planta puede introducir un enlace doble en forma regioespecífica dentro de un substrato acil-ACP saturado. Las desaturasas acil-CoA introducen un enlace doble en forma regioespecífica en un substrato acil-CoA de graso saturado. La

reacción implica activación de oxígeno molecular a través de un centro de dihierro reducido por dos electrones coordinado por un atado de cuatro hélices que forma el núcleo de la arquitectura de desaturasa. De particular interés en algunas modalidades, son las desaturasas delta-9.

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

Desaturasa variante: Tal como se utiliza en esta invención, el término "desaturasa variante" comprende las desaturasas que exhiben perfiles de actividad específica consistentes con un desempeño en producir ácidos grasos inusuales. Una desaturasa variante puede ser aislada de un organismo, diseñada a través de un programa de evolución directa, o diseñada como una desaturasa sintética que incorpora aminoácidos conservados de una o más desaturasas caracterizadas.

Planta de progenie: Para los propósitos de la presente invención, la "planta de progenie", se refiere a cualquier planta, o material de planta obtenido de la misma, que pueda obtenerse mediante métodos de reproducción de plantas. Los métodos de reproducción de plantas son bien conocidos en la técnica, e incluyen, reproducción natural, reproducción artificial, reproducción selectiva que implica análisis de marcador

molecular de ADN, transgénicas, y reproducciones comerciales.

Material de planta: Tal como se utiliza en esta invención, el término "material de planta" se refiere a cualquier célula o tejido obtenido de una planta.

5 Molécula de ácido nucleico: Una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir hebras tanto de sentido como anti-sentido de ARN, cADN, ADN genómico, y formas sintéticas y polímeros mezclados de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido, o una forma
10 modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza en esta invención, es sinónimo con "ácido nucleico" y "polinucleótido". El término incluye formas de ADN de hebra simple y doble. Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos de los
15 nucleótidos modificados y que ocurren naturalmente, enlazados juntos a través de ligaduras de nucleótido que ocurren naturalmente y/o no ocurren naturalmente.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas en forma química o bioquímica, o pueden contener bases de
20 nucleótidos no naturales o derivados, tal como lo podrán apreciar los expertos en la técnica. Dicha modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, substitución de uno o más nucleótidos que ocurren naturalmente con un análogo, modificaciones de internucleótido, tal como ligaduras no
25 cargadas (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres,

fosforoamidatos, carbamatos, etc.), ligaduras cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), porciones pendientes (por ejemplo, péptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), queladores, alquiladores, y ligaduras modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones de hebra simple, hebra doble, parcialmente duplexadas, triplexadas, en horquillas, circulares y de candado.

10 Enlazado en forma operable: Una primera secuencia de ácido nucleico está enlazada en forma operable con una segunda secuencia de ácido nucleico, cuando la primera secuencia de ácido nucleico está en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un
15 promotor está enlazado en forma operable a una secuencia de codificación, si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Cuando se produce en forma recombinante, las secuencias de ácido nucleico enlazadas en forma operable están generalmente contiguas, y cuando es
20 necesario unir dos regiones de codificación de proteína, en el mismo cuadro lectura. Sin embargo, los ácidos nucleicos no necesitan ser contiguos para ser enlazados en forma operable.

Elemento regulador: Tal como se utiliza en la presente invención, el término "elemento regulador" se refiere a una
25 molécula de ácido nucleico que tiene actividad reguladora de

gen; por ejemplo, una que tiene la capacidad de afectar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico transcribible, enlazada en forma operable. Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, intrones, y regiones de terminación de transcripción, son moléculas de ácido nucleico sin codificación que tienen actividad reguladora de gen, que desempeñan una parte integral en la expresión general de los genes en las células vivas. Por consiguiente, los elementos reguladores aislados que funcionan en plantas, son útiles para modificar fenotipos de planta a través de las técnicas de diseño molecular. Por el término "elemento regulador", se entiende una serie de nucleótidos que determinan si, cuando, y en qué nivel se expresa un gen en particular. Las secuencias de ADN reguladoras interactúan específicamente con proteínas reguladoras u otras proteínas.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "actividad reguladora de gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico con la capacidad de afectar la transcripción o traducción de una molécula de ácido nucleico enlazada en forma operable. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene actividad reguladora de gen puede proporcionar expresión temporal o espacial, o modular niveles y rangos de expresión de la molécula de ácido nucleico enlazada en forma operable. Una molécula de ácido nucleico aislada que tiene actividad reguladora de gen, puede comprender un promotor, intrón, líder,

o región de terminación de transcripción 3'.

Promotores: Tal como se utiliza en esta invención, el término "promotor" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está implicada en el reconocimiento y enlace de una polimerasa de ARN II u otras proteínas, tal como factores de transcripción (factores de proteína de transacción que regulan la transcripción) para iniciar la transcripción de un gen enlazado en forma operable. Los promotores por si mismos pueden contener sub-elementos tales como elementos-cis, o dominios aumentadores que efectúan la transcripción de los genes enlazados en forma operable. Un "promotor de planta" es un promotor nativo o no nativo que es funcional en células de planta. Un promotor de planta puede utilizarse como un elemento regulador 5' para modular la expresión de un gen o genes enlazados en forma operable. Los promotores de plantas pueden ser definidos por su patrón de expresión temporal, espacial, o de desarrollo. Las moléculas de ácido nucleico aquí descritas pueden comprender secuencias de ácido nucleico que comprenden promotores.

Identidad de secuencia: El término "identidad de secuencia" o "identidad", tal como se utiliza en la presente invención dentro del contexto de dos secuencias de polipéptido o ácido nucleico, puede referirse a los residuos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para una máxima correspondencia en una ventana de comparación

específica.

5 Cuando se utiliza un porcentaje de ~~identidad de secuencia~~ en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de residuo que no son idénticas con frecuencia difieren por substituciones de aminoácido conservadoras, en donde los residuos de aminoácido son substituidos por otros residuos de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga, hidrofobicidad, o efectos estéricos), y por consiguiente, no cambian las propiedades funcionales de la molécula.

10 Por consiguiente, cuando las secuencias difieren por substituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba, para corregir la naturaleza conservadora de la substitución en el sitio del residuo no idéntico. Las secuencias que difieren por dichas substituciones conservadoras, se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Las técnicas para elaborar este ajuste son bien conocidas para los expertos en el arte. Normalmente, las técnicas implican calificar una substitución conservadora como una incompatibilidad parcial, en lugar de total, 15 incrementando de esta forma el porcentaje de identidad de secuencia. Por ejemplo, cuando se proporciona un aminoácido idéntico, se proporciona una calificación entre 0 y 1, y a una substitución no conservadora se le proporciona una calificación de 0, a una substitución conservadora se le proporciona una 20 calificación entre 0 y 1. La calificación de las substituciones 25

conservadoras puede ser calculada, por ejemplo, tal como se implementa en el programa PC/GENE ((Intelligenetics, Mountain View, CA).

Tal como se utiliza en la presente invención, el término
5 “porcentaje de identidad de secuencia” puede referirse al valor determinado comparando dos secuencias alineadas en forma óptima a través de una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, saltos) en
10 comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales ocurre el residuo de aminoácido o nucleótido idéntico, en ambas secuencias para
15 producir el número de posiciones compatibilizadas, dividiendo el número de posiciones compatibilizadas, entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

20 Posición análoga en una secuencia de aminoácido: Las secuencias de aminoácido y ácido nucleico pueden ser alineadas a través de los métodos descritos en los siguientes párrafos. Cuando se alinea, una posición en una secuencia está en “una posición análoga” con una posición en la secuencia
25 alineada, si las posiciones son idénticas dentro de la secuencia

de consenso.

Los métodos para alinear secuencias ~~para comparación~~ son bien conocidos en la técnica. Se describen varios programas y algoritmos de alineación en las publicaciones de:

5 Smith and Waterman, Adv. Appl. math. 2: 482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85: 2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73: 237-44, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-3, 1989; Corpet et al, Investigación de Ácidos Nucleicos (Nucleic

10 Acids Research) 16: 10881-10890, 1988; Huang, et al, Aplicaciones de Computadora en las Biociencias (Computer Applications in the Biosciences) 8: 155-65, 1992; Pearson et al, Métodos en Biología Molecular (Methods in Molecular Biology) 24: 307-31, 1994; Tatiana et al, FEMS Microbiol. Lett., 174:

15 247-50, 1990. Altschul et al, J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990 (consideración detallada de los métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología).

La Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST) del Centro Nacional para Información de Biotecnología

20 (NCBI) (The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)), está disponible en la Internet (en el sitio blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para utilizarse en relación con programas de análisis de secuencia, por ejemplo, blastp y

25 blastn. Está disponible en la Internet una descripción de cómo

determinar la identidad de secuencia utilizando este programa,
a través del NCBI en el sitio
[blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastD
ocs.](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs)

5 Para comparaciones de secuencias de aminoácido, la
función de las "secuencias Blast 2" del programa BLAST
(bl2seq), se emplea utilizando los parámetros por omisión. Se
pueden ajustar parámetros específicos al juicio de un experto
en la técnica, por ejemplo, para proporcionar una penalidad por
10 una incompatibilidad o una recompensa por una compatibilidad.

Transformado: Tal como se utiliza en esta invención, el
término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano, u
organismo en el cual se ha introducido una molécula de ácido
nucleico extraña, tal como una construcción. La molécula de
15 ácido nucleico introducida puede ser integrada en el ADN
genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor, de
modo que la molécula de polinucleótido introducida sea
heredada por la progenie subsecuente. Una célula u organismo
"transgénico" o "transformado", también incluye la progenie de
20 la célula u organismo y la progenie producida de un programa
de reproducción, que emplea una planta transgénica como un
origen, por ejemplo, en una cruce y exhibe un fenotipo alterado
que resulta de la presencia de una molécula de ácido nucleico
extraña.

IV. Métodos de diseño metabólico para disminuir ácidos grasos saturados en una célula, tejido, u organismo huésped

A. Revisión General

5 Una modalidad de la presente invención incluye introducir desaturasas delta-9 con preferencias acil-CoA específicas (por ejemplo, para ácido palmítico o esteárico) en semillas de planta. La preferencia acil-CoA específica de la desaturasa delta-9, permite la dirección de ciertos conjuntos de ácido graso saturados específicos (por ejemplo, palmitato para conversión a
10 productos monoinsaturados). Las desaturasas delta-9 acil-CoA fueron seleccionadas para disminuir el contenido de ácido graso saturado en plantas, ya que normalmente no se producen en sistemas de planta en algún grado apreciable.

15 **B. Polipéptidos**

Los polipéptidos de acuerdo con algunas modalidades de la presente invención, comprenden una secuencia de aminoácido que muestra identidades de porcentaje en incremento cuando se alinea con una secuencia seleccionada
20 del grupo que consiste en SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 50, SEQ ID No: 52, SEQ ID No: 72, y SEQ ID NO: 73. Las secuencias de aminoácido específicas dentro de estas y otras modalidades, pueden comprender secuencias que tienen, por ejemplo, al menos aproximadamente
25 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, 81%, 82%,

83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,
94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con las
secuencias antes mencionadas. En muchas modalidades, la
secuencia de aminoácido que tiene la identidad de secuencia
5 antes mencionada cuando se alinea con las secuencias antes
mencionadas, codifica un péptido con actividad de desaturasa
delta-9-18:0-ACP enzimática, o parte de dicho péptido.

C. Ácidos Nucleicos

Algunas modalidades incluyen moléculas de ácido nucleico
10 que codifican un polipéptido descrito anteriormente. Por
ejemplo, las secuencias de ácido nucleico en algunas
modalidades, muestran porcentajes de identidad en incremento
cuando se alinean con una secuencia seleccionada del grupo
que consiste en SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5,
15 SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11,
SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 44,
SEQ ID No: 45, SEQ ID No: 48, y SEQ ID No: 49. Las
secuencias de ácido nucleico específicas dentro de esta y otras
modalidades, pueden comprender secuencias que tienen, por
20 ejemplo, al menos aproximadamente 60%, aproximadamente
65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%,
aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%,
99%, o 100% de identidad con una secuencia seleccionada del
25 grupo que consiste en SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No:

5, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11,
SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 44,
SEQ ID No: 45, SEQ ID No: 48, y SEQ ID No: 49. Quedará
entendido para los expertos en la técnica, que las moléculas de
5 ácido nucleico pueden ser modificadas sin cambiar
substancialmente la secuencia de aminoácido de un polipéptido
codificado, por ejemplo, introduciendo sustituciones de
nucleótido permisibles de acuerdo con la degeneración de
codón.

10 En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico
de la presente invención, comprenden un elemento regulador de
gen (por ejemplo, un promotor). Los promotores pueden ser
seleccionados sobre las bases del tipo de célula en la cual se
insertará la construcción de vector. Los promotores que
15 funcionan en bacterias, levadura, y plantas son bien conocidos
en la técnica. Los promotores también pueden ser
seleccionados sobre las bases de sus características
reguladoras. Los ejemplos de dichas características incluyen
aumento de actividad de transcripción, inducibilidad,
20 especificidad de tejido, y especificidad de etapa de desarrollo.
En plantas, se han descrito promotores que son inducibles, de
origen viral o sintético, constitutivamente activos,
temporalmente regulados, y regulados en forma espacial. Ver
por ejemplo, las publicaciones de Poszkowski et al. (1989)
25 EMBO J. 3: 2719; Odell et al. (1985) Nature 313: 810; y Chau et

al. (1989) Science 244: 174-81).

Los promotores inducibles útiles incluyen, por ejemplo, promotores inducidos mediante ácido salicílico y ácidos poliacrílicos inducidos mediante la aplicación de protectores
5 (herbicidas de bencenosulfonamida substituida), promotores de impacto térmico, un promotor inducible por nitrato derivado de la secuencia de la molécula de ácido nucleico transcribible de reductasa de nitrato de espinaca, promotores inducibles con hormonas, y promotores inducibles con luz asociados con una
10 pequeña subunidad de carboxilasa RuBP y familias LHCP.

Los ejemplos de promotores regulados por desarrollo, específicos de tejido útiles, incluyen el promotor de β -conglucina 7S α y promotores específicos de semilla. Los promotores funcionales de plantas útiles para expresión
15 preferencial en plastidio de semilla, incluyen los procedentes de proteínas implicadas en la biosíntesis de ácido graso en semillas de aceite, y de proteínas de almacenamiento de plantas. Los ejemplos de dichos promotores incluyen las regiones reguladoras 5' de las secuencias de molécula de ácido
20 nucleico transcribibles, tales como faseolina, napina, zeína, inhibidor de tripsina de frijol de soya, ACP, desaturasa de esteroil-ACP, y oleosina. Otro promotor específico de tejido de ejemplo es el promotor de lectina, el cual es específico para tejido de semilla.

25 Otros promotores útiles incluyen los promotores de sintasa

de nopalina, sintasa de manopina, y sintasa de octopina, los cuales se llevan en los plásmidos de inducción de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*; los promotores del virus de mosaico de coliflor (CaMV) 19S y 35S; el promotor CaMV 35S
5 aumentado; el promotor del Virus de Mosaico de Escrofularia 35S; el promotor inducible por luz de la subunidad pequeña de carboxilasa de ribulosa-1,5-bisfosfato (ssRUBISCO); el promotor EIF-4A de tabaco (Mandel et al, (1995) Plant Mol. Biol. 29: 995-1004); sintetasa de sacarosa de maíz;
10 deshidrogenasa de alcohol de maíz I; complejo de fotocaptación de maíz; proteína de impacto térmico de maíz; el promotor de quitinasa de *Arabidopsis*; los promotores LTP (Proteína de Transferencia de Lípido); isomerasa de calcona de petunia; proteína con alto contenido de glicina de frijol 1; patatina de
15 papa; el promotor de ubiquitina; y el promotor de actina. Los promotores útiles son preferentemente selectivos de semilla, selectivos de tejido, o inducibles. La regulación específica de semilla se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente EP 0 255 378.

20 Para obtener una mayor expresión del gen(s) heterólogo, puede ser preferible rediseñar el gen(s), de modo que sea expresado en forma más eficiente en la célula huésped de expresión (por ejemplo, una célula de planta, por ejemplo, canola, arroz, tabaco, maíz, algodón y frijol de soya). Por
25 consiguiente, un paso adicional opcional en el diseño de un gen

que codifica una desaturasa delta-9 para expresión de plantas (por ejemplo, además de la provisión de uno o más elementos reguladores de gen), es rediseñar una región de codificación de proteína de gen heterólogo para expresión óptima. Las 5 modalidades particulares incluyen genes rediseñados que han sido optimizados para incrementar el nivel de expresión (es decir, producir más proteína) en una célula de planta de canola transgénica o una célula de planta *Arabidopsis*, que en una célula de planta de canola o célula de planta *Arabidopsis* 10 transformada con la secuencia de gen heteróloga que ocurre naturalmente.

Debido a la plasticidad producida por la redundancia/degeneración del código genético (por ejemplo, algunos aminoácidos son especificados por más de un codón), 15 la evolución de los genomas en diferentes organismos o clases de organismos, ha dado como resultado un uso diferencial de codones sinónimos. Esta "inclinación de codón" se refleja en la composición base promedio de las regiones que codifican la proteína. Por ejemplo, los organismos que tienen genomas con 20 contenidos G+C relativamente bajos, utilizan más codones que tienen A o T en la tercera posición de los codones sinónimos, mientras que los que tienen mayores contenidos de G+C, utilizan más codones que tienen G o C en la tercera posición. Además, se considera que la presencia de codones "menores" 25 dentro de un mRNA, pueden reducir el rango de traducción

absoluto del mARN, especialmente cuando la abundancia
relativa del tARN cargado que corresponde al codón menor es
baja. Una extensión de este razonamiento, es que la
disminución de rango de traducción mediante los codones
5 menores individuales, puede ser al menos aditiva para múltiples
codones menores. Por consiguiente, los mARNs que tienen
altos contenidos relativos de codones menores en un huésped
de expresión particular, pueden tener rangos de traducción
correspondientemente bajos. Este rango puede ser reflejado por
10 niveles correspondientemente bajos de la proteína codificada.

Los genes optimizados por diseño que codifican una
desaturasa delta-9 para expresión en canola o *Arabidopsis* (u
otras plantas, tales como arroz, tabaco, maíz, algodón o frijol
de soya), es útil si la inclinación del codón de la planta(s)
15 huésped prospecto, ha sido determinada. Existen múltiples
bases de datos de secuencia de ADN públicamente disponibles,
en donde se puede encontrar información con respecto a la
distribución de codón de los genomas de planta o a las regiones
de codificación de proteína de diversos genes de planta.

20 La inclinación del codón es la distribución estadística de
codones que el huésped de expresión (por ejemplo, una planta
tal como canola o *Arabidopsis*) utiliza para codificar los
aminoácidos de sus proteínas. La inclinación del codón puede
ser calculada como la frecuencia en la cual se utiliza un codón
25 simple relativo al codón para todos los aminoácidos. Como

alternativa, la inclinación del codón puede ser ~~calculada como~~
la frecuencia en la cual se utiliza un codón simple para
codificar un aminoácido en particular, relativo a los otros
codones del aminoácido (codones sinónimos).

5 En el diseño de regiones de codificación optimizadas para
la expresión en la planta de genes de desaturasa delta-9, se
deben determinar los codones primarios ("primera elección")
preferidos por la planta, así como las segundas, terceras,
cuartas, etc., elecciones de codón preferidas cuando existen
10 múltiples elecciones. Posteriormente se puede diseñar una
nueva secuencia de ADN que codifica la secuencia de amino
ácido del gen de desaturasa delta-9, en donde la nueva
secuencia de ADN difiere de la secuencia de ADN nativa (que
codifica la desaturasa) mediante la sustitución de los codones
15 preferidos por el huésped de expresión (primer preferido,
segundo preferido, tercer preferido, o cuarto preferido, etc.),
para especificar el aminoácido en cada posición dentro de la
secuencia de aminoácido. Posteriormente la nueva secuencia se
analiza para sitios de enzima de restricción que deben haber
20 sido creados por las modificaciones. Los sitios de restricción
putativos identificados son modificados en forma adicional
reemplazando estos codones con un siguiente codón preferido
para eliminar el sitio de restricción. Otros sitios en la secuencia
que pueden afectar la transcripción o traducción de la
25 secuencia heteróloga, son uniones de exón:intrón (5' ó 3'),

señales de adición poli-A, y/o señales de terminación de polimerasa ARN. La secuencia puede ser analizada y modificada en forma adicional para reducir la frecuencia de los dobletes TA o CG. Además de estos dobletes, los bloques de secuencia que tienen más de aproximadamente seis nucleótidos G o C que son los mismos, también pueden afectar de manera adversa la transcripción o traducción de la secuencia. Por consiguiente, estos bloques son modificados en forma conveniente reemplazando los codones de la primera o segunda elección, etc., con el siguiente codón de elección preferido.

El método descrito anteriormente permite a un experto en la técnica modificar el gen(s) que es extraño para una planta en particular, de modo que los genes sean expresados en forma óptima en las plantas. El método se ilustra en forma adicional en la Solicitud PCT WO 97/13402. Por lo tanto, los genes sintéticos optimizados que son funcionalmente equivalentes a desaturasas/genes de ciertas modalidades, se pueden utilizar para transformar huéspedes, incluyendo plantas. Se puede encontrar una guía adicional con respecto a la producción de genes sintéticos, por ejemplo, en la Patente Norteamericana No. 5,380,831.

Una vez que una secuencia de ADN optimizada por planta ha sido diseñada en papel o *in silico*, las moléculas de ADN reales pueden ser sintetizadas en el laboratorio para corresponder en secuencia en forma precisa con la secuencia

designada. Dichas moléculas de ADN sintéticas pueden ser clonadas y de otra forma manipuladas en forma exacta, como si fueran derivadas de fuentes naturales o nativas.

D. Métodos para transformación genética del material de la planta

Algunas modalidades se dirigen a un método para producir una célula transformada que comprende una o más molécula(s) de ácido nucleico, en donde el método comprende una secuencia de ácido nucleico al menos el 60% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 44, SEQ ID No: 45, SEQ ID No: 48, y SEQ ID No: 49. Dichas moléculas de ácido nucleico también pueden comprender, por ejemplo, elementos reguladores sin codificación, tal como promotores. También se pueden introducir otras secuencias en la célula junto con los elementos reguladores sin codificación y las secuencias de molécula de ácido nucleico transcribibles. Estas otras secuencias pueden incluir terminadores de transcripción 3', señales de poliadenilación 3', otras secuencias no traducidas, secuencias de tránsito o dirección, marcadores seleccionables, aumentadores, y operadores.

Un método de transformación comprende generalmente los pasos de seleccionar una célula huésped adecuada, transformar

la célula huésped con un vector recombinante, y obtener la célula huésped transformada. La tecnología para introducción de ADN en las células es bien conocida para los expertos en la técnica. Estos métodos pueden ser clasificados generalmente en cinco categorías: (1) métodos químicos (Graham and Van der Eb (1973) *Virology* 54(2): 536-9; Zatloukal et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 136-53); (2) métodos físicos tales como microinyección (Capechi (1980) *Cell* 22(2): 479-88), electroporación (Wong and Neumann (1982) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 107(2): 584-7; Fromm et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 82(17): 5824-8; Patente Norteamericana No. 5,384,253), y aceleración de partículas (Johnston and Tang (1994) *Methods Cell Biol.* 43(A): 353-65; Fynan et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90(24): 11478-82; (3) vectores virales (Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20(1): 155-68; Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178(6): 2089-96; Eglitis and Anderson (1988) *Biotechniques* 6(7): 608-14); (4) mecanismos transmitidos por receptor (Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3(2): 147-54; Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89(13): 6099-103); y (5) mecanismos transmitidos por bacterias, tal como con *Agrobacterium*. Como alternativa, los ácidos nucleicos pueden ser introducidos directamente en polen, inyectando directamente los órganos reproductores de una planta. Zhou et al. (1983) *Methods in Enzymology* 101: 433; Hess (1987) *Intern. Rev. Cytol.* 107: 367; Luo et al. (1988) *Plant*

Mol. Biol. Reporter 6: 165; Pena et al. (1987) Nature 325: 274.

Otros métodos de transformación incluyen, por ejemplo, transformación de protoplasto tal como se ilustra en la Patente Norteamericana No. 5,508,184. Las moléculas de ácido nucleico
5 también pueden ser inyectadas en embriones inmaduros. Neuhaus et al. (1987) Theor. Appl. Genet. 75: 30.

Los métodos de transformación de células de planta más comúnmente utilizados son: el proceso de transferencia de ADN transmitido por *Agrobacterium* (Fraley et al. (1983) Proc. Natl.
10 Acad. Sci. EUA 80: 4803) (tal como se ilustra en la Patente Norteamericana No. 5,824,877; Patente Norteamericana No. 5,591,616; Patente Norteamericana No. 5,981,840; y Patente Norteamericana No. 6,384,301) y los procesos transmitidos por biolísticas o bombardeo de microproyectil (es decir, la pistola
15 genética) (tal como se describe en la Patente Norteamericana No. 5,550,318; Patente Norteamericana No. 5,538,880; Patente Norteamericana No. 6,160,208; Patente Norteamericana No. 6,399,861; y Patente Norteamericana No. 6,403,865). Normalmente, se desea transformación nuclear, pero cuando es
20 deseable transformar en forma específica plastidios, tal como cloroplastos o amiloplastos, los plastidios de la planta pueden ser transformados utilizando un suministro transmitido por microproyectil de la molécula de ácido nucleico deseada en ciertas especies de planta, tal como por ejemplo, *Arabidopsis*,
25 tabaco, papa, y especies *Brassica*.



Se logra la transformación transmitida por *Agrobacterium* a través del uso de una bacteria de tierra ~~genéticamente diseñada~~ que pertenece al género *Agrobacterium*. Varias especies *Agrobacterium* transmiten la transferencia de un ADN específico conocido como "T-ADN", el cual puede ser genéticamente diseñado para llevar cualquier pieza de ADN deseada en muchas especies de plantas. Los eventos importantes que marcan el proceso de patogénesis transmitida por T-ADN son: inducción de genes de virulencia, y procesamiento y transferencia de T-ADN. Este proceso es el objeto de muchas revisiones. Ver por ejemplo, las publicaciones de Ream (1989) Ann. Rev. Phytopathol. 27: 583-618; Howard and Citovsky (1990) Bioassays 12: 103-8; Kado (1991) Crit. Rev. Plant Sci. 10: 1-32; Zambryski (1992) Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:465-90; Gelvin (1993) en Plantas Transgénicas, Kung and Wu eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 49-87; Binns and Howitz (1994) En Patogénesis Bacteriana en Plantas y Animales, Dang, ed., Berlin: Springer Verlag., pp. 119-38; Hooykaas and Beijersbergen (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 157-79; Lessl and Lanka (1994) Cell 77:321-4; y Zupan and Zambryski (1995) Annual Rev. Phytopathol. 27: 583-618.

Para seleccionar o calificar las células de planta transformadas sin importar la metodología de transformación, el ADN introducido en la célula puede contener un gen que funciona en un tejido de planta regenerable para producir un

compuesto que confiere en el tejido de la planta, resistencia a un compuesto de otra manera tóxico. Los genes de interés para utilizarse como marcadores seleccionables, clasificables o calificables, incluyen pero no se limitan a, β -glucuronidasa (GUS), proteína fluorescente verde (GFP), luciferasa, y genes de tolerancia a antibiótico o herbicida. Los ejemplos de genes de resistencia de antibióticos incluyen genes que confieren resistencia a las penicilinas, canamicina (y neomicina, G418, bleomicina); metotrexato (y trimetoprim); cloramfenicol; y tetraciclina. Por ejemplo, la resistencia a glifosato puede ser conferida a través de un gen de resistencia a herbicida. Della-Cioppa et al. (1987) *Bio/Technology* 5:579-84. También se pueden implementar otros dispositivos de selección, incluyendo, por ejemplo, y sin limitación, tolerancia a fosfotricina, bialafos, y mecanismos de selección positiva (Joersbro et al. (1998) *Mol. Breed.* 4:111-7), y están considerados dentro del alcance de las modalidades de esta invención.

Posteriormente se pueden dejar madurar en las plantas, las células transformadas identificadas mediante selección o clasificación y cultivadas en un medio adecuado que soporta la regeneración.

Los métodos aquí descritos pueden utilizarse con cualquier célula o tejido de planta transformable. Las células y tejidos transformables, tal como aquí se utilizan, incluyen pero no se limitan a, las células o tejidos que tienen la capacidad de

propagación adicional para dar surgimiento a una planta. Los expertos en la técnica reconocerán que una cantidad de células o tejidos de plantas son transformables, en donde después de la inserción del ADN exógeno y las condiciones de cultivo adecuadas, las células o tejidos de planta pueden formar una planta diferenciada. El tejido adecuado para estos propósitos, puede incluir pero no se limita a, embriones inmaduros, tejido escutelar, cultivos de célula de suspensión, inflorescencia inmadura, meristemo de brote, explantas nodales, tejido calloso, tejido hipocotiledóneo, cotiledoneos, raíces, y hojas.

Las células transformadas, identificadas mediante selección o clasificación y cultivadas en un medio adecuado que soporta la regeneración, posteriormente se pueden dejar madurar dentro de las plantas.

Los métodos descritos en esta invención, pueden ser utilizados con cualquier célula o tejido de planta transformable. Las células y tejidos transformables, tal como aquí se utiliza, incluyen pero no se limitan a, las células o tejidos que tienen la capacidad de propagación adicional para dar surgimiento a una planta. Los expertos en la técnica reconocen un número de células o tejidos de planta que son transformables, en los cuales después de la inserción del ADN exógeno y las condiciones de cultivo adecuadas, las células o tejidos de planta pueden formarse en una planta diferenciada. El tejido adecuado para estos propósitos puede incluir, pero no se limita a,

embriones inmaduros, tejido escutelar, cultivos celulares de suspensión, inflorescencia inmadura, meristemo de raíz, explantas nodales, tejido calloso, tejido hipocólito, cotiledones, raíces y hojas.

- 5 La regeneración, desarrollo, y cultivo de plantas procedentes de protoplastos o explantas de plantas transformadas, son conocidos en la técnica. Weissbach and Weissbach (1988) *Métodos para Biología Molecular (Methods for Plant Molecular Biology)*, (Eds.) Academic Press, Inc., San Diego, CA; Horsch et al, (1985) *Science* 227: 1229-31. Este proceso de regeneración y crecimiento normalmente incluye los pasos de seleccionar células transformadas y cultivar dichas células a través de las etapas usuales de desarrollo embrionario a través de la etapa de plántula enraizada. Los
- 10 embriones y semillas transgénicas son regenerados en forma similar. En este método, los transformadores se cultivan generalmente en la presencia de un medio selectivo, que selecciona las células transformadas en forma exitosa e induce la regeneración de raíces de plantas. Fraley et al, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803. Estos brotes se obtienen normalmente de 2 a 4 meses. Los brotes enraizados transgénicos resultantes, se plantan posteriormente en un medio adecuado para el crecimiento de plantas, tal como tierra. Las células que sobreviven la exposición a un agente selectivo, o
- 15 las células que han sido marcadas como positivas en un ensayo-
- 20
- 25

de clasificación, pueden ser cultivadas en un medio que soporta la regeneración de las plantas. Los brotes posteriormente pueden ser transferidos a un medio de inducción de raíz adecuado, que contiene el agente selectivo y un antibiótico para prevenir el crecimiento bacteriano. Muchos de los brotes, 5 desarrollarán raíces. Éstos son transplantados posteriormente a la tierra, u otro medio para permitir el desarrollo continuo de las raíces. El método, tal como se indicó anteriormente, variará generalmente dependiendo de la cepa de la planta empleada en particular, y por consiguiente, las particularidades de la 10 metodología están dentro de la elección del experto en la técnica.

La plantas transgénicas regeneradas, pueden ser autopolinizadas, para proporcionar plantas transgénicas 15 homocigóticas. Como alternativa, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas puede ser cruzado con plantas no transgénicas, preferentemente líneas consanguíneas de especies agrónomamente importantes. De manera inversa, el polen de plantas no transgénicas puede ser utilizado para 20 apolinar las plantas transgénicas regeneradas.

La planta transgénica puede pasar a su progenie, a lo largo de la secuencia de ácido nucleico transformada. La planta transgénica es preferentemente homocigótica para la secuencia de ácido nucleico transformada, y transmite dicha secuencia a 25 toda su descendencia al momento, y como resultado, de la

reproducción sexual. La progenie puede ser crecida de semillas producidas a través de la planta transgénica. Estas plantas adicionales posteriormente pueden ser autopolinizadas para generar una línea consanguínea real de plantas.

5 La progenie de estas plantas puede ser evaluada, entre otras cosas, para expresión genética. La expresión genética puede ser detectada a través de varios métodos comunes tales como manchado western, manchado northern, inmunoprecipitación, y ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente
10 Enlazado por Enzima). Las plantas transformadas también pueden ser analizadas para la presencia del ADN introducido y el nivel de expresión y/o perfil de ácido graso conferido por las moléculas de ácido nucleico y las moléculas de aminoácido de la presente invención. Los expertos en la técnica están al tanto
15 de los numerosos métodos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para análisis de plantas incluye, pero no se limitan a, manchados, southern o manchados northern, métodos a base de PCR, ensayos bioquímicos, métodos de clasificación fenotípica, evaluaciones
20 de campo, y ensayos de inmunodiagnóstico.

Los métodos para transformar específicamente plantas dicotiledóneas son bien conocidos para los expertos en la técnica. Se ha descrito la transformación y regeneración de plantas utilizando estos métodos para un número de cosechas,
25 incluyendo, pero sin limitarse a, los miembros de los géneros

de *Arabidopsis*, algodón (*Gossypium hirsutum*), frijol de soya (*Glycine max*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), y miembros del género *Brassica*. Los métodos para transformar plantas dicotiledóneas, principalmente a través del uso de *Agrobacterium tumefaciens* y obtener plantas transgénicas, han sido publicados para algodón (Patente Norteamericana No. 5,004,863; Patente Norteamericana No. 5,159,135; Patente Norteamericana No. 5,518,908); frijol de soya (Patente Norteamericana No. 5,569,834; Patente Norteamericana No. 5,416,011; McCabe, et al, (1988) *Biotechnology* 6: 923; Christou et al, (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-4; *Brassica* (Patente Norteamericana No. 5,463,174); coco (Cheng et al, (1996) *Plant Cell Rep.* 15: 653-7; McKently et al, (1995) *Plant Cell Rep.* 14: 699-703; papaya; y guisante (Grant et al, (1995) *Plant Cell Rep.* 15: 254-8).

Los métodos para transformar plantas monocotiledóneas también están disponibles en la técnica. La transformación y regeneración de plantas utilizando estos métodos, ha sido descrita para un número de cosechas que incluyen, pero no se limitan a, cebada (*Hordeum vulgare*); maíz (*Zea mays*); avenas (*Avena sativa*); hierba cana (*Dactylis glomerata*); arroz (*Oryza sativa*, incluyendo las variedades "indica" y "japonica"); sorgo (*Sorghum bicolor*); caña de azúcar (*Saccharum sp*); festuca de los prados (*Festuca arundinacea*); especies de césped (por ejemplo, *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum*

secundatum); trigo (*Triticum aestivum*); y alfalfa (*Medicago*
sativa). Es aparente para los expertos en la técnica que se
puede utilizar una cantidad de metodologías de transformación
y modificarse para la producción de plantas transgénicas
5 estables para cualquier número de cosechas de interés objetivo.

Cualquier planta puede ser elegida para utilizarse en los
métodos aquí descritos. Las plantas preferidas para
modificación de acuerdo con la presente invención incluyen
Arabidopsis thaliana, borraja (*Borago* spp.), Canola, castor
10 (*Ricinus communis*), cocoa bean (*Theobroma cacao*), maíz (*Zea*
mays), algodón (*Gossypium* spp), *Crambe* spp., *Cuphea* spp.,
lino (*Linum* spp.), *Lesquerella* y *Limnanthes* spp., Linola, berro
(*Tropaeolum* spp.), *Oenothera* spp., olivo (*Olea* spp.), palma
(*Elaeis* spp.), cacahuete (*Arachis* spp.), semilla de colza,
15 cártamo (*Carthamus* spp.), frijol de soya (*Glycine* y *Soja* spp.),
girasol (*Helianthus* spp.), tabaco (*Nicotiana* spp.), *Vernonia*
spp., trigo (*Triticum* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), arroz (*Oryza*
spp.), avena (*Avena* spp.), sorgo (*Sorghum* spp.), centeno
(*Secale* spp.) u otros miembros de la *Gramineae*.

20 Los expertos en la técnica pueden apreciar que se puede
utilizar una cantidad de metodologías de transformación y
modificarse para la producción de plantas transgénicas estables
de cualquier número de cosechas de interés objetivo.

E. Semillas Transgénicas

25 En algunas modalidades de la invención, una semilla

transgénica puede comprender un polipéptido de desaturasa
delta-9 que comprende una secuencia de aminoácido al menos
el 80% idéntica a la SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No:
14, SEQ ID No: 50, SEQ ID No: 51, SEQ ID No: 52, SEQ ID No:
5 72 y SEQ ID No: 73. En esta y otras modalidades, la semilla
transgénica puede comprender una secuencia de ácido nucleico
al menos el 60% idéntica a la SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ
ID No: 5, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID
No: 11, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID
10 No: 44, SEQ ID No: 45, SEQ ID No: 48, y SEQ ID No: 49. En
ciertas modalidades, un semilla transgénica puede exhibir
niveles disminuidos de ácidos grasos saturados, (por ejemplo,
ácidos grasos palmíticos y/o ácidos grasos esteáricos). Las
semillas pueden ser recolectadas de un planta transgénica fértil
15 y pueden ser utilizadas para crecimiento de generaciones de
progenie de plantas transformadas, incluyendo líneas de
plantas híbridas que comprenden al menos una secuencia de
ácido nucleico tal como se estableció anteriormente, y
opcionalmente, al menos un gen o construcción de ácido
20 nucleico de interés adicional.

Los ejemplos que se encuentran a continuación son
proporcionados para ilustrar ciertas características y/o
modalidades particulares. Estos ejemplos no deben ser
construidos para limitar la invención a las características o
25 modalidades particulares descritas.

EJEMPLOS

Ejemplo I: Clonación de desaturasas delta-9 acil-CoA y caracterización funcional en levadura con deficiencia de *ole1*

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

El gen de desaturasa delta-9 acil-CoA *Magnaporthe grisea* (MgD9DS) fue aislado de ADN genómico utilizando cebadores con base en la secuencia del NCBI/Broad Institute publicada
10 originalmente anotada como una "proteína hipotética", y que tiene 55.4% de identidad en el nivel de nucleótido con la desaturasa delta-9 acil-CoA *S. cerevisiae* (por ejemplo, *OLE1*). Se diseñaron cebadores directos y reversos, cada uno con 41 pares base de longitud. El cebador directo, Mg Δ 9F (SEQ ID No:
15 1), incluyó un sitio *EcoRI* en el extremo 5'. El cebador reverso, Mg9 Δ R (SEQ ID No: 2), contenía codones de detención en cada uno de los tres cuadros de lectura y un sitio *XhoI* terminal.

El gen MgD9DS fue amplificado mediante PCR utilizando el equipo PCR Takara EZ Taq™ (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga,
20 Japón) siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos a una temperatura de 94°C durante 30 segundos, a una temperatura de 60°C durante 60 segundos, y una extensión a una temperatura de 72°C durante 90 segundos. Se llevó a cabo
25 un paso de extensión final a una temperatura de 72°C durante

10 minutos. El producto PCR de 1,425 pares base esperado, fue cortado de un gel de agarosa y purificado utilizando columnas de rotación Montage de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Millipore, Billerica, MA). El fragmento purificado fue

5 clonado en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción TOPO fue transformada en células *E. coli* Top 10 químicamente competentes, de acuerdo con las condiciones del proveedor. Se aislaron colonias bacterianas que contienen el clon putativo. Se llevaron a cabo preparaciones de

10 miniplásmido con un equipo de aislamiento de ADN Macherey-Nagel Nucleospin (Machery-Nagel, Neumann-Neander-Strasse, Diiren, Alemania), y se digirió el ADN con enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Se identificaron clones positivos que contienen el fragmento de gen MgD9DS de 1,425 pb esperado.

15 La secuencia de nucleótidos se obtuvo a través de reacciones de secuenciación. La secuencia del fragmento amplificado mediante PCR se describe como la SEQ ID No: 3.

El análisis de secuencia reveló un pequeño intrón (90 pb) localizado en el extremo 5' del gen MgD9DS. El intrón se

20 eliminó utilizando PCR Splice Overlap Extension. El amplicón PCR resultante fue purificado con gel, clonado en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO®, y transformado en células *E. coli* Top 10. Se identificaron varios clones mediante análisis de las digestiones de la enzima de restricción del ADN purificado de

25 colonias transformadoras simples. Estos clones fueron

secuenciados para confirmar la presencia de un clon MgD9DS sin intrón. La secuencia resultante se describe como la SEQ ID No: 4.

Los genes MgD9DS, con y sin intrón, se subclonaron cada uno como un fragmento *EcoRI/XhoI* en un vector de expresión de levadura. Este vector de expresión de levadura contiene un gen de desaturasa delta-9 *Aspergillus nidulans* (AnD9DS) flanqueado por el promotor de desaturasa delta-9 *S. cerevisiae* y el 3'UTR/terminador de desaturasa delta-9. El gen de desaturasa delta-9 *Aspergillus nidulans* fue cortado en un fragmento *EcoRI/XhoI*, el cual se reemplazó ya sea con el fragmento que contiene el gen MgD9DS, o el fragmento que contiene el gen MgD9DS sin intrón. Se adelantaron dos clones que contienen el gen MgD9DS (uno con intrón, y uno sin intrón) para transformación *S. cerevisiae*.

Una cepa *S. cerevisiae* con deficiencia de desaturasa delta-9 (OFY093), la cual se mantuvo en un medio de Dextrosa de Peptona de Levadura (YPD) con Tween® 80, se transformó utilizando el equipo de Transformación de Levadura Alkali-Cation (Qbiogene, Montreal, Canada). Se identificaron cepas complementadas mediante crecimiento en un medio que no contenía Tween® 80 (suplemento de ácido graso monoinsaturado) o uracilo (Dropout Base con Agar con SC-URA). Las cepas complementadas fueron colonias simples purificadas tres veces en el medio selectivo. Las cepas

complementadas fueron verificadas en forma adicional mediante
amplificación PCR del gen de desaturasa delta-9, y
secuenciación del producto PCR. Además, las cepas que
contienen el clon MgD9DS, fueron revertidas a dependencia de
5 ácido graso y uracilo, pasando la cepa al menos tres veces en
el medio YPD + Tween 80®, posteriormente parchando las
cepas para DOBA SC-URA menos medio Tween® 80.

La expresión de la secuencia de codificación MgD9DS que
contiene intrón no fue exitosa, indicando que el intrón no fue
10 dividido por la maquinaria de levadura. La especificidad del
substrato de la cepa de levadura que contiene la secuencia de
codificación MgD9DS sin intrón, se caracterizó en forma
adicional mediante análisis FAME.

Clonación de desaturasas delta-9 Acil-CoA *Leptosphaeria*
15 *nodorum*

Se identificaron dos secuencias EST *Leptosphaeria*
nodorum EST (1,246 y 429 pares base, respectivamente) de una
recolección de ESTs *L. nodorum* utilizando una búsqueda
BlastN como compartiendo altos niveles de identidad de
20 secuencia (54.0% y 54.2% respectivamente) con la desaturasa
delta-9 acil-CoA *S. cerevisiae* (*OLE1*). Cuando se alinearon,
estas secuencias fueron el 64.6% idénticas entre si, lo que
sugiere la presencia de dos distintas desaturasa delta-9 acil-
CoA *Leptosphaeria nodorum*. Se aisló un gen LnD9DS-1 (SEQ
25 ID No: 5) clasificando una biblioteca de cADN *L. nodorum* con la

sonda de gen de 1,246 pb. La secuencia de este gen fue obtenida, y la secuencia de codificación fue aislada. Toda la secuencia de un gen LnD9DS-2 fue aislada primero mediante búsqueda BLAST de la secuencia de genoma *Leptosphaeria*
5 *nodorum* del Instituto Broad publicada con la secuencia EST de 429 pb. Esta búsqueda identificó el Supercontig Ln 1.4 como conteniendo un gen con 100% de homología con el fragmento de 429 pb, en donde el gen fue anotado como que codifica una "proteína hipotética". Posteriormente, el gen LnD9DS-2 fue
10 clonado de una biblioteca de cADN *Leptosphaeria nodorum* utilizando cebadores PCR con base en la secuencia de supercontig Ln 1.4. Las secuencias de cebador utilizadas fueron Lnd9FAD2F (SEQ ID No: 6) y Lnd9FAD2R (SEQ ID No: 7). El cebador directo fue diseñado con un sitio 5' *BamHI*, y el
15 cebador reverso contenía codones de detención en tres cuadros de lectura y un sitio *NcoI* terminal.

Un alícuota de biblioteca de cADN *Leptosphaeria nodorum* fue diluida 1/10 para proporcionar 400 ng de ADN de plantilla para la reacción PCR. Se llevó a cabo la amplificación PCR
20 utilizando un equipo PCR Takara EZ Taq™ siguiendo las condiciones de amplificación recomendadas de temperatura de 94°C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos a una temperatura de 94°C durante 30 segundos, temperatura de 60°C durante 60 segundos, y una extensión a una temperatura de 72°C durante
25 90 segundos. Se llevó a cabo un paso de extensión final a una

temperatura de 72°C durante 10 minutos. El producto de 1,370 pares base esperado fue cortado de un ~~gel de agarosa~~, y purificado utilizando columnas de rotación Montage de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El fragmento purificado fue clonado en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO®. La reacción de ligadura fue transformada en células *E. coli* Top 10 químicamente competentes de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se aislaron colonias que contienen un clon putativo. Se llevaron a cabo preparaciones de miniplásmido con columnas Macherey-Nagel Nucleospin, y se digirió el ADN con enzimas de restricción *Bam*HI y *Nco*I. Se identificaron y secuenciaron los clones LnD9DS-2 putativos.

Al momento de la secuenciación, un clon LnD9DS-2 (SEQ ID No: 8) fue confirmado mediante comparación con la secuencia de "proteína hipotética". Se identificó un cambio conservador en la secuencia de LnD9DS-2. Se cambió el codón TGC (cisteína) a AGC (serina) mediante sustitución de una adenina por una timidina en una posición base 271, en donde el codón es traducido al aminoácido 89 de la secuencia publicada. Este es un cambio conservador, y la cisteína no se encontró como un aminoácido altamente conservado entre múltiples hongos filamentosos, de modo que no se intentó la corrección.

Los genes LnD9DS-1 y LnD9DS-2 de las SEQ ID Nos: 5 y 8, respectivamente, fueron clonados en un vector de expresión de levadura. Los clones que contienen cualesquiera de las

secuencias de codificación LnD9DS-1 y LnD9DS-2, fueron confirmados mediante análisis de enzima de restricción y secuenciación de ADN.

Se transformó una cepa *S. cerevisiae* con deficiencia de desaturasa delta-9 (OFY093), la cual se mantiene en el medio YPD con Tween® 80, utilizando el Equipo de Transformación de Levadura Alkali-Cation de Qbiogene. Las cepas complementadas fueron identificadas mediante crecimiento en el medio que no contiene Tween® 80 (suplemento de ácido graso monoinsaturado) o uracilo (DOB A sc-ura). Las cepas complementadas fueron colonias simples purificadas tres veces en un medio selectivo. Las cepas complementadas fueron verificadas en forma adicional mediante amplificación PCR del gen de desaturasa delta-9 y mediante secuenciación del producto PCR. Además, las cepas que contienen el clon LnD9DS-2 fueron revertidas a dependencia de ácido graso y uracilo, pasando cada cepa al menos tres veces en el medio YPD + Tween® 80, posteriormente parchando las cepas a un medio DOBA SC-URA menos Tween® 80. Las especificidades del substrato de las cepas de levadura que contienen cualquiera de las secuencias de codificación LnD9DS-1 o LnD9DS-2, fueron caracterizadas en forma adicional mediante análisis FAME.

Clonación y Transformación de *S. cerevisiae* con Deficiencia de Desaturasa Delta-9 con el Gen HzD9DS

Se cortó un gen sintético optimizado por planta que
codifica la desaturasa delta-9 acil-CoA *Helicoverpa zea*
(HzD9DS) (identificada como HzPGDS2 en la publicación de
Rosenfield et al. (2001) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31(10): 949-
5 64) de DASPICO89 (que se describe más adelante) en un
fragmento de *BamHI/XhoI* y se purificó con gel utilizando
columnas de rotación Montage. Este fragmento fue ligado en
sitios de enzima de restricción correspondientes de un vector
de expresión de levadura descrito anteriormente y transformado
10 en la cepa *E. coli* DH5 α utilizando técnicas de biología
molecular estándar y los protocolos del proveedor (Invitrogen,
Carlsbad, CA).

Después del análisis de restricción y secuenciación de
ADN, se seleccionó un clon que contiene el gen HzD9DS para
15 transformación en la cepa *S. cerevisiae* con deficiencia de
desaturasa delta-9, OFY093. La cepa OFY093, la cual se
mantiene en el medio YPD con Tween® 80, fue transformada
utilizando el Equipo de Transformación de Levadura Alkali-
Cation de Qbiogene. Se identificaron cepas complementadas
20 creciendo en un medio que no contiene Tween® 80 (suplemento
de ácido graso) y uracilo (DOBA SC-URA). Las cepas
complementadas putativas fueron colonias simples purificadas
tres veces en un medio selectivo. Las cepas complementadas
fueron verificadas en forma adicional mediante: i) extracción del
25 ADN de plásmido, utilizando el equipo de purificación de

plásmido de Levadura Qbiogene, seguido de amplificación PCR
utilizando los cebadores específicos del gen HzD9DS; ii)
secuenciación del producto de PCR específico del gen HzD9DS;
y iii) reversión de la cepa al ácido graso y dependencia de
5 URA-3, pasando la cepa al menos tres veces en el medio YPD +
Tween® 80, posteriormente parchando las cepas para el medio
DOBA SC-URA menos Tween® 80. La especificidad del
substrato de una cepa de levadura HzD9DS complementada
verificada, fue caracterizada en forma adicional mediante
10 análisis FAME.

Análisis de LnD9DS-1, LnD9DS-2, MgD9DS, y HzD9DS
expresado en una cepa de levadura con deficiencia de OLE1

Tal como se estableció, *supra*, se clonaron tres genes de
desaturasa delta-9 acil-CoA (D9DS) de ejemplo a partir del
15 hongo patógeno de planta, *Magnaporthe grisea* (MgD9DS) y
Leptosphaeria nodorum (LnD9DS-1 y LnD9DS-2). Estos genes y
sus proteínas codificadas aún no han sido previamente
caracterizados. Las desaturasas delta-9 acil-CoA catalizan la
formación de un enlace cis doble entre los átomos de carbono 9
20 y 10 de los tioésteres de acilo graso de 14-, 16-, y 18-carbonos
de la Coenzima A, dando como resultado la producción de ácido
miristoleico (14:1), palmitoleico (16:1), u oleico (18:1),
respectivamente. Los efectos relacionados con la biología
específica del organismo son eliminados expresando los genes
25 de desaturasa delta-9 acil-CoA fúngicos diferentes en el mismo

contexto biológico. Posteriormente se llevó a ~~cabo la expresión~~
de los genes de desaturasa delta-9 acil-CoA fúngicos,
utilizando el promotor de gen *ole1* endógeno dentro de una cepa
de levadura OFY093 con deficiencia de desaturasa CoA
5 palmitoil-estearoil (OLE1). Por lo tanto, las diferencias
observadas en la especificidad del sustrato de ácido graso en
este sistema, son atribuibles a la desaturasa delta-9 fúngica
expresada en la cepa *S. cerevisiae* complementada.

Las especificidades del sustrato de las desaturasas
10 MgD9DS, LnD9DS-1 y LnD9DS-2 CoA expresadas en la cepa
OYF093 fueron caracterizadas con OFY093 complementado con
el AnD9DS (*sdeA*) descrito en la Publicación Internacional
WO/1999/050430. Se transformó una construcción de expresión
de levadura que contiene el gen AnD9DS, cuya expresión se
15 lleva a cabo a través del promotor del gen *ole1*, fue
transformada en la cepa *S. cerevisiae* OFY093 y expresada
utilizando el protocolo antes descrito.

Las cepas *S. cerevisiae* complementadas fueron crecidas
en un medio mínimo sin suplemento de ácido graso a una
20 temperatura de 30°C durante 24 horas. Se llevó a cabo el
análisis FAME cuantitativo en pellets de célula lavada y
liofilizada. Los resultados de este análisis se muestran en la
Tabla 1. LnD9DS-2 promueve la formación de C14:1 y C16:1, en
tanto que LnD9DS-1 y MgD9DS tienen preferencia por C18:0, tal
25 como se indica a través de la proporción de los ácidos grasos

C16:1/18:1 en los análisis composicionales de ácido graso de levadura.

Tabla 1: Comparación de composición de ácido graso de la cepa con deficiencia de *ole1* que expresa cuatro diferentes desaturasas fúngicas

Desaturasa	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C16:1/ 16:0	C18:1/ 18:0	C16:1/ 18:1
LnD9DS-1	1.5	0.0	36.5	8.7	1.8	51.5	0.2	28.2	0.17
LnD9DS-2	1.0	0.1	26.6	38.1	6.3	27.9	1.4	4.4	1.37
AnD9DS	0.5	0.0	26.3	7.8	2.0	63.4	0.3	31.7	0.12
MgD9Ds	0.5	0.0	22.7	9.1	1.8	65.9	0.4	37.0	0.14
levadura tipo silvestre	0.6	0.0	9.6	38.6	6.9	44.3			
<i>ole1</i> -nulo + Tween® 80	2.6	0.4	38.0	10.9	7.8	40.4			
Vector vacío + Tween® 80	2.2	0.3	40.3	8.7	8.7	39.8			

Las desaturasas novedosas fueron comparadas en forma adicional con la desaturasa delta-9 estearoil-CoA *S. cerevisiae* nativa (*ole1*) transferida en el mismo ambiente de expresión recombinante. Se construyó un vector de expresión de levadura que contiene la secuencia de nucleótido de *S. cerevisiae* descrita en la Publicación Internacional WO/2000/011012. La construcción de expresión de levadura que contiene la desaturasa delta-9 estearoil-CoA *S. cerevisiae* nativa fue transformada en la cepa OFY093 *S. cerevisiae* y expresada utilizando el protocolo descrito anteriormente. Otra desaturasa delta-9 acil-CoA no fúngica de la especie de insecto, *Helicoverpa zea* (HzD9DS), también fue evaluada en estos

experimentos.

Las cepas *S. cerevisiae* complementadas ~~que contienen~~ uno de los genes MgD9DS, LnD9DS-2 y HzD9DS se crecieron en un Caldo Drop Out SC-URA. Se creció una cepa de control, 5 pDAB467EV-1 (pDAB467B/N transformada en OFY093 mediante la metodología de Transformación de Levadura descrita anteriormente), en DOB SC-URA + Tween® 80, y la cepa *S. cerevisiae* con deficiencia de desaturasa delta-9 de origen, OFY093, fue crecida en DOB scAA + Tween® 80. Los cultivos 10 fueron inoculados con un lazo de células de una placa de rayado del mismo medio que contiene 1.5% de agar. Las cepas fueron crecidas a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Los cultivos fueron girados en 6,000 rpm durante 10 minutos. Los pelets fueron lavados en agua, nuevamente se giraron en 15 6,000 rpm durante 10 minutos, y posteriormente se congelaron a una temperatura de -20°C hasta que se llevó a cabo el análisis FAME. Se analizaron tres conjuntos de cultivos de expresión.

Los gránulos de levadura secados por congelación fueron 20 saponificados en metanol que contiene 10% (p/v) de NaOH. Se eliminaron con hexano los contaminantes de lípido no saponificables (esteroles). La reacción de metanol fue acidificada mediante la adición de H₂SO₄, y los ácidos grasos protonados fueron extraídos con hexano. La fracción de hexano 25 aislada se secó, y los ácidos grasos fueron metilados con 0.5 N

MeOHCl a una temperatura de 80°C durante 30 minutos. Los FAMEs resultantes fueron extraídos con hexano que contiene éster metílico de undecanoato como un estándar interno. Los extractos FAME fueron analizados con un Detector de Ionización de Flama-Cromatografía de Gas HP6890 (Santa Clara, CA) equipado con una columna capilar BPX 70 (15 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) de SGE (Austin, TX). Los FAMEs se separaron en un gradiente de temperatura utilizando helio como el gas transportador. Cada especie FAME fue identificada mediante tiempo de retención, y cuantificada mediante la inyección de una mezcla de referencia de aceite de semilla de colza FAME de Matreya, LLC (Pleasant Gap, PA), como el estándar de calibración.

La **Tabla 2**, muestra la composición de ácido graso (como %FAMEs) de células de levadura OFY093 con deficiencia de ole1 que expresan diversas desaturasas delta-9 acil-Co-A de ejemplo. Todas las cepas crecieron bien y fueron complementadas totalmente por las desaturasas introducidas sin requerimiento alguno de MUFAs exógeno (ácidos grasos monoinsaturados).

Tabla 2: Composición de ácido graso (como % Total de FAMEs) de la cepa de levadura OFY093 con deficiencia de ole1 que expresa desaturasas delta-9 acil Co-A. (La Desviación Estándar está en paréntesis).

Desaturasa	n	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1
LnD9DS-2	7	14.7 (0.7)	1.4 (1.0)	26.6 (4.5)	38.8 (2.8)	6.0 (1.3)	25.4 (4.4)
HxD9DS	6	2.6 (1.3)	0.9 (0.5)	34.7 (6.8)	37.5 (4.2)	6.0 (1.1)	18.4 (4.1)
ole1	6	1.1 (0.4)	0.6 (0.4)	14.4 (2.6)	49.2 (1.6)	5.6 (1.1)	24.0 (1.1)
AnD9DS	8	0.5 (0.3)	0.2 (0.2)	23.5 (2.2)	93.3 (3.0)	2.1 (0.5)	64.6 (3.2)
MgD9DS	2	0.9 (0.0)	0.1 (0.0)	21.2 (0.2)	12.1 (0.1)	1.6 (0.1)	64.2 (0.3)

Estos datos muestran que la composición de ácido graso de las cepas de levadura complementadas, varía de acuerdo con el gen introducido. LnD9DS-2 produce cantidades relativamente altas de C16:1, como lo hace HxD9DS y *ole1*, en donde AnD9DS y MgD9DS producen cantidades relativamente altas de C18:1.

El nivel diferencial de conversión con base en la longitud de cadena, puede ser mostrado en forma adicional calculando la proporción de MUFA relativa a los ácidos grasos totales para cada longitud de cadena de ácido graso; C14, C16, o C18. Estos datos muestran la conversión relativamente alta de C16:1 para LnD9DS-2 y HxD9DS, y de C18:1 para AnD9DS y MgD9DS.

Tabla 3. Las cuatro filas inferiores representan muestras de control complementadas con tergitol agregado, ácidos grasos insaturados o Tween[®]. Las muestras con diferentes letras son significativamente diferentes, tal como se determina a través de la Prueba de Tukey-Kramer llevada a cabo en el paquete de software estadístico JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Tabla 3: Proporción de MUFA de ácidos grasos totales para cada longitud de cadena ($C_{xx}:1/(C_{xx}:0 + C_{xx}:1)$).

Desaturasa	C14	C16*	C18
LnD9DS-2	0.49	0.60 (b)	0.81 (b)
HzD9DS	0.30	0.52 (b)	0.75 (c)
ole1	0.34	0.79 (a)	0.81 (b)
AnD9DS	0.25	0.28 (c)	0.97 (a)
MgD9DS	0.07	0.36 (c)	0.98 (a)
Ninguno + tergitol	0.06	0	0
Ninguno + tergitol + ricinoleico	0.07	0	0.01
Ninguno + tergitol + linoleico	0	0	0.04
Ninguno + tween	0.65	0.23	0.87

*C16 MUFA incluye ácido cis-vaccénico (C18:1 Δ 11), tal como se deriva de la elongación de ácido palmitoleico (C16:1 Δ 9).

Filogenia de desaturasas acil-CoA fúngicas

El análisis filogenético de múltiples secuencias de aminoácido de desaturasa delta-9 acil-CoA fúngica, sugiere que LnD9DS-2 es distinto a las desaturasas delta-9 con preferencia por 18:0. Por lo tanto, hemos hipotetizado que la caracterización de otras desaturasas delta-9 fúngicas asociadas en forma cercana con cualquiera de las desaturasas delta-9 con preferencia por 18:0, o con LnD9DS-2, pueden identificar desaturasas con un rango de actividades de 18:0 o 16:0. Nuestra hipótesis anticipa que una desaturasa delta-9 fúngica que está asociada en forma más cercana con LnD9DS-2, tendrá actividad 16:0 incrementada.

Una búsqueda de las bases de datos de secuencia de ADN públicas (Broad Institute, NCBI, etc.) no identificó ninguna secuencia de gen anotada en forma específica en las desaturasas delta-9 en *Magnaporthe grisea* o *Leptosphaeria nodorum*. El análisis Pfam de las secuencias de Instituto Broad que fueron identificadas dentro de esta descripción, indica que estas proteínas contienen el citocromo B5 y los motivos de desaturasa que también se encuentran en otras desaturasas delta-9 acil-CoA fúngicas. Sin embargo, las proteínas no han sido identificadas previamente como desaturasas delta-9 acil-CoA. Hemos demostrado esta función de estas proteínas mediante complemento en levadura, estudios inversos y análisis de secuencia de ADN.

La relación de diversas secuencias de gen de desaturasa fúngica fue analizada en forma filogenética utilizando el método de unión de vecinos a través del paquete de software MEGA. Tamura *et al.* (2007) Mol. Biol, and Evolution 24:1596-9. La figura 1, ilustra este análisis filogenético de las secuencias de desaturasa fúngica. Estas secuencias fueron recuperadas mediante las búsquedas BlastN de la base de datos de la secuencia NCBI utilizando las secuencias de aminoácido AnD9DS (sdeA). LnD9DS-1 y MgD9DS comparten mayores niveles de identidad de secuencia entre sí, en comparación con LnD9DS-2. Además, una alineación ClustalW de LnD9DS-1, LnD9DS-2 y MgD9DS muestra la divergencia de LnD9DS-2 de

LnD9DS-1 y MgD9DS. Figuras 2a a 2d. Las secuencias de nucleótido de LnD9DS-1 y MgD9DS, comparten un mayor número de pares base en común.

La Tabla 4 y las figuras 3a y 3b, ilustran en forma adicional la relación filogenética de proteínas recientemente identificadas, LnD9DS-1, LnD9DS-2 y MgD9DS, así como AnD9DS y la desaturasa de levadura, ScOLE1. Las secuencias de aminoácidos LnD9DS-1, MgD9DS y AnD9DS (sdeA) comparten un mayor porcentaje de identidad entre sí, en comparación con LnD9DS-2. La conservación de la identidad de aminoácido nos permite predecir que la especificidad del substrato para acil-CoA 18:0, depende de la secuencia conservada compartida entre LnD9DS-1, MgD9DS y AnD9DS (sdeA). En comparación, la especificidad del substrato acil-CoA de LnD9DS-2, es preferencial para 16:0 como resultado de su secuencia de aminoácido divergente.

Tabla 4: Identidad de aminoácido de diversas secuencias de desaturasa fúngicas alineadas utilizando ClustalW.

	LnD9DS-1	LnD9DS-2	MgD9DS	Levadura OLE1
AnD9DS (sdeA)	81%	61%	75%	49%
LnD9DS-1	--	61%	75%	47%
LnD9DS-2	61%	--	62%	49%
MgD9DS	75%	62%	--	49%

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

y *Leptosphaeria nodorum*

Para obtener una mayor expresión ~~de los genes de~~ desaturasa delta-9 fúngica en canola, diseñamos estos genes de modo que fueran expresados en forma más efectiva en
5 células de canola transgénicas que contienen el gen heterólogo. El análisis extenso de la secuencia de ADN de las regiones de codificación de desaturasa delta-9 *Magnaporthe grisea*,
Helicoverpa zea y *Leptosphaeria nodorum* nativa aquí descritas como SEC ID NO:9, SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11,
10 respectivamente, revelaron la presencia de diversos motivos de secuencia que se consideran perjudiciales para la expresión óptima de la planta, así como una composición de codón no óptima para dicha expresión de planta óptima. Con el objeto de diseñar genes optimizados que codifican la proteína de
15 desaturasa delta-9, generamos secuencias de ADN *in silico* que son más "tipo planta" (y específicamente más "tipo canola") por naturaleza, en las cuales las modificaciones de secuencia no obstaculizan la traducción o crean inestabilidad de mRNA.

Para diseñar genes optimizados por planta que codifican
20 la desaturasa delta-9, las secuencias de ADN fueron diseñadas para codificar la secuencia de aminoácido de las desaturasas de proteína, utilizando un código genético redundante establecido a partir de una tabla de inclinación de codón, compilada de las secuencias de codificación de proteína de las
25 plantas huésped en particular (por ejemplo, canola). Los usos

de codón preferidos para canola se muestran en la tabla 5. Las columnas C y G de la tabla 5, presentan las distribuciones (en % de uso para todos los codones de dicho aminoácido) de codones sinónimos de cada aminoácido, tal como se encuentra en las regiones de codificación de *Brassica napus*. Es evidente que algunos codones sinónimos para ciertos aminoácidos se encuentran únicamente de manera rara en genes de planta (por ejemplo CGG en canola). Un codón fue considerado como utilizado raramente, si está representado en aproximadamente el 10% o menos del tiempo para codificar el aminoácido relevante en genes de cualquier tipo de planta (indicado mediante "DNU" en columnas D y H de la tabla 5). Para equilibrar la distribución de las selecciones de codón restantes para un aminoácido, se calculó una representación Promedio Ponderada para cada codón, utilizando la fórmula:

% Promedio Ponderado de C1 = $1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{etc.}) \times \%C1 \times 100$, en donde C1 es el codón en cuestión y %C2, %C3, etc., representa los promedios de los % de valores para *Brassica napus* de los codones sinónimos restantes (% de valores promedio para los codones relevantes son tomados de las columnas C y G) de la tabla 5.

El valor de % Promedio Ponderado para cada codón se proporciona en las columnas D y H de la Tabla 5.

Tabla 5: Representación de codón sinónimo en regiones de codificación de genes de canola (*B. napus*) (Columnas C y

G). Los valores para un conjunto de representación de codón inclinado-equilibrado para un diseño de gen sintético optimizado por planta, se encuentran en las columnas D y H.

5

10

15

20

A	B	C	D	E	F	G	H
Amino Ácido	Codón	Canola %	Promedio Ponderado	Amino Ácido	Codón	Canola %	Promedio Ponderado
ALA (A)	GCA	23.3	23.3	LEU (L)	CTA	10.1	DNU
	GCC	21.2	21.2		CTC	22.8	28.5
	GCG	14.2	14.2		CTG	11.6	14.6
	GCT	41.3	41.3		CIT	25.2	31.6
ARG (R)	AGA	31.8	43.8	LYS (K)	TTA	10.1	DNU
	AGG	22.1	30.5		TTG	20.2	25.3
	CGA	9.9	DNU	MET (M)	AAA	44.6	44.6
	CGC	8.9	DNU		AAG	55.4	55.4
	CGG	8.6	DNU		ATG	100.0	100.0
ASN (N)	CGT	18.6	25.7	PHE (F)	TTC	58.6	58.6
	AAC	62.6	62.6		TTT	41.4	41.4
ASP (D)	AAT	37.4	37.4	PRO (P)	CCA	29.6	29.6
	GAC	42.5	42.5		CCC	14.6	14.6
CYS (C)	GAT	57.5	57.5		CCG	18.4	18.4
	TGC	49.2	49.2		CCT	37.3	37.3
END	TGT	50.8	50.8	SER (S)	AGC	16.0	17.9
	TAA	38.5	DNU		AGT	14.1	15.8
	TAG	22.1	DNU		TCA	18.2	20.4
GLN (Q)	TGA	39.4	100.0		TCC	16.7	18.7
	CAA	50.0	50.0		TGC	10.7	DNU
GLU (E)	CAG	50.0	50.0	THR (T)	TCT	24.3	27.2
	GAA	43.6	43.6		ACA	26.3	26.3
GLY (G)	GAG	56.4	56.4		ACC	26.9	26.9
	GGA	36.4	36.4		ACG	16.9	16.9
	GGC	16.2	16.2	ACT	30.0	30.0	
	GGG	15.2	15.2	TRP (W)	TGG	100.0	100.0
HIS (H)	GGT	32.1	32.1	TYR (Y)	TAC	59.4	59.4
	CAC	49.6	49.6		TAT	40.6	40.6
ILE (I)	CAT	50.4	50.4	VAL (V)	GTA	10.8	DNU
	ATA	21.1	21.1		GTC	24.1	27.0
	ATC	42.7	42.7		GTG	28.3	31.7
	ATT	36.2	36.2		GTT	36.8	41.3

**NA = No Aplicable

25

*** DNU = No Utilizar

Las nuevas secuencias de ADN que codifican esencialmente la secuencia de aminoácido de las desaturasas delta-9 *Magnaporthe grisea*, *Helicoverpa zea* y *Leptosphaeria nodorum* de las SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13 y SEC ID NO: 5 14, respectivamente, fueron diseñadas para expresión óptima en canola utilizando una primera y segunda distribución de codón de elección de codones utilizados frecuentemente encontrados en genes de canola. Las nuevas secuencias de ADN difieren de las secuencias de ADN nativas que codifican 10 las proteínas de desaturasa delta-9 mediante la sustitución de codones preferidos por la planta (es decir, primero preferido, segundo preferido, tercero preferido, o cuarto preferido) para especificar un aminoácido adecuado en cada posición dentro de la secuencia de aminoácido de proteína.

15 Se inició el diseño de las secuencias de ADN optimizadas por la planta mediante traducción inversa de las secuencias de proteína de SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13 y SEC ID NO: 14, utilizando la tabla de inclinación de codón de canola construida a partir de las columnas D y H de la tabla 5. Posteriormente las 20 secuencias iniciales fueron modificadas mediante cambios de codón de compensación (reteniendo al mismo tiempo la representación de codón promedio ponderada general) para eliminar los sitios de reconocimiento de enzima de restricción, eliminar las estructuras secundarias de intrahebra altamente 25 estables, y eliminar otras secuencias que pueden ser

perjudiciales para manipulaciones de clonación o expresión del gen diseñado en las plantas. Posteriormente las secuencias de ADN se volvieron a analizar para sitios de reconocimiento de enzima de restricción, que pudieran haber sido creados mediante las modificaciones. Posteriormente los sitios identificados fueron modificados en forma adicional reemplazando los codones relevantes con primeros, segundos, terceros o cuartos codones preferidos de elección. Las secuencias modificadas fueron analizadas en forma adicional y modificadas en forma adicional para reducir la frecuencia de los dobletes TA y CG, y para incrementar la frecuencia de los dobletes TG y CT. Además de estos dobletes, los bloques de secuencia que tienen más de aproximadamente seis residuos consecutivos de [G+C] o [A+T], fueron modificados reemplazando los codones de primera o segunda elección, etc., con otros codones de elección preferidos. Los codones raramente utilizados no fueron incluidos en un grado sustancial en el diseño del gen, y fueron utilizados únicamente cuando fue necesario acomodar un diferente criterio de diseño que el de la composición de codón *per se* (por ejemplo, adición o eliminación de sitios de reconocimiento de restricción). Las secuencias de ADN de desaturasa optimizadas por canola sintética de ejemplo diseñadas a través de este proceso, se describen en las SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16 y SEC ID NO: 17.

Las secuencias de ADN resultantes, tal como se representan mediante SEC ID NOs: 15-17, tienen un mayor grado de diversidad de codón y una composición base deseable. Además, estas secuencias contienen sitios de reconocimiento de enzima de restricción colocados en forma estratégica, y carecen de secuencias que pueden interferir con la transcripción del gen, con la traducción del mRNA del producto. Las tablas 6 a 8 presentan una comparación de las composiciones de codón de las regiones de codificación para las proteínas de desaturasa delta-9, tal como se encuentran en el gen nativo, y en las versiones optimizadas por la planta, y se comparan ambas con las recomendaciones de composición de codón para una secuencia optimizada por la planta, tal como se calcula a partir de las columnas D y H de la Tabla 5.

15

20

25

Tabla 6: Composiciones de codón de regiones de codificación para una proteína MgD9DS. La región de codificación de desaturasa *M. grisea* nativa se compara con una versión Optimizada por la Planta.

Amino Ácido	Codón	Gen Nativo #	Gen Nativo %	Gen de Planta Opt. #	Gen de Planta Opt. %	Remb. Planta Opt.	Amino Ácido	Codón	Gen Nativo #	Gen Nativo %	Gen de Planta Opt. #	Gen de Planta Opt. %	Remb. Planta Opt.
ALA (A)	GCA	4	10.5	10	26.3	23.3	LEU (L)	CTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	GCC	18	47.4	8	21.1	21.2		CTC	11	28.9	11	28.9	28.5
	GCG	3	7.9	4	10.5	14.2		CTG	11	28.9	5	13.2	14.6
	GCT	13	34.2	16	42.1	41.3		CTT	12	31.6	12	31.6	31.6
ARG (R)	AGA	2	9.5	10	47.6	43.8	TTA	0	0.0	0	0.0	0.0	
	AGG	1	4.8	6	28.6	30.5	TTG	4	10.5	10	26.3	25.3	
	CGA	2	9.5	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	1	3.4	13	44.8	44.6
	CGC	12	57.1	0	0.0	0.0		AAG	28	96.6	16	55.2	55.4
	CGG	0	0.0	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	7	100	7	100	100.0
	CGT	4	19.0	5	23.8	25.7	PHE (F)	TTC	17	89.5	11	57.9	58.6
ASN (N)	AAC	23	100.0	14	60.9	62.6		TIT	2	10.5	8	42.1	41.4
ASP (D)	AAT	0	0.0	9	39.1	37.4	PRO (P)	CCA	0	0.0	6	28.6	29.6
	GAC	17	68.0	11	44.0	42.5		CCC	9	42.9	3	14.3	14.6
CYS (C)	GAT	8	32.0	14	56.0	57.5		CCG	5	23.8	4	19.0	18.4
	TGC	2	66.7	1	33.3	49.2		CCT	7	33.3	8	38.1	37.3
END	TGT	1	33.3	2	66.7	50.8	SER (S)	AGC	3	10.7	5	17.9	17.9
	TAA	0	0.0	0	0.0	0.0		AGT	0	0.0	4	14.3	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	5	17.9	7	25.0	20.4
TGA	1	100.0	1	100.0	100.0	TCC		9	32.1	4	14.3	18.7	
GLN (Q)	CAA	2	9.5	11	52.4	50.0		TCG	9	32.1	0	0.0	0.0
	CAG	19	90.5	10	47.6	50.0		TCT	2	7.1	8	28.6	27.2
GLU (E)	GAA	1	6.7	7	46.7	43.6	THR (T)	ACA	4	16.7	6	25.0	26.3
	GAG	14	93.3	8	53.3	56.4		ACC	15	62.5	7	29.2	26.9
GLY (G)	GGA	8	19.5	15	36.6	36.4		ACG	1	4.2	4	16.7	16.9
	GGC	13	31.7	7	17.1	16.2		ACT	4	16.7	7	29.2	30.0
	GGG	1	2.4	6	14.6	15.2	TRP (W)	TGG	21	100	21	100	100.0
	GGT	19	46.3	13	31.7	32.1	TYR (Y)	TAC	16	94.1	10	58.8	59.4
HIS (H)	CAC	19	95.0	10	50.0	49.6	TAT	1	5.9	7	41.2	40.6	
	CAT	1	5.0	10	50.0	50.4	VAL (V)	GTA	1	2.5	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	1	4.2	5	20.8	21.1		GTC	21	52.5	11	27.5	27.0
	ATC	15	62.5	10	41.7	42.7		GTG	4	10.0	13	32.5	31.7
	ATT	8	33.3	9	37.5	36.2		GTT	14	35.0	16	40.0	41.3
Totales 232						232	Totales 244						244

Tabla 7: Composiciones de codón de regiones de codificación para una proteína HzD9DS. La región de codificación de desaturasa *H. zea* nativa se compara con una

versión Optimizada por la Planta.

Amino Ácido	Codón	Gen	Gen	Gen de	Gen de	Remb.	Amino Ácido	Codón	Gen	Gen	Gen de	Gen de	Remb.
		Nativo #	Nativo %	Planta Opt. #	Planta Opt. %	Planta Opt.			Nativo #	Nativo %	Planta Opt. #	Planta Opt. %	Planta Opt.
ALA (A)	GCA	4	11.4	9	25.7	23.3	LEU (L)	CTA	2	5.9	0	0.0	0.0
	GCC	7	20.0	7	20.0	21.2		CTC	8	23.5	10	29.4	28.5
	GCG	8	22.9	4	11.4	14.2		CTG	14	41.2	6	17.6	14.6
	GCT	16	45.7	15	42.9	41.3		CTT	6	17.6	10	29.4	31.6

Amino Ácido	Codón	Gen	Gen	Gen de	Gen de	Remb.	Amino Ácido	Codón	Gen	Gen	Gen de	Gen de	Remb.
		Nativo #	Nativo %	Planta Opt. #	Planta Opt. %	Planta Opt.			Nativo #	Nativo %	Planta Opt. #	Planta Opt. %	Planta Opt.
ARG (R)	AGA	1	7.7	6	46.2	43.8	TTA	2	5.9	0	0.0	0.0	
	AGG	5	38.5	4	30.8	30.5		TTG	2	5.9	8	23.5	25.3
	CGA	2	15.4	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	11	44.0	10	40.0	44.6
	CGC	5	38.5	0	0.0	0.0		AAG	14	56.0	15	60.0	55.4
	CGG	0	0.0	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	8	100	8	100	100.0
	CGI	0	0.0	3	23.1	25.7	PHE (F)	TTC	20	83.3	14	58.3	58.6
ASN (N)	AAC	13	72.2	11	61.1	62.6		TTT	4	16.7	10	41.7	41.4
AAT	AAT	5	27.8	7	38.9	37.4	PRO (P)	CCA	1	6.3	5	31.3	29.6
	ASP (D)	GAC	16	64.0	12	48.0		42.5	CCC	5	31.3	3	18.8
GAT	GAT	9	36.0	13	52.0	57.5		CCG	2	12.5	2	12.5	18.4
	CYS (C)	TGC	1	100.0	0	0.0		49.2	CCT	8	50.0	6	37.5
TGT	TGT	0	0.0	1	100.0	50.8	SER (S)	AGC	2	12.5	3	18.8	17.9
	END	TAA	1	100.0	0	0.0		0.0	AGT	1	6.3	3	18.8
TAG	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	1	6.3	3	18.8	20.4
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	37.5	3	18.8	18.7
GLN (Q)	CAA	2	33.3	3	50.0	50.0		TCG	3	18.8	0	0.0	0.0
	CAG	4	66.7	3	50.0	50.0		TCT	3	18.8	4	25.0	27.2
GLU (E)	GAA	7	63.6	5	45.5	43.6	THR (T)	ACA	3	16.7	5	27.8	26.3
	16	GAG	4	36.4	6	54.5		56.4	ACC	7	38.9	5	27.8
GLY (G)	GGA	8	40.0	9	45.0	36.4		ACG	4	22.2	3	16.7	16.9
	GGC	6	30.0	4	20.0	16.2	ACT	4	22.2	5	27.8	30.0	
	GGG	2	10.0	3	15.0	15.2	TRP (W)	TGG	14	100	14	100	100.0
	GGT	4	20.0	4	20.0	32.1	TYR (Y)	TAC	12	80.0	9	60.0	59.4
HIS (H)	CAC	11	73.3	8	53.3	49.6	TAT	3	20.0	6	40.0	40.6	
	CAT	4	26.7	7	46.7	50.4	VAL (V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	3	15.0	4	20.0	21.1	GTC	5	26.3	5	26.3	27.0	
	ATC	10	50.0	9	45.0	42.7	GTG	13	68.4	6	31.6	31.7	
	ATT	7	35.0	7	35.0	36.2	GTT	1	5.3	8	42.1	41.3	
Totales 165						165	Totales 189						189

Tabla 8: Composiciones de codón de regiones de codificación para una proteína LnD9DS-2. La región de codificación de desaturada *L. nodorum* nativa se compara con

una versión Optimizada por la Planta.

Amino Ácido	Codón	Gen Nativo #	Gen Nativo %	Gen de Planta Opt. #	Gen de Planta Opt. %	Remb. Planta Opt.	Amino Ácido	Codón	Gen Nativo #	Gen Nativo %	Gen de Planta Opt. #	Gen de Planta Opt. %	Remb. Planta Opt.
ALA (A)	GCA	3	9.4	7	21.9	23.3	LEU (L)	CTA	7	15.6	0	0.0	0.0
	GCC	9	28.1	7	21.9	21.2		CTC	14	31.1	13	28.9	28.5
	GCG	12	37.5	5	15.6	14.2		CTG	7	15.6	7	15.6	14.6
	GCT	8	25.0	13	40.6	41.3		CIT	5	11.1	14	31.1	31.6
ARG (R)	AGA	4	13.8	13	44.8	43.8	TTA	3	6.7	0	0.0	0.0	
	AGG	3	10.3	9	31.0	30.5	TTG	9	20.0	11	24.4	25.3	
	CGA	7	24.1	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	9	45.0	9	45.0	44.6
	CGC	8	27.6	0	0.0	0.0		AAG	11	55.0	11	55.0	55.4
	CGG	5	17.2	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	9	100	9	100	100.0
CGT	2	6.9	7	24.1	25.7	PHE (F)	TTC	16	80.0	12	60.0	58.6	
ASN (N)	AAC	6	50.0	8	66.7		62.6	TTT	4	20.0	8	40.0	41.4
AAT	AAT	6	50.0	4	33.3	37.4	PRO (P)	CCA	3	16.7	5	27.8	29.6
	GAC	16	66.7	10	41.7	42.5		CCC	8	44.4	3	16.7	14.6
ASP (D)	GAT	8	33.3	14	58.3	57.5		CCG	2	11.1	3	16.7	18.4
	TGC	4	80.0	2	40.0	49.2		CCT	5	27.8	7	38.9	37.3
CYS (C)	TGT	1	20.0	3	60.0	50.8	SER (S)	AGC	8	27.6	5	17.2	17.9
	TAA	0	0.0	0	0.0	0.0		AGT	6	20.7	5	17.2	15.8
END	TAG	1	100.0	0	0.0	0.0	TCA	1	3.4	6	20.7	20.4	
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0	TCC	6	20.7	5	17.2	18.7	
	CAA	10	55.6	10	55.6	50.0	TCG	7	24.1	0	0.0	0.0	
GLN (Q)	CAG	8	44.4	8	44.4	50.0	TCT	1	3.4	8	27.6	27.2	
	GAA	5	33.3	7	46.7	43.6	THR (T)	ACA	11	44.0	7	28.0	26.3
GLU (E)	GAG	10	66.7	8	53.3	56.4		ACC	5	20.0	7	28.0	26.9
	GLY (G)	GGA	13	34.2	14	36.8	36.4	ACG	7	28.0	4	16.0	16.9
GGC		16	42.1	6	15.8	16.2	ACT	2	8.0	7	28.0	30.0	
GGG		6	15.8	6	15.8	15.2	TRP (W)	TGG	19	100	19	100	100.0
GGT		3	7.9	12	31.6	32.1	TYR (Y)	TAC	11	64.7	10	58.8	59.4
HIS (H)	CAC	12	66.7	9	50.0	49.6	TAT	6	35.3	7	41.2	40.6	
	CAT	6	33.3	9	50.0	50.4	VAL (V)	GTA	6	17.6	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	4	18.2	5	22.7	21.1		GTC	10	29.4	9	26.5	27.0
	ATC	9	40.9	10	45.5	42.7		GTG	12	35.3	11	32.4	31.7
	ATT	9	40.9	7	31.8	36.2		GTT	6	17.6	14	41.2	41.3
Totales		214		214			Totales		236		236		

20 La síntesis de fragmentos de ADN que comprende SEC ID NO: 15, SEC ID NO:16 y SEC ID NO: 17, se llevaron a cabo a través de proveedores comerciales (PicoScript, Houston, TX and Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). Estas secuencias optimizadas por canola fueron etiquetadas como la versión 2

25 (v2). Posteriormente los fragmentos de ADN sintéticos fueron

clonados en vectores de expresión, y transformados en *Agrobacterium* y canola, tal como se describe en los ejemplos que se encuentran a continuación.

Ejemplo 3: Construcción de Plásmido

5 Se construyeron los siguientes plásmidos utilizando técnicas de biología molecular estándar. Los fragmentos de polinucleótido que contienen unidades de transcripción de planta (comprendidas de un promotor enlazado a un gen de interés, terminado a través de una 3' UTR), o "PTUs", se
10 construyeron y combinaron con unidades de transcripción de planta adicionales dentro de la región de hebra-T de un vector binario.

Descripción de pDAB7318: Se construyó pDAB7318 (figura 6; SEC ID NO: 58) utilizando técnicas de biología molecular
15 estándar. Este plásmido contiene dos secuencias de PTU de desaturasa. La primera PTU de desaturasa contiene el promotor de faseolina *Phaseolus vulgaris* (promotor PvPhas v2 (SEC ID NO: 67); Genbank: J01263), la región no traducida 5' *Phaseolus vulgaris* (PvPhas 5' UTR (SEC ID NO: 68); Genbank: J01263), el
20 gen AnD9DS v3 (SEC ID NO:49), la región no traducida 3' *Phaseolus vulgaris* (PvPhas 3' UTR v1 (SEC ID NO:69); Genbank: J01263) y la región de adhesión de matriz de *Phaseolus vulgaris* (PvPhas 3' MAR v2 (SEC ID NO:70); Genbank: J01263). La segunda PTU de desaturasa, contiene el
25 promotor PvPhas v2, la PvPhas 5' UTR, LnD9DS-2 v2 (SEC ID

NO: 17), y la región no traducida 3' ORF23 *Agrobacterium tumefaciens* ORF23 3' (AtuORF23 3' UTR (SEC ID NO: 71); Huang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22).

Los elementos en las PTUs de desaturasa se conectan a través de secuencias de intervención corta adicionales. Las dos secuencias PTU de desaturasa están flanqueadas por los sitios de Recombinación Gateway® de Invitrogen, los cuales se utilizan para facilitar la transferencia de estos cartuchos de expresión PTU en el plásmido de transformación *Agrobacterium*. Además, el plásmido contiene un origen de réplica, y un marcador seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7319: Se construyó pDAB7319 (figura 7; SEC ID NO: 60) mediante recombinación Gateway® entre pDAB7318 y pDAB7309 (figura 5; SEC ID NO:53). Este plásmido contiene dos secuencias PTU de desaturasa establecidas en la "Descripción de pDAB7318" precedente. Estas PTUs se orientaron en una orientación de cabeza a cola dentro de las regiones de extremo del ADN de hebra-T del vector binario de transformación de planta, pDAB7309. Este vector binario contiene la PTU de transferasa de acetilo de fosfinotricina, que consiste en el Promotor de Virus de Mosaico de vena de Tapioca (promotor CsVMV v2; Verdaguer et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39); transferasa de acetilo de fosfinotricina (PAT v5; Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37); y región no traducida 3' ORF1 *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR

v4; Huang et al. (1990), *supra*), además de otros elementos reguladores, tal como la Región de Adhesión de Matriz RB7 *Nicotiana tabacum* (RB7 MARv2; Genbank: U67919), Overdrive (Toro et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(22):8558-62), y las secuencias de extremo de hebra-T (Extremo A de T-ADN y Extremo B de T-ADN; Gardner et al. (1986) Science 231:725-7, y la Publicación de Patente Internacional PCT No. WO2001/025459A1). Los plásmidos que contienen las PTUs descritas anteriormente, fueron aislados y confirmados mediante digestión de enzima de restricción y secuenciación de ADN.

Descripción de pDAB7320: Se construyó pDAB7320 (figura 8; SEC ID NO:55) utilizando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene una secuencia PTU de desaturasa. La PTU de desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, PvPhas 5' UTR, LnD9DS-2 v2 (SEC ID NO: 17), y AtuORF23 3' UTR. Los elementos en las PTUs de desaturasa se conectan a través de secuencias de intervención corta adicionales. La secuencia PTU de desaturasa también está flanqueada por los sitios de Recombinación de Invitrogen para facilitar su transferencia en un plásmido de transformación *Agrobacterium*. Además, el plásmido contiene un origen de réplica y un marcador seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7321: pDAB7321 (figura 9; SEC ID NO: 61) se construyó mediante recombinación Gateway® entre

pDAB7320 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia
PTU de desaturasa establecida en la "Descripción de
pDAB7319" anterior. Esta PTU fue orientada en una orientación
de cabeza a cola dentro de las regiones de extremo de ADN de
5 hebra-T del vector binario de transformación de la planta,
pDAB7309. Este vector binario contiene el promotor CsVMV:
PTU de transferasa de acetilo de fosfinotricina v2; PAT v5; y
AtuORF1 3'UTR v4, además de otros elementos reguladores
tales como las secuencias de extremo "Overdrive" y de hebra-T
10 (Extremo A de T-ADN y Extremo B de T-ADN). Los plásmidos
que contienen la PTU descrita anteriormente, fueron aislados y
confirmados mediante digestión de enzima de restricción y
secuenciación de ADN.

Descripción de pDAB7323: pDAB7323 (figura 10; SEC ID
15 NO: 56) se construyó utilizando técnicas de biología molecular
estándar. Este plásmido contiene dos secuencias PTU de
desaturasa. La primera PTU de desaturasa contiene el promotor
PvPhas v2, PvPhas 5' UTR, AnD9DS v3 (SEC ID NO: 47),
PvPhas 3' UTR, y PvPhas 3' MAR v2. La segunda PTU de
20 desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, PvPhas 5' UTR,
HzD9DS v2 (SEC ID NO: 16) y AtuORF23 3' UTR. Los elementos
en las PTUs de desaturasa se conectan mediante la secuencia
de intervención corta adicional. Las dos secuencias PTU de
desaturasa están flanqueadas por sitios de Recombinación
25 Gateway® de Invitrogen para facilitar su transferencia en un

plásmido de transformación *Agrobacterium*. Además, el plásmido contiene un origen de réplica y un marcador seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7324: Se construyó pDAB7324 (figura 5 11; SEC ID NO:62) a través de recombinación Gateway® entre pDAB7323 y pDAB7309. Este plásmido contiene las dos secuencias PTU de desaturasa establecidas en la "Descripción de pDAB7323" precedente. Estas PTUs fueron orientadas en una orientación de cabeza a cola dentro de las regiones de extremo de ADN de hebra-T del vector binario de transformación de planta, pDAB7309. Este vector binario contiene el promotor CsVMV: PTU de transferasa de acetilo de fosfinotricina v2; PAT v5; y AtuORF1 3'UTR v4, además de otros elementos reguladores tales como las secuencias de extremo 10 "Overdrive" y de hebra-T (Extremo A de T-ADN y Extremo B de T-ADN). Los plásmidos que contienen las PTUs descritas anteriormente, fueron aislados y confirmados mediante digestión de enzima de restricción y secuenciación de ADN. 15

Descripción de pDAB7325: Se construyó pDAB7325 (figura 20 12; SEC ID NO:57) utilizando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene una secuencia PTU de desaturasa. La PTU de desaturasa contiene el promotor PvPhas v2, PvPhas 5' UTR, HzD9DS v2 (SEC ID NO: 16) y AtuORF23 3' UTR. Los elementos en la PTU de desaturasa son conectados a 25 través de secuencias de intervención corta adicionales, y la

secuencia de PTU de desaturasa está flanqueada por los sitios de Recombinación Gateway® de Invitrogen para facilitar su transferencia en un plásmido de transformación *Agrobacterium*. Además, el plásmido contiene un origen de réplica y marcador
5 seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7326: Se construyó pDAB7326 (figura 13; SEC ID NO:63) mediante recombinación Gateway® entre pDAB7325 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia PTU de desaturasa establecida en la “Descripción de
10 pDAB7325” precedente. La PTU fue orientada en una orientación de cabeza a cola dentro de las regiones de extremo del ADN de hebra-T del vector binario de transformación de planta, pDAB7309. Este vector binario contiene el promotor CsVMV: PTU de transferasa de acetilo de fosfinotricina v2; PAT
15 v5; y AtuORF1 3' UTR v4, además de otros elementos regulatorios tales como las secuencias de los extremos “Overdrive” y de hebra-T (Extremo A de T-ADN y Extremo B de T-ADN). Los plásmidos que contienen la PTU descrita anteriormente, se aislaron y confirmaron mediante digestión de
20 enzima de restricción y secuenciación de ADN:

Descripción de pDAB7327: Se construyó pDAB7327 (figura 14; SEC ID NO: 58) utilizando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene una secuencia PTU de desaturasa. La PTU de desaturasa contiene el promotor PvPhas
25 v2, PvPhas 5' UTR, el gen AnD9DS (SEC ID NO: 49) y

AtuORF23 3' UTR. Los elementos en la PTU de desaturasa, se conectan a través de secuencias de intervención corta adicionales. La secuencia PTU de desaturasa también está flanqueada por sitios de Recombinación Gateway® Invitrogen para facilitar su transferencia en un plásmido de transformación *Agrobacterium*. Además, el plásmido contiene un origen de réplica y marcador seleccionable de kanamicina.

Descripción de pDAB7328: Se construyó pDAB7328 (figura 15; SEC ID NO: 64) mediante recombinación Gateway® entre pDAB7327 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia PTU de desaturasa establecida en la “Descripción de pDAB7327” precedente. Esta PTU se orientó en una orientación de cabeza a cola dentro de las regiones de extremo de ADN de hebra-T del vector binario de transformación de la planta, pDAB7309. Este vector binario contiene el promotor CsVMV: PTU de transferasa de acetilo de fosfinotricina v2; PAT v5; y AtuORF1 3'UTR v4, además de otros elementos reguladores tales como secuencias de extremo de “Overdrive” y de hebra-T (Extremo A de T-ADN y Extremo B de T-ADN). Los plásmidos que contienen la PTU descrita anteriormente, fueron aislados y confirmados mediante digestión de enzima de restricción y secuenciación de ADN.

Descripción de pDAB7329: Se construyó pDAB7329 (figura 16; SEC ID NO: 59) utilizando técnicas de biología molecular estándar. Este plásmido contiene una secuencia PTU de

desaturasa, que contiene el promotor PvPhas v2, PvPhas 5' UTR, MgD9DS v2 (SEC ID NO:15) y AtuORF23 3' UTR. Los elementos en esta PTU de desaturasa, están conectados mediante secuencias de intervención corta adicionales. La

5 secuencia PTU de desaturasa está flanqueada mediante sitios de Recombinación Gateway® de Invitrogen para facilitar su transferencia en un plásmido de transformación *Agrobacterium*. Además, el plásmido contiene un origen de réplica y marcador seleccionable de kanamicina.

10 Descripción de pDAB7330: Se construyó pDAB7330 (figura 17; SEC ID NO: 65) mediante recombinación Gateway® entre pDAB7329 y pDAB7309. Este plásmido contiene la secuencia PTU de desaturasa establecida en la “Descripción de pDAB7325” precedente. Esta PTU se orientó en una orientación

15 de cabeza a cola con las regiones de extremo de ADN de hebra-T del vector binario de transformación de planta, pDAB7309. Este vector binario contiene el promotor CsVMV: PTU de transferasa de acetilo de fosfinotricina v2; PAT v5; y AtuORF1 3'UTR v4, además de otros elementos reguladores tales como

20 las secuencias de extremo de “O’verdrive” y de hebra-T (Extremo A de T-ADN y Extremo B de T-ADN). Los plásmidos que contienen la PTU descrita anteriormente, fueron aislados y confirmados mediante digestión de enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

25 Descripción de pDAB7331: Además de lo anterior, se

construyó un plásmido de control que no contiene una PTU de desaturasa (SEC ID NO:66). Figura 18. Esta construcción únicamente contiene PTU de transferasa de acetilo de fosfotricina, además de los otros elementos reguladores descritos en pDAB7309.

Ejemplo 4: Transformación *Agrobacterium*

Se prepararon células *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes (tabla 9), utilizando un protocolo de Weigel y Glazebrook (2002) "Como Transformar *Arabidopsis*" Capítulo 5, en *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Se descongelaron en hielo 50 μ L de células *Agrobacterium* competentes, y se transformaron utilizando 300 a 400 ng de ADN de plásmido de vector binario. La mezcla celular se electroporó en la presencia de ADN utilizando cubetas de electroporación enfriadas previamente (0.2 cm), y un electroporador Bio-Rad Gene Pulser[®] (Hercules, CA) bajo las siguientes condiciones: Voltaje: 2.5 kV, Longitud de Pulsación: 5 mseg, rendimiento de capacitancia 25 μ F, resistencia 200 Ω . Después de la electroporación, se agregaron 1 mL de caldo YEP (Extracto de Levadura (10 g/L), Peptona (10 g/L) y NaCl (5 g/L)) a cada cubeta, y la suspensión de célula-YEP fue transferida a un tubo de cultivo de 15 mL. Las células se incubaron a una temperatura de 28°C con agitación suave durante 4 horas, después de lo cual el cultivo se revistió sobre YEP + agar con la selección adecuada de acuerdo con la tabla 9. Las placas se

incubaron durante 2 a 4 días a una temperatura de 28°C, y las colonias fueron seleccionadas y ralladas sobre placas frescas de YEP + agar con selección de antibiótico, y se incubaron a una temperatura de 28°C durante 1 a 3 días. Las colonias fueron verificadas como *Agrobacterium*, utilizando la prueba de Cetolactosa, y las colonias positivas de Cetolactosa fueron aisladas en forma adicional utilizando dos pasajes de aislamiento de colonia simple. Se elaboró a partir de las colonias, una placa de parche final después de que se completó el aislamiento de colonia simple.

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

Cepa	Selección genómica	Selección Auxiliar	Selección de vector binario
Z707S	Estreptomicina	Kanamicina	Espectinomicina
DA2569	Eritromicina	Kanamicina	Espectinomicina
EHA105	Estreptomicina	No disponible	Espectinomicina
DA2552	Eritromicina	Ninguna	Espectinomicina

Validación de Colonia de *Agrobacterium*: Se utilizó análisis de digestión de restricción para verificar la presencia del plásmido intacto utilizando enzimas de digestión de restricción específicas de vector. Se utilizaron equipos de ADN de Plásmido Macherey-Nagel NucleoBond® de acuerdo con el protocolo recomendado del fabricante, para purificar el ADN de plásmido de las colonias de *Agrobacterium* transformadas. El ADN de plásmido del vector binario utilizado en la

transformación de *Agrobacterium*, fue incluido como un control.

Se corrieron cuatro reacciones de digestión separadas utilizando 0.75 a 1 μ g de ADN. La reacción se dejó correr de 1 a 2 horas, y posteriormente se analizó mediante electroforesis de gel de agarosa y manchado con bromuro de etidio. Las colonias fueron seleccionadas, para lo cual las digestiones de todas las enzimas fueron idénticas al control de plásmido y correspondieron con los tamaños de banda esperados.

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

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

Transformación de *Arabidopsis*: Se transformó *Arabidopsis* utilizando un método de baño floral basado en el método de Clough y Bent (1998) Plant J. 16:735-743. Se utilizó un colonia de *Agrobacterium* seleccionad para inocular uno o más precultivos de 30 mL de caldo YEP que contiene antibióticos adecuados para selección. El cultivo(s) fue incubado durante la noche a una temperatura de 28°C con agitación constante en 220 rpm. Cada precultivo fue utilizado para inocular dos cultivos de 500 mL de caldo YEP que contiene antibióticos para selección, y los cultivos fueron incubados durante la noche a una temperatura de 28°C con agitación constante.

Posteriormente las células se revistieron en aproximadamente 8700 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se desechó el sobrenadante resultante. El gránulo celular se resuspendió ligeramente en un medio de infiltración de 500 mL que contiene: 1/2x de Murashige y sales de Skoog/vitaminas B5 de Gamborg, sacarosa al 10% (p/v), 0.044 μ M de purina de bencilamino (10 μ L/litro de una reserva de 1 mg/mL en DMSO), y 300 μ L/litro de L-77 Silwet[®]. Se bañaron plantas de aproximadamente 1 mes de edad en el medio durante 15 segundos, teniendo cuidado de sumergir la inflorescencia más reciente. Posteriormente las plantas se colocaron sobre sus lados, y se cubrieron (transparente u opaco) durante 24 horas, posteriormente se lavaron con agua y se colocaron hacia arriba. Las plantas se crecieron a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después del bañado, las semillas fueron recolectadas de las plantas.

Condiciones de Crecimiento de *Arabidopsis thaliana*: La semilla cosechada en forma fresca fue secada durante 7 días a temperatura ambiente en la presencia de un disecante. Después de secarse, la semilla fue suspendida en una solución de Agarosa al 0.1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La semilla suspendida se almacenó a una temperatura de 4°C durante 2 días para completar los requerimientos de latencia y asegurar la germinación de semilla sincrónica (estratificación).

Se cubrió la Mezcla LP5 Sunshine (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) con vermiculita fina y se subirrigó con solución de Hoaglan hasta mojarse. La mezcla de tierra fue drenada durante 24 horas. La semilla estratificada fue sembrada en la vermiculita y se cubrió con domos de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días. Las semillas fueron germinadas, y las plantas se crecieron en un controlador Conviron (modelos CMP4030 y CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) en una intensidad de luz de 120 a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{seg}$ bajo temperatura (22°C) y humedad (40 a 50%) constante. Las plantas fueron mojadas inicialmente con solución de Hoaglan, y subsecuentemente con agua desionizada para mantener la tierra húmeda, pero no mojada. Las plantas que estaban cerca de la cosecha de semilla (1 a 2 semanas antes de la recolecta) fueron secadas.

Selección de Plantas Transformadas T₁: La semilla T₁ fue sembrada en charolas de germinación de 10.5" x 21" (26.6 cm x 53.3 cm) (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) tal como se describió anteriormente y se crecieron bajo las condiciones señaladas. Los domos fueron eliminados 5 a 6 días posteriores al sembrado. 5 días posteriores al sembrado, y nuevamente 10 días posteriores al sembrado, las plántulas fueron rociadas con una solución al 0.20% de herbicida de glufosinato (Liberty) en

un volumen de rocío de 10 mL/charola (703 L/ha) utilizando una punta de rocío de aire comprimido de DeVilbiss para suministrar un rango efectivo de 280 g/ha de glufosinato por aplicación. Se pipetearon 10 mL de la solución herbicida de glufosinato en un
5 frasco de centelleo de 20 mL para cada charola que es rociada. El rocío fue suministrado utilizando un patrón de aplicación horizontal y vertical. Después de cada rociada, se agregó a cada charola de selección una etiqueta de rociado con el nombre del herbicida, rango de aplicación y fecha de
10 aplicación. Cuatro a siete días después del segundo rociado, las plantas resistentes a herbicida fueron identificadas y transplantadas en macetas preparadas con una mezcla LP5 Sunshine. Las plantas transplantadas fueron colocadas en un invernadero con las condiciones de crecimiento antes
15 mencionadas. Seis a ocho semanas después del trasplante, la semilla de cada planta fue recolectada y almacenada por separado con un número de identificación único.

**Ejemplo 7: Transformación de canola transmitida por
*Agrobacterium***

20 Preparación de *Agrobacterium*: Se utilizaron cepas de *Agrobacterium* que contienen ya sea pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, pDAB7330 o pDAB7331 para rallar placas YEP (Bacto Peptone (20.0 g/L) y de Extracto de Levadura (10.0 g/L)) que contienen estreptomina (100 mg/mL)
25 y espectinomicina (50 mg/mL), y se incubaron durante 2 días a

una temperatura de 28°C. Se inoculó un lazo de la placa de
rallado de 2 días en 150 mL de YEP líquido modificado con
estreptomicina (100 mg/mL) y espectinomicina (50 mg/mL) en
un frasco(s) amortiguado de 500 mL estéril y se agitó en 200
5 rpm a una temperatura de 28°C. Los cultivos fueron
resuspendidos en medio-M (sales LS; glucosa al 3%; vitaminas
B5 modificadas; 1 µM de quinetina; 1 µM de 2,4-D; pH 5.8), y se
diluyeron a la densidad adecuada (50 Unidades de Klett) antes
de la transformación de los hipocotiledóneos de canola.

10 Transformación de Canola:

Germinación de semilla: Las semillas de canola (variedad
Nexera 710) fueron esterilizadas en la superficie en 10% de
Clorox durante 10 minutos, y se enjuagaron tres veces en
coladores de acero con agua destilada estéril. Las semillas
15 fueron plantadas para germinación en un medio ½ MS Canola
(1/2 MS, 2% de sacarosa y 0.8% de Agar) que estaba contenido
en Phytatrays (25 semillas por Phytatray). Las charolas fueron
colocadas en una cámara de crecimiento ambiental (Percival
Scientific, Inc., Perry, IA) con un régimen de crecimiento
20 ajustado a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16
horas de luz/8 horas de oscuridad, y se germinaron durante 5
días.

Tratamiento previo: El día 5, se cortaron en forma
aséptica segmentos de hipocotiledóneas de ~3 mm, desechando
25 las secciones de raíz y de brote (se evitó el secado de los

hipocotiledóneos colocándolos en 10 mL de agua milliQ estéril durante el proceso de corte). Los segmentos hipocotiledóneos fueron colocados en forma horizontal en papel de filtro estéril en un medio de inducción calloso, MSK1D1 (MS; 1 mg/L Quinetina; 1 mg/L 2,4-D; 3% sacarosa; 0.7% Phytagar) durante 3 días de tratamiento previo en una cámara de crecimiento ambiental con un régimen de crecimiento ajustado a una temperatura de 22 a 23°C y un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

10 *Co-cultivo con Agrobacterium*: El día antes del tratamiento con *Agrobacterium*, se inocularon los frascos de medio YEP que contiene los antibióticos adecuados. Se transfirieron los segmentos hipocotiledóneos de papel de filtro a platos de petri vacíos de 100 x 25 mm que contienen 10 mL de medio M líquido para evitar que se secan los segmentos hipocotiledóneos. Se utilizó una espátula en esta etapa para recoger los segmentos y transferirlos. El medio M líquido fue eliminado con una pipeta, y se agregaron 40 mL de suspensión de *Agrobacterium* al plato de petri (500 segmentos con 40 mL de solución de *Agrobacterium*).

15

20 Los segmentos fueron tratados durante 30 minutos con revoltura periódica del plato de petri de modo que los hipocotiledóneos permanecieran sumergidos en la solución de *Agrobacterium*. Al final del período de tratamiento, la solución de *Agrobacterium* fue pipeteada en un recipiente de desecho, se sometió a

25 autoclave y se desechó (la solución de *Agrobacterium* fue

eliminada completamente para evitar el sobrecrecimiento de *Agrobacterium*). Los hipocotiledóneos tratados fueron transferidos con pinzas nuevamente a sus placas originales que contienen MSK1D1 con un papel de filtro, teniendo cuidado de asegurarse que los segmentos no estuvieran secos. Los segmentos hipocotiledóneos, junto con los segmentos de control, se regresaron a la cámara de crecimiento ambiental bajo intensidad de luz reducida (cubriendo las placas con hojas de aluminio), y los hipocotiledóneos tratados se cultivaron junto con *Agrobacterium* durante 3 días.

Inducción de callo en medio de selección: Después de 3 días de co-cultivo, los segmentos hipocotiledóneos fueron transferidos individualmente con pinzas al medio de inducción de callo, MSK1D1H1 (MS; 1 mg/L Quinetina; 1 mg/L 2,4-D; 0.5 g/L MES; 5 mg/L AgNO₃; 300 mg/L Timentina; 200 mg/L Carbenicilina; 1 mg/L Herbiace; 3% sacarosa; 0.7% Phytagar). Los segmentos hipocotiledóneos se anclaron en el medio, pero no se incrustaron en el medio.

Selección y regeneración de brote: Después de 7 días en el medio de inducción de callo, los segmentos hipocotiledóneos callosos se transfirieron al Medio de Regeneración de Brote 1 con selección, MSB3Z1H1 (MS; 3 mg/L BAP; 1 mg/L Zeatina; 0.5 g/L MES; 5 mg/L AgNO₃; 300 mg/L Timentina; 200 mg/L Carbenicilina; 1 mg/L Herbiace; 3% sacarosa; 0.7% Phytagar). Después de 14 días, los hipocotiledóneos con brotes fueron

transferidos al Medio de Regeneración 2 con selección incrementada, MSB3Z1H3 (MS; 3 mg/L BAP; 1 mg/L Zeatina; 0.5 gm/L MES; 5 mg/L AgNO₃; 300 mg/L Timentina; 200 mg/L Carbenicilina; 3 mg/L Herbiace[®]; 3% sacarosa; 0.7% Phytagar).

5 *Elongación de brote:* Después de 14 días, los segmentos con brotes fueron transferidos al medio de elongación de brote, MSMESH5 (MS; 300 mg/L Timentina; 5 mg/L Herbiace[®]; 2% sacarosa; 0.7% TC Agar). Los brotes que ya estaban elongados fueron aislados y transferidos a MSMESH5. Después de 14
10 días, los brotes restantes que no estaban elongados en la primera vuelta, se colocaron en MSMESH5, y se transfirieron al medio de selección fresco de la misma composición. En esta etapa, se desecharon todos los segmentos hipocotiledóneos restantes.

15 Los brotes que se elongaron en el medio MSB3Z1H3 después de 2 semanas, fueron aislados y transferidos al medio MSMESH5. Los brotes restantes que no se habían elongado en la primera vuelta en MSMESH5 fueron aislados, y transferidos al medio de selección fresco de la misma composición. En esta
20 etapa, se desecharon todos los segmentos hipocotiledóneos restantes.

Inducción de raíz: Después de 14 días, los brotes fueron transferidos al medio MSMEST (MS; 0.5 g/L MES; 300 mg/L Timentina; 2% sacarosa; 0.7% TC Agar) para inducción de raíz.
25 Los brotes que no tenían raíz en la primera transferencia en el

medio MSMEST, fueron transferidos a un segundo o tercer ciclo en un medio MSMEST hasta que se obtuvieron plantas con raíz. Los brotes que no se elongaron/tuvieron generaron raíz en la primera transferencia en el medio MSMEST, fueron transferidos para un segundo o tercer ciclo en medio MSMEST hasta que se obtuvieran plantas con raíz. Las plantas que tuvieron raíz en MSMESH5 o MSMEST y fueron positivas-PCR, fueron enviadas para trasplante en tierra. Después de endurecerse, las plantas de canola T_0 fueron analizadas en forma adicional con respecto a eventos que contenían cartuchos PTU de transgen. Las plantas fueron transferidas a un invernadero, se crecieron hasta madurarse y se recolectó la semilla para análisis adicional.

Ejemplo 8: análisis de ADN de tejido de hoja de *Arabidopsis* T_1 y tejido de hoja de canola T_0

Se analizaron las plantas de canola T_0 y las plantas de *Arabidopsis* T_1 para identificar plantas que contenían cartuchos de expresión PTU. Se llevaron a cabo ensayos Invader[®] para clasificar inicialmente muestras de plantas transformadas en forma putativa, e identificar eventos que contenían una sola copia de PTU *pat*. Los eventos que fueron identificados como eventos de copia simple se mantuvieron y se analizaron en forma adicional con respecto a la presencia de las PTU(s) de desaturasa a través de PCR. Los eventos que fueron positivos de PCR para las PTU(s) del cartucho de expresión de desaturasa, se analizaron en forma adicional mediante análisis

de manchado Southern. El análisis de manchado Southern se completó para confirmar que las plantas contenían las PTUs del cartucho de expresión de gen del vector binario utilizado para transformar las plantas. Se seleccionaron para avance los
5 eventos de copia simple que contienen todas las PTUs.

Aislamiento de ADN: Se extractó el ADN genómico total (gADN) de tejido de hoja liofilizado utilizando el Equipo 96 Plant DNeasy[®] de Qiagen (Qiagen, Valencia, CA). Este gADN se diluyó posteriormente a 10 ng/ μ l (canola) o 0.7 ng/ μ L
10 (*Arabidopsis*) para utilizarse en ensayos PCR y Invader[®] para el número de copias.

Análisis Invader[®]: El análisis del número de copias del marcador seleccionable, *pat*, se completó utilizando el ensayo Invader[®] (Third Wave Technologies, Madison, WI). Se
15 desnaturalizó el ADN genómico a una temperatura de 95°C durante 10 minutos, se enfrió en hielo y se mezcló con una mezcla maestra de reactivos que contienen las sondas de oligonucleótido, moléculas de tinta con la capacidad de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
20 (FRET), y una enzima de disociación, de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las reacciones contenían sondas para los genes de referencia internos. Se utilizó el gen de *reductoisomerasa* de 1-desoxixilulosa-5-fosfato (DXR1) como un gen de referencia interno para reacciones de
25 ensayo Invader[®] de *Arabidopsis*, y se utilizó el *gen de proteína*

de grupo de alta movilidad (HMGa) como un gen de referencia interno para las reacciones de ensayo Invader[®] de canola. Además, las placas contenían estándares de 1 copia, 2 copias y 4 copias, así como muestras de control tipo silvestre y depósitos en blanco que no contienen muestra. La reacción completa se recubrió con aceite mineral antes de la incubación en un termociclador a una temperatura de 63°C durante 1.5 horas. Se leyó la reacción resultante en un lector de placa fluorométrica (Synergy[™] 2, BioTek Instruments, Winooski, VT). Las lecturas se recolectaron tanto para canales FAM (λ 485-528 nm) como RED (λ 560-620 nm). A partir de éstos, se determinó el plegamiento (es decir, el fondo) para cada canal de cada muestra, dividiendo la señal de la muestra sin procesar entre la señal sin procesar sin plantilla. A partir de estos datos, se construye una curva estándar, y se determinó el mejor ajuste mediante análisis de regresión lineal. Utilizando los parámetros identificados a partir de este ajuste, posteriormente se determinó para cada muestra el número de copias *pat* aparente.

Análisis PCR: Se completó el análisis PCR utilizando cebadores que amplificaron cada unidad de transcripción de la planta. Estos cebadores se localizaron en el promotor (Faseolina) y la 3' UTR (Faseolina o ORF23). Se utilizaron los mismos conjuntos de cebador para análisis PCR tanto de canola como *Arabidopsis*. Para análisis PCR de los eventos pDAB7319 y pDAB7324, se utilizaron los cebadores MAS414 (SEC ID NO:

18) y MAS415 (SEC ID NO: 19) para amplificar la primera PTU.

Esta PTU consistió en el promotor de Faseolina, un equivalente funcional de un gen de desaturasa delta-9 acil-CoA de *Aspergillus nidulans* (AnD9DS v3; SEC ID NO:49), y el
5 terminador 3'UTR de Faseolina. Para amplificación PCR de la segunda PTU en la construcción pDAB7319, se utilizaron los cebadores MAS415 y MAS413 (SEC ID NO: 20). Esta PTU consiste en el promotor de Faseolina, un equivalente funcional de un gen de desaturasa delta-9 acil-CoA desaturasa de
10 *Leptosphaeria nodorum* (LnD9DS-2 v2; SEC ID NO: 17), y la ORF23 3'UTR. También se utilizaron los pares del cebador MAS415 y MAS413 para amplificar la segunda PTU de los eventos generados mediante transformación con pDAB7324 (promotor de Faseolina, gen de desaturasa delta-9 acil-CoA de
15 *Helicoverpa zea* v2 (HzD9DS v2; SEC ID NO: 16), y ORF23 3'UTR). Además, se utilizaron los pares de cebador MAS415 y MAS413 para amplificar las PTUs en las construcciones pDAB7321 y pDAB7326.

Las reacciones PCR fueron llevadas a cabo en volúmenes
20 de 25 μ L utilizando 20 ng de ADN genómico, 5 unidades de Ex Taq (Takara), 1x de amortiguador de reacción, 0.2 μ M de cada dNTP y 0.8 μ M de cada cebador. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un ciclador de 2 térmicos DNA Engine Tetrad[®] (BioRad, Hercules, CA). Se utilizaron las
25 siguientes condiciones de ciclado para los cebadores MAS413 y

MAS415: 3 minutos a una temperatura de 94°C; seguido de 35
ciclos de 30 segundos a una temperatura de 94°C, 30 segundos
a una temperatura de 63°C y 3 minutos a una temperatura de
72°C; y una extensión final de 10 minutos a una temperatura de
5 72°C. Las condiciones de ciclado utilizadas para los cebadores
MAS414 y MAS415, fueron las mismas con la única diferencia
de que se redujo la temperatura de endurecimiento de 63°C a
60°C. Los productos de reacción se corrieron en un gel de
agarosa al 1%, se mancharon con bromuro de etidio y se
10 visualizaron en un Gel-Doc™.

Análisis de Manchado Southern: Se utilizó el análisis de
manchado Southern para establecer el patrón de integración de
los eventos de canola. Estos experimentos generaron datos que
demostraron la integración e integridad del transgen de
15 desaturasa con el genoma de canola. Se caracterizaron eventos
seleccionados como un evento de integración simple, de
longitud total que contiene una sola copia del transgen de
desaturasa del vector binario utilizado para transformación de
la planta.

20 Se llevó a cabo análisis de manchado Southern detallado
utilizando sondas específicas para los genes de desaturasa y
enzimas de restricción descriptivas, que se disociaron en sitios
localizados dentro de plásmido. Estas digestiones produjeron
fragmentos de hibridación interna para el plásmido, o
25 fragmentos que abarcaron la unión de plásmido con el ADN

genómico de canola (fragmento de extremo). Los tamaños moleculares indicados a partir de la hibridación Southern para la combinación de enzimas de restricción y las sondas, fueron únicos para cada evento. Estos análisis también mostraron que el fragmento de plásmido había sido insertado en el ADN genómico de canola sin reajustes del ADN de hebra-T.

Para análisis de manchado Southern, se extrajeron 100 mg de tejido de hoja de canola liofilizado utilizando el Equipo Plant Mini Kit (Qiagen). Se digirieron cinco microgramos (5 μ g) de gADN por muestra en forma simultánea con endonucleasas de restricción *SpeI* y *PacI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), para obtener fragmentos que contienen ya sea las PTUs de interés, y/o el marcador seleccionable (PAT), para determinar el número de copias. El ADN digerido fue separado en un gel de agarosa al 0.8%.

En síntesis, después de la separación electroforética y visualización de los fragmentos de ADN, los geles fueron despurinados con 0.25N HCl durante aproximadamente 20 minutos, y posteriormente se expusieron a una solución de desnaturalización durante aproximadamente 30 minutos, seguido de una solución de neutralización durante al menos 30 minutos. Durante la noche, se llevó a cabo la transferencia Southern sobre membranas de nylon (Millipore, Billerica, MA) utilizando un sistema de mechas con 10x SSC. Después de la transferencia, las membranas se lavaron con una solución 2x

SSC y el ADN fue enlazado a la membrana mediante reticulación UV. Este proceso produjo membranas de manchado Southern listas para hibridación.

Las sondas fueron generadas y se amplificaron los
5 fragmentos PCR a partir de ADN de plásmido y se purificaron mediante extracción de gel utilizando el Equipo de Extracción de Gel QIAquick® (Qiagen). Los cebadores utilizados para crear la sonda LnD9DS, fueron arw008 (SEC ID NO: 21) y arw009 (SEC ID NO: 22). Los cebadores utilizados para crear la sonda
10 HzD9, fueron arw010 (SEC ID NO: 23) y arw011 (SEC ID NO:24). Las condiciones PCR para las tres reacciones consistieron en 35 ciclos con una temperatura de endurecimiento de 63°C y un tiempo de extensión de 1 minuto. Los fragmentos PCR se etiquetaron con ³²P utilizando el equipo
15 de Etiquetado de Cebador Random RmT Prime-It® (Stratagene, La Jolla, CA).

Se llevó a cabo el paso de hibridación a una temperatura de aproximadamente 65°C durante la noche en el horno de hibridación. Se enjuagaron los manchados de membrana de
20 nylon, y el manchado se expuso durante la noche en un clasificador de imagen de fósforo, y se clasificó en un Escaner Storm™ 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Ejemplo 9: Composición de ácido graso de semillas de *Arabidopsis* transgénico que contiene una desaturasa delta-

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con vectores de *Agrobacterium* que contienen genes para LnD9DS-2 v2 (pDAB7321; SEC ID NO: 61), HzD9DS v2 (pDAB7326; SEC ID NO: 63) o MgD9DS v2 (pDAB7330; SEC ID NO:65). Las plantas también se transformaron con un vector que contiene un gen AnD9DS (pDAB7328; SEC ID NO:64). Se utilizó un vector vacío que contiene únicamente el gen marcador seleccionable *pat* (pDAB7331; SEC ID NO:66) como un control negativo. Las transformaciones también se llevaron a cabo utilizando dos desaturasas en combinación, para combinar una desaturasa con preferencia por estearoilo (AnD9DS) con una desaturasa con preferencia por palmitoilo, ya sea LnD9DS-2 (pDAB7319; SEC ID NO: 60), o HzD9DS (pDAB7324; SEC ID NO:62). En todos los casos, los genes de desaturasa fueron llevados por el promotor PvPhas específico de la semilla (Patente Norteamericana No. 5,504,200). Se recolectó en volumen la semilla T₂ de las plantas T₁ resistentes a herbicida, confirmadas por contener el gen *pat* a través del análisis de ensayo Invader[®] y la PTU de desaturasa a través del análisis PCR.

Las muestras de semillas fueron homogeneizadas en triheptadecanoína que contiene heptano (Nu-Chek prep, Elysian, MN) como un sustituto utilizando una bola de acero y un molino de bola. Antes de la homogeneización, se agregó a la muestra una solución de 0.25 M de MeONa preparado en forma fresca (Sigma) en MeOH. La reacción se llevó a cabo bajo

condiciones de calor moderado (40°C) y agitación constante. La
reacción se purificó mediante la recuperación del sustituto
metilado. La extracción de FAMEs se repitió tres veces, y todas
las capas de heptano se recolectaron antes del análisis. Se
5 verificó el término de la extracción revisando la presencia de
FAMEs en una cuarta extracción/derivación. Los FAMEs
resultantes fueron analizados mediante GC-FID utilizando una
columna capilar BPX 70 de SGE (15 m x 0.25 mm x 0.25 µm).
Cada FAME fue identificado mediante tiempo de retención, y
10 cuantificado mediante la inyección de una mezcla de referencia
de aceite de semilla de colza de Matreya, LLC (Pleasant Gap,
PA), como un estándar de calibración.

El análisis FAME de la semilla T₂ de los eventos
transgénicos, mostró que la expresión de cada una de las
15 desaturasas tuvo un efecto significativo en la reducción del
contenido de ácido graso saturado total de las semillas, tal
como se determina a partir del contenido de ácido graso
saturado promedio de cada conjunto de eventos. Tabla 10 y
figura 9. En esta tabla y las siguientes tablas, los valores no
20 conectados por la misma letra son significativamente diferentes,
tal como se determina utilizando la prueba HSD de Tukey-
Kramer en el paquete de software estadístico de JMP® (SAS
Institute Inc., Cary, NC). Las combinaciones de AnD9DS con
LnD9DS-2 o HzD9DS, produjeron el contenido promedio más
25 bajo de ácido graso saturado total.

Tabla 10: Contenido de ácido graso saturado total de semilla *Arabidopsis T₂*

Gen	Número de muestras T2			FAs Saturados Totales Promedio	
Control	204	A		13.49	
WT	60	A		13.16	
MgD9DS v2	42		B	10.26	
LnD9DS-2 v2	49		B	10.00	
HxD9DS v2	70		B	9.58	
AnD9DS v3	32			C	8.73
AnD9DS v3 + HxD9DS v2	39			C	8.23
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	51			C	8.09

Aunque las desaturasas, todas disminuyeron el contenido total de ácido graso en las semillas de *Arabidopsis*, tuvieron diferentes efectos en los contenidos de ácido graso de ácido palmítico y esteárico, tal como se anticipó a partir de los experimentos de levadura. La tabla 11 y la figura 20 muestran el contenido promedio de ácido palmítico para cada conjunto de eventos. La tabla 12 y la figura 21 muestran el contenido promedio de ácido esteárico de la semilla T₂ para conjunto de eventos.

Tabla 11: Contenido de ácido palmítico de semilla*Arabidopsis T₂*

Gen				Ácido Palmítico Promedio
Control	A			7.72
WT	A			7.54
MgD9DS v2		B		7.19
AnD9DS v3			C	6.02
LnD9DS-2 v2			C	5.98
HzD9DS v2			D	5.57
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2			D	5.54
AnD9DS v3 + HzD9DS v2			D	5.41

Tabla 12: Contenido de Ácido Esteárico de semilla*Arabidopsis T₂*

Gen				Ácido Esteárico Promedio
Control	A			2.96
WT	A			2.94
LnD9DS-2 v2		B		2.09
HzD9DS v2		B		2.04
MgD9DS v2			C	1.53
AnD9DS v3 + HzD9DS v2			C	1.42
AnD9DS v3			C	1.35
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2			C	1.28

25 AnD9DS y MgD9DS tuvieron mayores efectos en el

contenido de ácido esteárico que LnD9DS-2 y HzD9DS. De manera adversa, LnD9DS-2 y HzD9DS tuvieron mayores efectos en el contenido de ácido palmítico que AnD9DS y MgD9DS. Las combinaciones de las desaturadas tienen el mayor efecto en 5 ambos ácidos grasos. Estos resultados también fueron observados en los efectos de las desaturadas en el incremento del contenido de semilla de ácido palmitoleico, el cual es el producto primario de la desaturación delta-9 del ácido palmítico. Tabla 13 y figura 22.

10 **Tabla 13:** Contenido de ácido palmitoleico de semilla *Arabidopsis T₂*

Gen						Ácido Palmitoleico Promedio
AnD9DS v3 + HzD9DS v2	A					3.32
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	A					2.93
HzD9DS v2		B				2.48
AnD9DS v3		B	C			2.10
LnD9DS-2 v2			C			1.91
MgD9DS v2				D		1.40
Control					E	0.31
WT					E	0.30

Hubo una variación esperada en el efecto de las desaturadas en el contenido de ácido graso saturado a través 25 de los eventos analizados, debido a los efectos de posición y

número de copias. En la tabla 4 se muestra una comparación del perfil de ácido graso completo de eventos con el contenido de ácido graso saturado total más bajo (promedio de los cinco eventos más bajos), junto con el perfil de la semilla de las plantas tipo natural y transformadas con control.

Tabla 14: Perfil de ácido graso de *Arabidopsis* transgénico T₂ con el contenido más bajo de ácido graso saturado total. Las desviaciones estándar están en los paréntesis.

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	Vacc.*
WT	0.08 (0.02)	7.54 (0.41)	0.31 (0.05)	2.94 (0.19)	14.91 (1.44)	1.47 (0.10)
Control	0.08 (0.02)	7.72 (0.05)	0.32 (0.04)	2.96 (0.34)	14.20 (2.04)	1.46 (0.11)
AnD9DS v3	0.07 (0.01)	5.10 (0.38)	2.92 (0.55)	0.72 (0.03)	20.52 (2.12)	1.72 (0.26)
HzD9DSv2	0.06 (0.00)	4.13 (0.23)	4.11 (0.47)	1.26 (0.08)	19.34 (1.01)	1.94 (0.25)
LnD9DS-2 v2	0.05 (0.00)	4.68 (0.30)	3.49 (0.69)	1.53 (0.12)	19.35 (0.81)	2.05 (0.21)
MgD9DSv2	0.08 (0.02)	6.64 (0.26)	1.60 (0.54)	1.05 (0.20)	18.01 (1.86)	1.60 (0.16)
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	0.06 (0.00)	4.41 (0.17)	3.71 (0.35)	0.97 (0.33)	19.60 (0.88)	2.03 (0.21)
AnD9DSv3 + HzD9DSv2	0.08 (0.02)	4.86 (0.35)	4.09 (0.65)	1.01 (0.22)	18.10 (2.40)	2.03 (0.31)

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

	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C24:0
WT	28.72 (0.97)	17.85 (0.81)	2.06 (0.16)	20.11 (0.90)	1.78 (0.15)	0.94 (0.10)	1.68 (0.19)	0.21 (0.10)
Control	29.28 (1.29)	18.07 (1.35)	2.08 (0.16)	19.62 (1.23)	1.85 (0.17)	0.39 (0.13)	1.70 (0.04)	0.27 (0.14)
5 AnD9DS v3	29.64 (1.34)	17.59 (1.28)	0.44 (0.04)	18.26 (0.83)	1.42 (0.15)	0.24 (0.16)	1.26 (0.09)	0.10 (0.05)
HzD9DS v2	29.31 (0.94)	17.26 (0.39)	0.81 (0.06)	18.39 (0.66)	1.47 (0.10)	0.18 (0.05)	1.50 (0.04)	0.23 (0.03)
LnD9DS-2 v2	27.72 (0.18)	17.46 (0.55)	1.00 (0.11)	19.33 (0.46)	1.45 (0.11)	0.32 (0.14)	1.48 (0.10)	0.10 (0.09)
10 MgD9DS v2	29.76 (1.10)	17.98 (0.84)	0.63 (0.63)	19.19 (0.86)	1.60 (0.09)	0.26 (0.20)	1.44 (0.09)	0.16 (0.03)
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	29.17 (0.31)	18.84 (0.41)	0.59 (0.27)	17.65 (0.23)	1.40 (0.04)	0.39 (0.03)	1.13 (0.06)	0.03 (0.02)
AnD9DS v3 + HzD9DS v2	29.28 (1.78)	18.83 (1.69)	0.65 (0.21)	17.88 (1.90)	1.55 (0.20)	0.20 (0.12)	1.33 (0.24)	0.11 (0.08)

15 Además de reducir el contenido de los ácidos grasos palmíticos y esteáricos saturados, e incrementar del contenido de ácido graso monoinsaturado (palmitoleico y oleico), la presencia de las desaturasas también disminuyó la cantidad de ácido araquídico (C20:0) en las semillas. Esto se debe

20 presumiblemente a que este ácido graso se deriva de la elongación de ácidos esteárico y palmítico. Parece no haber desaturación directa de C20:0 a través de las desaturasas introducidas, ya que no existe una elevación concomitante en el ácido eicosenoico (C20:1) como C20:1 Δ 9.

Ejemplo 10: Preparación de anticuerpo de desaturasa delta-9

Son deseables herramientas de diagnóstico, ~~tales como~~ anticuerpos, para caracterizar la expresión de proteína de desaturasa delta-9 transgénica. Debido a que las desaturasas delta-9 acil-CoA son proteínas enlazadas por membrana, es difícil la sobreexpresión de rutina en *Escherichia coli*. Sin embargo, los anticuerpos fueron generados en forma exitosa mediante la sobreexpresión de un fragmento C-terminal de cada proteína de desaturasa delta-9 que no incluye cualesquiera de los dominios de transmembrana de la proteína.

Reacciones de Cadena de Polimerasa: Los cebadores PCR fueron diseñados para amplificar un fragmento C-terminal equivalente para cada desaturasa. El cebador 3' fue diseñado para codificar un fragmento de proteína con una etiqueta 6x His C-terminal. Se incorporaron los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* en los cebadores 5' y 3', respectivamente, para facilitar la clonación. Las secuencias de cebador se proporcionan a continuación en la tabla 5. Los productos de amplificación esperados tuvieron 659 pb para LnD9DS-2, 683 pb para MgD9DS, y 335 pb para HzD9DS. Se llevaron a cabo reacciones PCR utilizando el equipo PCR Takara Ex Taq™ (Clontech, Mountain View, CA) utilizando las condiciones del proveedor. El volumen de reacción PCR total fue de 50 µL. Cada reacción contiene 200 ng de ADN de plásmido y 50 pmol de cada cebador. El ADN fue desnaturalizado a una temperatura de 94°C

durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos a una temperatura de 94°C durante 30 seg, a una temperatura de 60°C durante 1 minuto, y a una temperatura de 72°C durante 30 seg. Se llevó a cabo una extensión final a una temperatura de 72°C durante 10 minutos. Cada producto PCR se corrió a través de dos depósitos en un gel de agarosa estéril al 0.75%, y el ADN fue purificado con gel utilizando las columnas de rotación Montage y se eluyó en 15 µL de amortiguador TE.

10

15

20

25

Tabla 15: Secuencias de los cebadores de oligonucleótido utilizadas en las amplificaciones PCR de los fragmentos C-terminal de LnD9DS-2, MgD9DS y HzD9DS.

	Cebador	Secuencia	Propósito
5	AntiLnD9DS2F	SEC ID NO: 25 CATATGTTTCGACGACAGACGCACGCCTCGAGAC	Cebador directo para LnD9DS2 C-terminal
10	AntiLnD9DS2Rh	SEC ID NO: 26 GGATCCGCAGCCACAGCCCCCTCAACCAACCTCTC	Cebador reverso para LnD9DS2 C-terminal
15	AntiMgD9DSF	SEC ID NO: 27 CATATGTTTCGACGATCGCAACTCGCCGCGTGATCAC	Cebador directo para MgD9DS C-terminal
20	AntiMgD9DSRh	SEC ID NO: 28 GGATCCGCGGCCTGAGCACCCGGAACAGGCTG	Cebador reverso para MgD9DS C-terminal
25	AntiHzD9DSF	SEC ID NO: 29 CATATGTATGACAAGTCCATCAAGCCTTCC	Cebador directo para HzD9DS C-terminal
	AntiHzD9DSRh	SEC ID NO: 30 GGATCCTCGTCTTTAGGGTTGATCCTAATGGCTGC	Cebador reverso para HzD9DS C-terminal

Clonación TOPO: Los fragmentos C-terminal purificados

fueron clonados TA en vectores TOPO® pCR®2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se transformaron en células Top 10 *E. coli* siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen).

5 Se seleccionaron las transformaciones, y se purificó el ADN de plásmido utilizando columnas NucleoSpin® (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, Alemania). Se digirieron tres microlitros (3 µL) de ADN con *NdeI* y *BamHI* en un volumen total de 20 µL, durante 90 minutos a una temperatura de 37°C, y se
10 corrieron sobre un gel de agarosa al 0.8%. En cada caso, fue visible un fragmento específico del gen (más una banda de vector TOPO® de 3.9 kb). Se eligieron tres clones positivos para cada gen clonado y se secuenciaron para confirmar que el fragmento PCR amplificado estuvo libre de errores. Cada uno
15 de los clones MgD9DS contenía una mutación de punta silente en el par base 45, indicando ya sea un polimorfismo de nucleótido simple entre la secuencia publicada y la plantilla de PCR, o un error PCR silente. Ya que la mutación fue silente, no fue necesaria corrección, y se eligió un clon para subclonación.

20 Preparación de plásmidos de expresión de fragmento C-terminal de desaturasa delta-9:

 Se digirieron fragmentos de desaturasa delta-9 amplificados con PCR con enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y se ligaron en los sitios de restricción correspondientes dentro
25 del vector de expresión pET30b(+). El paso de clonación dio

como resultado la adición de 15 aminoácidos C-terminal, que constituyen una etiqueta 6x His C-terminal para facilitar la purificación de la proteína de longitud total. No se esperó que estos aminoácidos adicionales afectaran la expresión de
5 proteína. Se obtuvieron clones positivos y se confirmaron mediante digestión de enzima de restricción y reacciones de secuenciación.

Expresión de fragmentos de péptido C-terminal de desaturasa delta-9 en *E. coli*. Se transformaron los plásmidos
10 de expresión de desaturasa delta-9/pET30b(+) en células *E. coli* BL21 (DE3) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Novagen, Madison, WI). Las células fueron revestidas en placas LA que contienen kanamicina (50 µg/mL) y glucosa (1.25 M). Las placas se incubaron durante la noche a
15 una temperatura de 37°C. Se raspó de las placas el bucle de células completo, y se inoculó en frascos de 500 mL que contienen 250 mL de LB y kanamicina (50 µg/mL) con inductor de isopropil-P-D-tiogalactosida (0.75 mM). Se probaron tres
20 condiciones de inducción. Los cultivos se indujeron en diferentes temperaturas, y se recolectaron en diferentes momentos tal como se indica: durante la noche (~18 hrs) a una temperatura de 28°C; durante la noche a una temperatura de 16°C; o 4 horas a una temperatura de 37°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación en botellas de 250 mL en
25 6,000 rpm durante 15 minutos, y posteriormente se congelaron

a una temperatura de -20°C .

Purificación de proteína de fragmentos de péptido C-terminal de desaturasa delta-9: Se descongelaron gránulos de célula de cultivos de 250 mL y se resuspendieron en 50 mL de Solución Salina Amortiguada por Fosfato (PBS) fría que contiene glicerol al 10% y 0.5 mL de Coctel Inhibidor de Proteasa (Sigma, St. Louis, MO) utilizando un homogeinizador portátil. Las células se interrumpieron en hielo durante aproximadamente 10 minutos utilizando un Sonificador Branson Modelo 450 (Danbury, CT). Se granularon los cuerpos de inclusión mediante centrifugación en $10,000 \times g$ durante 15 minutos, y se extractaron 2 a 3 veces con PBS que contiene Triton X-100 al 0.5% hasta que la concentración de proteína del sobrenadante alcanzó la línea de base, tal como se mide a través de un ensayo de proteína Bradford. Los cuerpos de inclusión fueron recuperados y solubilizados en una solución PBS que contiene 6 M de Urea y 5 mM de DTT a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Las proteínas solubilizadas fueron separadas de los materiales insolubles mediante centrifugación en $30,000 \times g$ durante 15 minutos, y el sobrenadante retenido fue aplicado en una columna de afinidad con Ni de 5 mL (GE Healthcare, HiTrap Chelating, Piscataway, NJ). Las etiquetas de histidina de los péptidos de desaturasa delta-9 C-terminal se enlazaron a la resina de metal, y cada fragmento se eluyó con 50 a 200 mM de gradiente de imidazol

utilizando Akta® Explorer 100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Las fracciones (3 mL cada una) fueron recolectadas y los picos eluidos fueron analizados mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contienen el péptido de desaturasa delta-9 C-terminal fueron recolectadas y concentradas utilizando un dispositivo de filtro Ultra 10,000 MWCO Amicon® (Millipore, Billerica, MA) a menos de 5 mL de volumen. La muestra de proteína posteriormente se inyectó en una columna de exclusión por tamaño Hi Load™ XK16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), y se equilibró con 6 M de Urea en 20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, y 1 mM de DTT. Las fracciones pico (4 mL cada una) que contienen el péptido de desaturasa delta-9 C-terminal, puro fueron guardadas (después de la validación mediante análisis por SDS-PAGE y otra caracterización bioquímica) y utilizadas para producción de anticuerpo. Se produjeron péptidos con los tamaños esperados de 27 kDa para el péptido LnD9DS-2, 15 kDa para el péptido HzD9DS, y 28 kDa para el péptido MgD9DS. Las condiciones de inducción produjeron suficiente proteína para visualización mediante manchado con azul Coomassie de geles SDS-PAGE.

Producción de Anticuerpo Policlonal: Un servicio contratado (Strategic BioSolutions, Newark, DE) produjo anticuerpos de conejo contra cada uno de los tres péptidos de desaturasa delta-9 C-terminal. Después de sus procedimientos estándar, se obtuvo un antisuero de titulador de alto nivel

(validado utilizando ELISA) para cada uno de los tres fragmentos de proteína. Cada péptido de desaturasa delta-9 C-terminal purificado fue diluido con 20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1 mM de amortiguador DTT, y con una concentración

5 final de 2 a 3 M de urea, para mantener la proteína en la solución. Se enviaron aproximadamente 10 mg de proteína a Strategic BioSolutions para la generación de un anticuerpo policlonal. Se eligieron dos conejos para cada inmunógeno, y se utilizaron protocolos estándar (70 días de inmunización). Se

10 compró un nuevo adyuvante llamado TiterMax[®] Gold para la preparación de la emulsión. También se llevó a cabo la trituration ELISA durante la inmunización y al final del protocolo, para asegurar el éxito de la producción de anticuerpo. Los antisueros fueron suministrados en dos puntos

15 de tiempo separados; uno del procedimiento de dos meses estándar, y el otro de la exanginación.

Para aislar la IgG total de los sueros de conejo, se aplicaron aproximadamente 20 a 30 mL de anti-suero de titulador de alto nivel con una Columna de Proteína A tolerante

20 a álcali de 5 mL (GE Healthcare, HiTrap[™] MabSelect SuRe[™], catálogo # 11-0034-94). Después de un lavado estándar con amortiguador PBS, se eluyó el IgG enlazado de la resina mediante exposición corta a 0.1 M de citrato de sodio, 0.3 M de NaCl, pH 3.3, y se neutralizó inmediatamente agregando un

25 volumen 1/10 de amortiguador 2 M de Tris-HCl, de pH 9 a cada

fracción. La columna de afinidad fue desinfectada tratando con 0.5 N de NaOH después de un procedimiento estándar de limpieza en el lugar (CIP) para evitar la contaminación cruzada del IgG. El IgG recuperado final de cada muestra fue dializado
5 contra 50 volúmenes de PBS a una temperatura de 4°C durante la noche, y se determinó la concentración de proteína mediante ensayo de Bradford utilizando el estándar BSA (Pierce, prod# 23208). Se transfirió un mL de alícuotas a tubos individuales y se almacenaron a una temperatura de -80°C.

10 Estos anticuerpos son herramientas de diagnóstico que fueron utilizadas para medir la expresión de proteína de desaturasa en material de planta transgénica. Los anticuerpos fueron utilizados para desarrollar correlaciones entre los cambios de fenotipo de aceite de ácido graso saturado de bajo
15 nivel y el nivel de expresión de las proteínas de desaturasa delta-9.

Ejemplo 11: Niveles de proteínas de desaturasa delta-9 acil-CoA en semilla de *Arabidopsis T₂*

Se detectaron polipéptidos de desaturasa delta-9 en
20 muestras de semilla transgénica madura mediante manchado Western. La semilla se preparó para análisis rompiendo semillas secas con cuentas de acero inoxidable en un Kleco™
Bead Beater (Garcia Machine, Visalia, CA). Se agregó amortiguador de extracción (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2%
25 SDS), y los tubos de muestra fueron mecidos suavemente

durante 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos en 3,000 rcf. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante y se utilizó para análisis. La cantidad de proteína soluble total en el extracto de semilla fue determinada mediante ensayo de Lowry (BioRad, Hercules, CA). Las muestras fueron normalizadas a 1.55 mg/mL de proteína soluble total, y se prepararon en un amortiguador de muestra LDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 40 mM de DTT, para una carga normalizada de 20 µg de proteína soluble total por columna. Las muestras fueron electroforadas en 4 a 12% de geles Bis-Tris (Invitrogen), y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los manchados fueron bloqueados en amortiguador de bloqueo, y se sondearon con anticuerpos contra cuatro diferentes polipéptidos de desaturasa delta-9 (AnD9DS, LnD9DS-2, HzD9DS, y MgD9DS) (ver Ejemplo 10).

En todos los casos, el anticuerpo policlonal fue desarrollado en conejos contra el fragmento de péptido C-terminal purificado con etiqueta His de las desaturasas individuales descritas anteriormente. Los fragmentos C-terminal purificados fueron utilizados como antígenos de referencia para cuantificación de los manchados Western. Se utilizó para detección un anticuerpo secundario etiquetado con anti-conejo fluorescente (Goat Anti-Rabbit AF 633; Invitrogen). Los manchados fueron visualizados en un generador de imágenes de fluorescencia Trio Plus Typhoon™ (GE Healthcare). Se

generaron curvas estándar con la adaptación de curva cuadrática, y se utilizó regresión lineal para cuantificar la expresión.

Los manchados Western SDS-PAGE de extractos de semilla T₂ madura de eventos *Arabidopsis*, mostraron bandas en el tamaño adecuado cuando se sondearon con anti-suero específico. Estas bandas fueron cuantificadas contra antígenos de referencia específicos. El manchado Western cuantitativo de extractos de semilla T₂ de *Arabidopsis* con anti-suero adecuado, indicó que se detectó un promedio de 63 ng de LnD9DS-2/mg de proteína total (tp) (max. 228 ng/mg tp) en semillas maduras, y para HzD9DS, se detectó un promedio de 34 ng/mg pt (max. 100 ng/mg pt). Para MgD9Ds se detectó un promedio de 58 ng/mg pt (max. 1179 ng/mg pt) en semilla T₂. Para los eventos AnD9DS, se detectó un promedio de 625 ng/mg tp (max 1.5 µg/mg tp) en semillas T₂ maduras. Por lo tanto, hubieron de 10 a 18 veces menos de desaturasas con preferencia por palmitoilo LnD9DS-2 y HzD9DS, expresadas en la semilla transgénica, en forma relativa a AnD9DS. Los mayores niveles de expresión de estas desaturasas, por consiguiente pueden conducir a reducciones adicionales en las saturadas, especialmente en ácido palmítico.

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

Se obtuvieron una serie de eventos de canola transgénica de transformaciones llevadas a cabo con pDAB7321 (SEC ID

NO:61) y pDAB7326 (SEC ID NO:63) (que contienen genes
LnD9DS-2 y HzD9DS, respectivamente, conducidos por el
promotor PvPhas específico de la semilla). Se identificaron
treinta y nueve eventos pDAB7321 que contienen el gen
5 LnD9DS-2 mediante análisis PCR de ADN genómico, y se
crecieron en el invernadero para producir la semilla T₁. En
forma similar, se identificaron 80 eventos pDAB7326, que
contenían el gen HzD9DS, y produjeron la semilla T₁. También
se transformó la canola con pDAB7319 (SEC ID NO:60) o
10 pDAB7324 (SEC ID NO:62), que contenía un gen AnD9DS
acoplado con los genes LnD9DS-2 o HzD9DS, todos conducidos
por el promotor PvPhas. Se recuperaron 44 y 76 eventos,
respectivamente, que fueron confirmados por contener ambos
genes de desaturasa mediante análisis PCR, y se crecieron en
15 el invernadero para producir la semilla T₁.

El análisis FAME de las muestras de la semilla T₁ de los
eventos transformados con pDAB7321 (LnD9DS-2 v2) o pDAB-
7326 (HzD9DS v2) no mostró reducción significativa en los
niveles de ácido graso saturado relativos a las plantas de
20 canola no transformadas o plantas transformadas con un control
de vector vacío. Los manchados Western de la semilla T₁ no
mostraron niveles detectables de las proteínas de desaturasa
delta-9. Además, no se detectó proteína detectable para
LnD9DS-2 o HzD9DS en la semilla T₁ de plantas transformadas
25 con pDAB7319 (AnD9DS v3 y LnD9DS-2 v2) o pDAB7324

(AnD9DS v3 y HzD9DS v2), mientras que la proteína AnD9DS puede ser fácilmente detectable. En estos eventos, se observó una reducción de ácidos grasos saturados relativa a las plantas de control, pero esto fue atribuible a la expresión de AnD9DS.

5 Para evaluar los niveles de mRNA relativos de los genes de desaturasa delta-9, se extractó el ARN total de la semilla de canola en desarrollo, de los eventos transformados con construcciones de desaturasa doble (pDAB7319 y pDAB7324), y se analizó mediante PCR de tiempo real cuantitativo. Las
10 semillas fueron recolectadas en hielo seco a los 20, 25, 29, 32, 39, o 41 días posteriores a la polinización de diversas plantas de canola y se almacenaron a una temperatura de -80°C . Se preparó el ARN total a partir de 50 mg de semillas congeladas recolectadas utilizando un equipo de extracción de ARN Plant
15 RNeasy[®] (Qiagen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizó ARN extractado como una plantilla para la síntesis de cADN utilizando una Supermezcla de Síntesis de Primera Hebra III Superscript[®] para qRT-PCR (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante.

20 Se diseñaron ensayos RT-PCR contra los objetivos de desaturasa utilizando el Centro de Diseño de Ensayo de Roche (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los cebadores utilizados en el ensayo se describen en la tabla 16. Los ensayos objetivos utilizaron sondas UPL etiquetadas con FAM (Roche
25 Diagnostics). Estos ensayos se ejecutaron con extracciones

dúplex con el ensayo de referencia de *actina* de canola etiquetada con Texas-Red sintetizado por Integrated DNA Technologies.

Tabla 16. Detalles de ensayo q-RT-PCR

5	Objetivo	Cebador directo	Cebador reverso	Sonda
	AnD9Ds	SEQ IDNO:31 GGACTTCTCTACTCTCACCTTGGGA	SEQ ID NO:32 TCCGATCCTCTTTGGGTTCT	UPL #9
	HzD9Ds	SEQ IDNO:33 GACCCACACAATGCAACG	SEQ ID NO:34 CCTAACAAGAAGCCAGCCAAT	UPL #143
	LnD9Ds	SEQIDNO:35 GTTCTGACTGCGTTGGTCAC	SEQ ID NO:36 CGGAAACTCATGGTGAAGT	UPL #7
10	Actina	SEQIDNO:37 CTACTGGTATTGTGCTCGACT	SEQIDNO:38 CTCTCTCGGTGAGAATCTTCAT	SEQIDNO:39 CACGCTATCCTCCGTCTCGATC

	Objetivo	Etiqueta
	AnD9Ds	FAM
15	HzD9Ds	FAM
	LnD9Ds	FAM
	Actina	Tx-Red

Se corrieron reacciones RT-PCR en un sitio ciclador
 20 térmico PCR de tiempo real 480II LightCycler[®] (Roche). Se
 recolectaron datos para los ensayos UPL objetivo utilizando un
 filtro de emisión de 533 nm y una señal de excitación de 483
 nm. Se recolectaron los datos del ensayo de referencia de
 actina utilizando un filtro de 610 nm y una señal de excitación
 25 de 558 nm. Se calcularon en forma automática los valores de

tiempo del ciclo y las proporciones del objetivo a referencia, utilizando el flujo de trabajo de análisis "Cuantificación Relativa Avanzada" del software LC480II. Se calculó la acumulación relativa de los niveles de transcripción de desaturasa dentro de cada muestra, utilizando el método estándar $\Delta\Delta Ct$ (Roche).

Para cada muestra de semilla de canola de pDAB7319 (AnD9DS v3 y LnD9DS-2 v2) y pDAB7324 (AnD9DS v3 y HzD9DS v2), la acumulación de transcripción de los transgenes HzD9DS o LnD9DS-2 fue significativamente menor que la transcripción de AnD9DS en los mismos eventos. Las diferencias observadas en la acumulación de transcripción, variaron entre 3 y 20 veces menos. Figura 23. Por lo tanto, una expresión insuficiente de HzD9DS y LnD9DS-2, puede tomar en cuenta la carencia de detección del polipéptido y la ausencia de fenotipo atribuible a estos genes.

Ejemplo 13: Expresión de PTUs de desaturasa delta-9 mediante promotores alternativos

El uso de regiones reguladoras de transcripción adicionales para expresar el gen(s) que codifica las proteínas LnD9DS-2, HzD9DS, y MgD9DS puede incrementar en forma adicional el contenido de estas desaturasas delta-9 dentro de la canola. La identificación y uso de regiones reguladoras de transcripción que se expresan en forma más temprana en el desarrollo, y durante períodos de tiempo más prolongados, puede incrementar los niveles de desaturasas delta-9

heterólogas dentro de la semilla de canola, promoviendo una transcripción específica de la semilla robusta de un gen heterólogo en etapas de desarrollo de la semilla más tempranas. El ejemplo de dichas regiones reguladoras de transcripción, incluyen, pero no se limitan a, el promotor LfKCS3 (Patente Norteamericana No. 7,253,337) y el promotor FAE 1 (Patente Norteamericana No. 6,784,342). Estos promotores son utilizados en forma singular, o en combinación, para conducir la expresión de los cartuchos de expresión LnD9DS-2, HzD9DS, y MgD9DS, por ejemplo, a través de ligadura operable con genes tales como los descritos previamente en los plásmidos, pDAB7319; pDAB7321 ; pDAB7324; pDAB7326; pDAB7328; y pDAB7330. Los métodos para reemplazar las regiones reguladoras de transcripción dentro de un plásmido son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, se elimina el fragmento de polinucleótido que comprende el promotor PvPhas de pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, o pDAB7330 (o los plásmidos precedentes utilizados para construir pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, o pDAB7330), y se reemplazan con una región de promotor ya sea LfKCS3 o FAE 1. Los plásmidos contruidos recientemente son utilizados para transformar en forma estable plantas de canola, de acuerdo con los procedimientos establecidos en los ejemplos anteriores. Las plantas de canola transgénica son aisladas y molecularmente

caracterizadas. Se determinó la acumulación de desaturasa delta-9 resultante, y se identificaron plantas de canola que expresan en forma robusta la desaturasa delta-9.

Las modificaciones adicionales a las regiones reguladoras de transcripción para la expresión incrementada de la desaturasa delta-9, incluyen reemplazar la secuencia Kozak existente con cualesquiera de las secuencias descritas en la tabla 17. El diseño de la corriente descendente de las secuencias Kozak alternativas del sitio de inicio de una desaturasa delta-9, se completa utilizando técnicas de biología molecular estándar. Los fragmentos de polinucleótidos sintéticos son sintetizados y clonados en la corriente ascendente de una secuencia de codificación de desaturasa delta-9 utilizando técnicas conocidas en el arte. El contexto del codón de inicio tiene un fuerte efecto en el nivel de expresión de un transgen. La modificación de la secuencia Kozak a una descrita en la tabla 17, incrementa los niveles de expresión de la desaturasa delta-9 heteróloga.

20

25

Tabla 17: Secuencias Kozak que son incorporadas en la corriente ascendente de un gen de desaturasa delta 9 heteróloga para incrementar la expresión.

5

Secuencia Kozak	SEQ ID NO:	Secuencia
Kozak #1	SEQ ID NO:40	GGATCCAACAATG
Kozak #2	SEQ ID NO:41	ACAACCAAAAATG
Kozak #3	SEQ ID NO:42	ACAACCAACCTACCATGG
Kozak #4	SEQ ID NO:43	ACAACCAAAAATG

10

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

Para obtener mayores niveles de expresión de genes heterólogos en plantas, se modificó la estrategia de optimización de codón descrita en el Ejemplo 2, y se rediseñaron las regiones de codificación de proteína de gen heterólogo para HzD9DS y LnD9DS-2, utilizando un protocolo de diseño nuevo. La selección de codón se realizó utilizando una tabla que había calculado la inclinación de codón de la planta huésped prospecto, la cual en este caso fue canola. En el diseño de regiones de codificación para expresión en planta de los genes de desaturasa delta-9, los codones primarios (“primera elección”) preferidos por la planta fueron determinados, y utilizados aproximadamente el 95% del tiempo. Se utilizaron en forma moderada los codones de “segunda

25

elección”, con una frecuencia de aproximadamente 5%. Por consiguiente, se diseñó una nueva secuencia de ADN que codifica la secuencia amino de cada desaturasa delta-9, en donde la nueva secuencia de ADN difirió del gen de desaturasa delta-9 nativo mediante la sustitución de los codones preferidos en primer lugar y preferidos en segundo lugar por la planta, para especificar un aminoácido adecuado en cada posición dentro de la secuencia de aminoácido. La nueva secuencia fue analizada posteriormente con respecto a sitios de enzima de restricción que pueden haber sido creados por las modificaciones. Los sitios de la enzima de restricción identificados fueron eliminados posteriormente reemplazando los codones con el primero o segundo codones preferidos de elección. También se eliminaron otros sitios en la secuencia que podían afectar la transcripción o traducción del gen de interés, específicamente las estructuras de bucle del tronco altamente estables.

Las selecciones de las elecciones de codón preferidos (primera y segunda elecciones) del código genético de aminoácido, fueron determinadas de una tabla de inclinación de codón compilada de las secuencias de codificación de proteína para aminoácido. En las tablas 18 y 19, las Columnas etiquetadas “% de Gen Nativo” presentan las distribuciones (en % de uso de todos los codones de dicho aminoácido) de los codones sinónimos para cada aminoácido tal como se encuentra

en las regiones de codificación de *Brassica napus* (canola). Las
secuencias de ADN nuevas que codifican esencialmente la
secuencia de aminoácido de las desaturasas delta-9 *M. grisea*,
H. zea y *L. nodorum*, fueron diseñadas para expresión óptima
5 en canola utilizando la distribución de codón preferido de los
codones de primera y segunda elección encontrados en los
genes de canola. El diseño de las secuencias de ADN
optimizadas por la planta se inició mediante traducción inversa
de las secuencias de proteína de SEC ID NO:12 (*grisea*), SEC
10 ID NO:13 (*H. zea*), y SEC ID NO:14 (*L. nodorum*) utilizando la
tabla de inclinación de codón de canola construida. Las
columnas etiquetadas como “% de Gen Opt Planta” indican los
codones preferidos y la frecuencia con la cual se incorporaron
en el diseño de gen de desaturasa delta-9. SEC ID NO:44 y
15 SEC ID NO:45 establecieron las secuencias de nucleótido de
las nuevas desaturasas LnD9DS-2 y HzD9DS optimizadas por
canola, respectivamente. Estas nuevas secuencias optimizadas
por canola fueron etiquetadas como LnD9DS-2 v3 y HzD9DS v3.

20

25

Tabla 18. Composiciones de codón para regiones de codificación de la proteína HzD9DS. La región de codificación de la desaturasa *H. zea* nativa se compara con una versión Optimizada por Planta

Amino-ácido	Codón	# de gen nativo	% gen nativo	# de gen Opt planta	% de gen Opt planta	Recomend Opt planta	Amino-ácido	Codón	# de gen nativo	% gen nativo	# de gen Opt planta	% de gen Opt planta	Recomend Opt planta
ALA (A)	GCA	4	11.4	1	2.9	0.0	LEU (L)	CTA	2	5.9	0	0.0	0.0
	GCC	7	20.0	0	0.0	0.0		CTC	8	23.5	0	0.0	0.0
	GCG	8	22.9	0	0.0	0.0		CTG	14	41.2	0	0.0	0.0
	GCT	16	45.7	34	97.1	100.0		CTT	6	17.6	34	100.0	100.0
ARG (R)	AGA	1	7.7	0	0.0	0.0	TTA	2	5.9	0	0.0	0.0	
	AGG	5	38.5	13	100.0	100.0	TTG	2	5.9	0	0.0	0.0	
	CGA	2	15.4	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	11	44.0	0	0.0	0.0
	CGC	5	38.5	0	0.0	0.0		AAG	14	56.0	25	100.0	100.0
CGG	0	0.0	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	8	100	8	100	100.0	
	CGT	0	0.0	0	0.0		0.0	PHE (F)	TTC	20	83.3	24	100.0
ASN (N)	AAC	13	72.2	18	100.0	100.0	TTT	4	16.7	0	0.0	0.0	
ASP (D)	AAT	5	27.8	0	0.0	0.0	PRO (P)	CCA	1	6.3	16	100.0	100.0
	GAC	16	64.0	2	8.0	0.0		CCC	5	31.3	0	0.0	0.0
CYS (C)	GAT	9	36.0	23	92.0	100.0		CCG	2	12.5	0	0.0	0.0
	TGC	1	100.0	1	100.0	100.0		CCT	8	50.0	0	0.0	0.0
END (E)	TGT	0	0.0	0	0.0	0.0	THR (T)	AGC	2	12.5	0	0.0	0.0
	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0		AGT	1	6.3	0	0.0	0.0
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	1	6.3	1	6.3	0.0
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	37.5	0	0.0	0.0
GLN (Q)	CAA	2	33.3	6	100.0	100.0	TCG	3	18.8	0	0.0	0.0	
	CAG	4	66.7	0	0.0	0.0	TCT	3	18.8	15	93.8	100.0	
GLU (E) 16	GAA	7	63.6	0	0.0	0.0	THR (T)	ACA	3	16.7	0	0.0	0.0
	GAG	4	36.4	11	100.0	100.0		ACC	7	38.9	18	100.0	100.0
GLY (G)	GGA	8	40.0	20	100.0	100.0		ACG	4	22.2	0	0.0	0.0
	GGC	6	30.0	0	0.0	0.0		ACT	4	22.2	0	0.0	0.0
	GGG	2	10.0	0	0.0	0.0	TRP (W)	TGG	14	100	14	100	0.0
GGT	4	20.0	0	0.0	0.0	TYR (Y)		TAC	12	80.0	15	100.0	100.0
HIS (H)	CAC	11	73.3	15	100.0	100.0	TAT	3	20.0	0	0.0	0.0	
	CAT	4	26.7	0	0.0	0.0	VAL (V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	3	15.0	1	5.0	0.0		GTC	5	26.3	0	0.0	0.0
	ATC	10	50.0	19	95.0	100.0		GTG	13	68.4	0	0.0	0.0
	ATT	7	35.0	0	0.0	0.0		GTT	1	5.3	19	100.0	100.0
Totales		165		165			Totales		189		189		

Tabla 19. Composiciones de codón de codificación de la proteína LnD9DS-2. La región de codificación de desaturasa *L. nodorum* nativa se compara con una versión Optimizada por la Planta

5	Amino-ácido	Codón	# de gen nativo	% gen nativo	# de gen Opt planta	% de gen Opt planta	Recomend Opt planta	Amino-ácido	Codón	# de gen nativo	% gen nativo	# de gen Opt planta	% de gen Opt planta	Recomend Opt planta	
10	ALA (A)	GCA	3	9.4	0	0.0	0.0	LEU (L)	CTA	7	15.6	0	0.0	0.0	
		GCC	9	28.1	0	0.0	0.0		CTC	14	31.1	0	0.0	0.0	
		GCG	12	37.5	0	0.0	0.0		CTG	7	15.6	0	0.0	0.0	
		GCT	8	25.0	32	100.0	100.0		CTT	5	11.1	45	100.0	100.0	
	ARG (R)	AGA	4	13.8	1	3.4	0.0	LYS (K)	TTA	3	6.7	0	0.0	0.0	
		AGG	3	10.3	28	96.6	100.0		TTG	9	20.0	0	0.0	0.0	
		CGA	7	24.1	0	0.0	0.0		AAA	9	45.0	0	0.0	0.0	
		CGC	8	27.6	0	0.0	0.0		AAG	11	55.0	20	100.0	100.0	
		CGG	5	17.2	0	0.0	0.0		MET (M)	ATG	9	100	9	100	100.0
		CGT	2	6.9	0	0.0	0.0			PHE (F)	TTC	16	80.0	20	100.0
15	ASN (N)	AAC	6	50.0	12	100.0	100.0	PRO (P)	TTT	4	20.0	0	0.0	0.0	
		AAT	6	50.0	0	0.0	0.0		CCA	3	16.7	18	100.0	100.0	
	ASP (D)	GAC	16	66.7	2	8.3	0.0		CCC	8	44.4	0	0.0	0.0	
		GAT	8	33.3	22	91.7	100.0		CCG	2	11.1	0	0.0	0.0	
	CYS (C)	TGC	4	80.0	5	100.0	100.0	THR (T)	CCT	5	27.8	0	0.0	0.0	
		TGT	1	20.0	0	0.0	0.0		AGC	8	27.6	0	0.0	0.0	
		END	TAA	0	0.0	0	0.0		0.0	AGT	6	20.7	0	0.0	0.0
	TAG		1	100.0	0	0.0	0.0		TCA	1	3.4	1	3.4	0.0	
	TGA		0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	20.7	0	0.0	0.0	
	GLN (Q)	CAA	10	55.6	18	100.0	100.0		TCC	6	20.7	0	0.0	0.0	
CAG		8	44.4	0	0.0	0.0	TCG		7	24.1	0	0.0	0.0		
GLU (E) 16	GAA	GAA	5	33.3	1	6.7	0.0	THR (T)	TCT	1	3.4	28	96.6	100.0	
		GAG	10	66.7	14	93.3	100.0		ACA	11	44.0	0	0.0	0.0	
	GLY (G)	GGA	13	34.2	38	100.0	100.0		ACC	5	20.0	25	100.0	100.0	
GGC		16	42.1	0	0.0	0.0	ACG		7	28.0	0	0.0	0.0		
20	GGG	GGG	6	15.8	0	0.0	0.0	ACT	ACT	2	8.0	0	0.0	0.0	
		GGT	3	7.9	0	0.0	0.0		TRP (W)	TGG	19	100	19	100	0.0
		HIS (H)	CAC	12	66.7	18	100.0		100.0	TYR (Y)	TAC	11	64.7	17	100.0
	CAT		6	33.3	0	0.0	0.0		TAT		6	35.3	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	4	18.2	1	4.5	0.0	VAL (V)	GTA	6	17.6	0	0.0	0.0		
	ATC	9	40.9	21	95.5	100.0		GTC	10	29.4	0	0.0	0.0		
	ATT	9	40.9	0	0.0	0.0		GTG	12	35.3	0	0.0	0.0		
		Totales		214	214		Totales		236	236					

Se llevaron a cabo las síntesis de fragmentos de ADN que comprenden SEQ ID NO:44 y SEQ ID NO:45, mediante PicoScript y Blue Heron Biotechnology. Posteriormente se clonó el ADN sintético en vectores de expresión y se transformó en canola sustancialmente como se describe en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 15: Modificación del N y C-término para incrementar la acumulación de los polipéptidos de desaturasa acil-CoA en plantas

10 La acumulación y estabilidad de las proteínas enlazadas por membrana en el retículo endoplásmico (ER), puede ser influenciada por los motivos de la secuencia de aminoácido y las modificaciones en su N y C-término. Ravid y Hochstrasser (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9:679-90. En particular, los 15 motivos y las modificaciones en N y C-terminales han mostrado modular la acumulación y estabilidad de las desaturasas de lípido en hongos y plantas, así como en animales. McCartney *et al.* (2004) Plant J. 37:156-73; Mziaut *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:8883-8.

20 La adición de una etiqueta de epítipo ya sea Myc o de hemaglutina (HA) al N-terminal de FAD2 o FAD3, incrementa significativamente el nivel de estado constante de estas enzimas dentro de la levadura. O'Quin *et al.* (2009) Appl Microbiol Biotechnol 83:117-25. Por consiguiente, la adición de 25 estos epítopos o unos similares, al N-término de una desaturasa

delta-9 de la presente invención, se utiliza para incrementar la expresión del polipéptido en una planta. Se clonó un enlazador de polinucleótido que codifica una etiqueta Myc (SEC ID NO:46) o una etiqueta HA (SEC ID NO:47) dentro del extremo 5' de una

5 secuencia que codifica la desaturasa delta-9 (por ejemplo, HzD9DS, MgD9DS, AnD9DS, LnD9DS-1, y LnD9DS-2) como un cuadro de lectura abierta contiguo. La secuencia de codificación resultante es clonada dentro de un plásmido de expresión de planta utilizando la estrategia de clonación

10 descrita en el Ejemplo 3. Se utilizó el plásmido recientemente construido para transformar de manera estable una célula, material o tejido de planta de *Arabidopsis* y/o canola. Las plantas transgénicas fueron regeneradas a partir de la célula, material o tejido de la planta transformada. Las plantas

15 transgénicas se aislaron y se caracterizaron en forma molecular. Se determina la acumulación de desaturasa delta-9 resultante en las semillas de plantas transgénicas, y se identifican las plantas que expresan en forma robusta el polipéptido de desaturasa delta-9.

20 La evidencia a partir de la expresión de AnD9DS en *Arabidopsis* y canola (Ejemplos 11 y 12) indica un nivel de expresión significativamente mayor de esta enzima de desaturasa particular, en forma relativa a HzD9DS y LnD9DS-2. Por lo tanto, todo o partes de los N y C-términos que están

25 fuera del dominio de la desaturasa del núcleo (que contienen

los segmentos de transmembrana y los residuos de histidina catalítica conservados) de AnD9DS, se pueden utilizar para reemplazar residuos equivalentes en las desaturasas de menor expresión e incrementar la expresión de las mismas. Por 5 consiguiente, todos o parte de los residuos del 1 al 68 N-terminal y los residuos 281 al 455 C-terminal de AnD9DS (SEC ID NO:72 y SEC ID NO:73, respectivamente) fueron utilizados para reemplazar todo o parte de los 68 residuos (1-68) N-terminal, y los 168 residuos (281-449) C-terminal de LnD9DS-2 10 (SEC ID NO:14) y/o los 76 residuos (1-76) N-terminal y los 60 residuos (293-353) C-terminal de HzD9DS (SEC ID NO: 13). Se clonó la secuencia de codificación resultante dentro de un plásmido de expresión de planta utilizando la estrategia de clonación descrita en el Ejemplo 3. El plásmido construido 15 recientemente se utiliza para transformar de manera estable una célula, material o tejido de planta de *Arabidopsis* y/o canola. Las plantas transgénicas son regeneradas a partir de la célula, material o tejido de la planta transformada. Las plantas transgénicas son aisladas y caracterizadas molecularmente. Se 20 determina la acumulación de desaturasa delta-9 resultante de semillas de plantas transgénicas, y se identifican las plantas que expresan en forma robusta el polipéptido HzD9DS modificado o LnD9DS-2 modificado.

Ejemplo 16: Modificaciones para mejorar la expresión de 25 mARN de desaturasa acil-CoA dentro de las plantas

Se sabe en la técnica que la expresión del mARN puede mejorarse a través de la incorporación de elementos genéticos que estabilizan e incrementan la acumulación de mARN. La incorporación de regiones no traducidas 5' y 3' (por ejemplo, 5 secuencias 5' y 3' de Osmotina de Tabaco UTR (Liu et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:1222-8), y la secuencia Ω de Virus de Mosaico de Tabaco (Gallie et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:8693-711)) o los intrones (Koziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405), dentro de la proximidad cercana de una 10 secuencia de codificación HzD9Ds o LnD9DS-2, se utiliza para incrementar los niveles de expresión del transgen cuando se comparan con la expresión de la misma secuencia de codificación que carece de los elementos genéticos antes mencionados. La adición de uno o más de estos elementos 15 genéticos dentro de una PTU de desaturasa, se lleva a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Se agregan fragmentos de polinucleótido que comprenden la región no traducida 5', la región no traducida 3' y/o el intrón, a un plásmido de expresión de la planta (por ejemplo, pDAB7319, 20 pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, pDAB7330, o los plásmidos precedentes utilizados para construir pDAB7319, pDAB7321, pDAB7324, pDAB7326, pDAB7328, o pDAB7330) a través de métodos de clonación estándar. El plásmido construido recientemente se utiliza para transformar de manera 25 estable una célula, material o tejido de planta de *Arabidopsis*

y/o canola. Las plantas transgénicas son regeneradas a partir de la célula, material o tejido de planta transformada. Las plantas transgénicas son aisladas y molecularmente caracterizadas. Se determina la acumulación de desaturasa delta-9 resultante en semillas de plantas transgénicas, y se identifican las plantas que expresan en forma robusta el polipéptido HzD9DS o LnD9DS-2.

Además, en la técnica se sabe que los genes de desaturasa de levadura, tales como *OLE1*, son altamente regulados. La eliminación de la secuencia que codifica las regiones de transmembrana y que son parte del dominio del citocromo b5, reducen la estabilidad de la transcripción *OLE1*. Vemula et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(46):45269-79. La presencia de estas secuencias dentro de *OLE1*, actúan como secuencias de estabilización de mRNA. Por consiguiente, la incorporación de las secuencias *OLE1* que codifican la región de transmembrana y el dominio de citocromo b5 en una secuencia de codificación LnD9DS-2 o HzD9DS, se utiliza para incrementar la estabilidad de la transcripción de mRNA de la secuencia de codificación, dando como resultado de esta forma mayores niveles de expresión y un incremento subsecuente del polipéptido LnD9DS-2 o HzD9DS. Se construyó una secuencia de codificación LnD9DS-2 o HzD9DS quimérica que incluye la región de transmembrana *OLE1* y el dominio b5 de citocromo, utilizando métodos conocidos en la técnica. La secuencia de

codificación producida de esta forma, se incorpora en un plásmido de expresión la planta (por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos anteriores), y se utiliza para generar plantas transgénicas a través de la transformación de la planta transmitida por *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas son aisladas y caracterizadas. Se determina la acumulación de desaturasa delta-9 resultante, y se identifican las plantas que expresan en forma robusta la desaturasa delta-9.

Ejemplo 17

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

Debido al número limitado de terminadores-3' UTR disponibles, el terminador 3' UTR ORF 23 de *Agrobacterium* (AtuORF23 3' UTR) se utiliza normalmente para terminar la transcripción. Se mostró recientemente que los otros terminadores 3' UTR son más efectivos para terminar la lectura de transcripción en *Arabidopsis thaliana*. Por consiguiente, el terminador 3'UTR de Faseolina *Phaseolus vulgaris* (SEC ID NO: 69) se utiliza en combinación con el promotor de Faseolina de *Phaseolus vulgaris* para reducir la lectura de transcripción de genes de la corriente ascendente, reduciendo de esta forma la interferencia de transcripción.

El terminador 3'UT de Faseolina *Phaseolus vulgaris* (PvPhas 3'UTR v1) fue incorporado dentro del cartucho de expresión LnD9DS-2 v2, y dentro del cartucho de expresión

HxD9DS v2, los cuales fueron descritos previamente en el
plásmido pDAB7321 y pDAB7326. De acuerdo con métodos
conocidos para los expertos en la técnica, se colocó un
fragmento de polinucleótido que comprende PvPhas 3'UTR v1
5 en la corriente descendente de un gen LnD9DS-2 v2 para crear
el plásmido binario, pDAB110110 (figura 4a; SEC ID NO: 74).
También se colocó un fragmento de polinucleótido que
comprende PvPhas 3'UTR v1 en la corriente descendente de un
gen HxD9DS v2 para crear el plásmido binario pDAB110112
10 (figura 4b; SEC ID NO:75).

Los plásmidos binarios resultantes fueron confirmados
mediante digestión y secuenciación de enzimas de restricción.
Los plásmidos construidos recientemente cada uno fueron
utilizados para transformar de manera estable una célula,
15 material o tejido de planta de *Arabidopsis* y/o canola. Las
plantas transgénicas se regeneran a partir de la célula, material
o tejido de la planta transformada. Las plantas transgénicas se
aíslan y caracterizan molecularmente. Se determina la
acumulación de desaturasa delta-9 resultante en semillas de
20 plantas transgénicas, y se identifican las plantas que expresan
en forma robusta el polipéptido HxD9DS o LnD9DS-2.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica para una enzima de desaturasa delta-9
5 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a SEC ID NO:14, en donde la molécula de ácido nucleico comprende además un elemento regulador de gen que está ligado de manera operable al polinucleótido.

2. La molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con
10 la reivindicación 1, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótido por lo menos 60% idéntica a una secuencia que se selecciona a partir del grupo que consiste de SEC ID NO:8, SEC ID NO:11, SEC ID NO:17 y SEC ID NO:44.

3. La molécula de ácido nucleico de conformidad con la
15 reivindicación 1 ó 2, en donde el elemento regulador de gen se selecciona a partir del grupo que consiste del promotor de desaturasa delta-9 de *Saccharomyces cerevisiae*, el terminador/3'UTR de desaturasa delta-9, el promotor de gen *ole1*, el promotor de faseolina, la región no traducida 5' de faseolina de *Phaseolus*
20 *vulgaris*, la región no traducida 3' de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, la región de adhesión de matriz de faseolina de *Phaseolus vulgaris*, la región no traducida 3' ORF23 de *Agrobacterium tumefaciens*, el Promotor de Virus de Mosaico de vena de Tapioca, la región no traducida 3' ORF1 de *Agrobacterium tumefaciens*, la región de

Adhesión de Matriz de *Nicotiana tabacum* RB7, "Overdrive".

secuencias de extremo de hebra-T, el promotor LfKCS3, el promotor FAE 1, SEC ID NO:40, SEC ID NO:41, SEC ID NO:42, SEC ID NO:43, una etiqueta Myc y una etiqueta de hemaglutina.

5 4. Una enzima de desaturasa delta-9 aislada que comprende una secuencia de aminoácido por lo menos 80% idéntica a SEC ID NO:14.

 5. Un polipéptido de desaturasa delta-9 quimérica que comprende SEC ID NO:72 y/o SEC ID NO: 73, en donde el polipéptido
10 comprende además la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:77.

 6. Un método para disminuir la cantidad de ácidos grasos saturados en una célula de planta, el método comprende:

 transformar una célula de planta con la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, de modo tal que se
15 disminuya la cantidad de ácidos grasos saturados en la célula de planta.

 7. El método de conformidad con la reivindicación 6, que comprende transformar además la célula de la planta con por lo
20 menos una molécula de ácido nucleico que codifica para una enzima de desaturasa delta-9 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a SEC ID NO:14.

 8. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde la transformación adicional de la célula de la planta introduce en la célula de la planta un medio para disminuir los niveles de 16:0-

ACP en la célula de la planta, en donde de preferencia el medio para disminuir los niveles de 16:0-ACP en la célula de la planta es una desaturasa extraplastidial, de preferencia la desaturasa es una desaturasa LnD9DS.

- 5 9. Una planta de semilla de aceite que comprende un polinucleótido que codifica para una enzima de desaturasa delta-9 que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a SEC ID NO:14, en donde el polinucleótido está ligado de manera operable a un elemento regulador de gen.
- 10 10. Una semilla de planta que expresa una desaturasa extraplastidial que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a SEC ID NO: 14, en donde de preferencia la desaturasa extraplastidial comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO:14.
- 15 11. La semilla de conformidad con la reivindicación 10, en donde la semilla es una semilla de una línea *Brassica napus* transgénica, la semilla tiene niveles disminuidos de 16:0-APC con relación a una versión isogénica de la línea *Brassica napus* transgénica.
- 20 12. Un método para crear una planta genéticamente diseñada que comprende cantidades disminuidas de los ácidos grasos saturados en la planta en comparación con la planta tipo silvestre, el método comprende:
- transformar el material de la planta con la molécula de ácido

nucleico de conformidad con la reivindicación 1; y

cultivar el material de la planta transformada para obtener una planta.

13. El método de conformidad con la reivindicación 6 ó 12, en
5 donde la célula de la planta o la planta se selecciona a partir de un
género que se selecciona a partir del grupo que consiste de
Arabidopsis, Borago, Canola, Ricinus, Theobroma, Zea, Gossypium,
Crambe, Cuphea, Linum, Lesquerella, Limnanthes, Linola,
Tropaeolum, Oenothera, Olea, Elaeis, Arachis, rapeseed, Carthamus,
10 *Glycine, Soja, Helianthus, Nicotiana, Vernonia, Triticum, Hordeum,*
Oryza, Avena, Sorghum, Secale, y otros miembros de la *Gramineae*.

14. Un material de la planta que comprende un polinucleótido
que codifica para una enzima de desaturasa delta-9 que comprende
una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a
15 SEC ID NO:14, en donde el polinucleótido está ligado de manera
operable a un elemento regulador de gen, el material de la planta de
preferencia es una semilla.

RESUMEN

Las composiciones y métodos incluyen codificar y expresar genéticamente una desaturasa delta-9 novedosa en células de planta.

5 En algunas modalidades, los métodos para expresar ácidos nucleicos en una célula de la planta, toman la ventaja de la actividad de la enzima de desaturasa delta-9, de modo que se disminuya el porcentaje en la composición de los ácidos grasos saturados en las semillas de la planta y exista un incremento concomitante en los

10 ácidos grasos ω -7. En otras modalidades, las secuencias de aminoácido tienen actividad de desaturasa delta-9. Los métodos pueden implicar la expresión de la desaturasa delta-9 en células de planta, materiales de planta y plantas completas, con el propósito de incrementar la cantidad de ácidos grasos inusuales en plantas

15 completas, semillas de planta y materiales de la planta, por ejemplo, semillas.

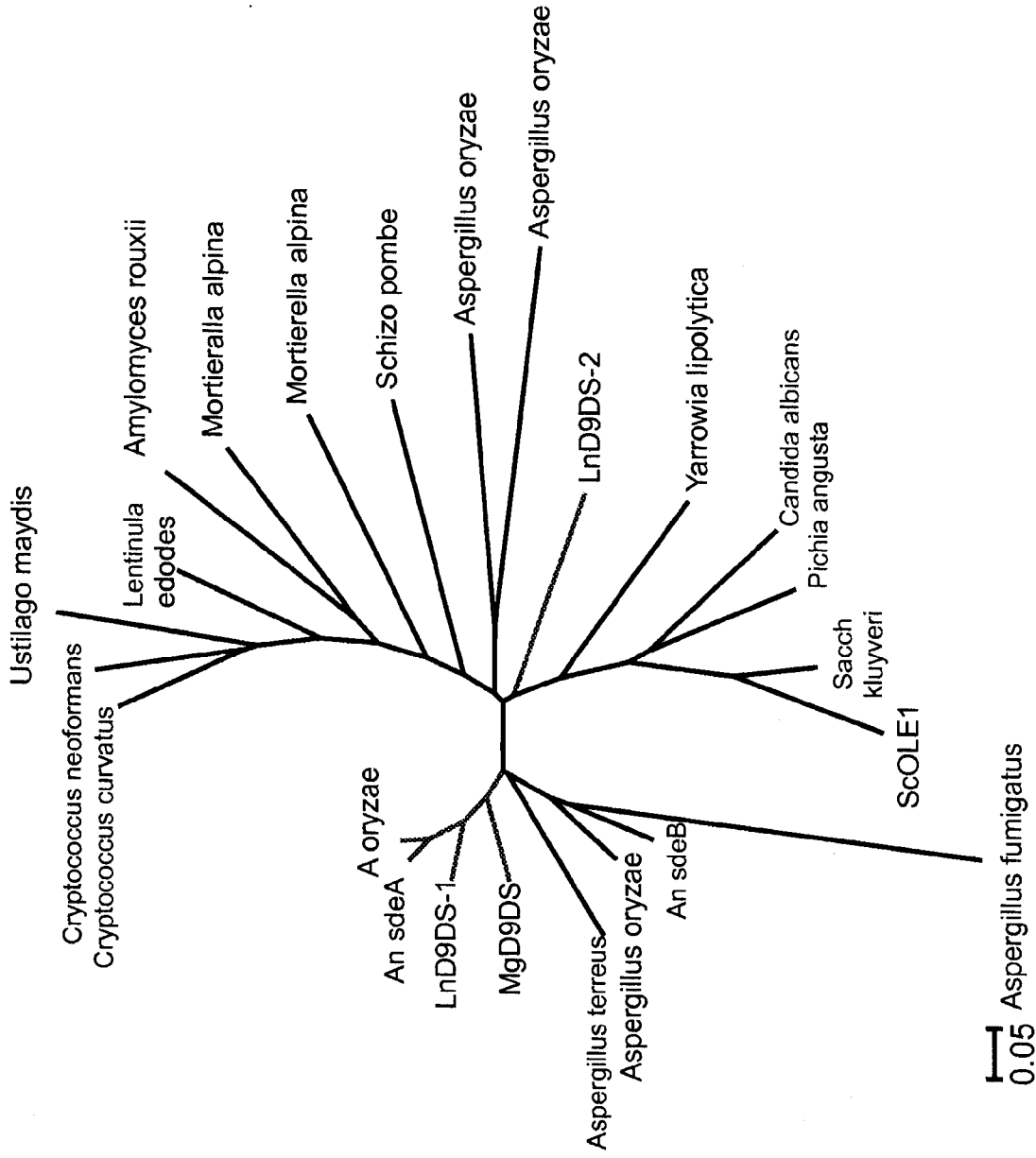


FIG. 1

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

(37) cgactggaaagcgggacagtgagcgcacgcaattaatgtgagttagctcactcatta
 (1) -----
 (1) -----

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

(151) cggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagctcgaat
 (1) -----
 (1) -----

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

(265) aactagtggatccccgggctgcaggaattcggcagcagatgccttcccaccAggc
 (1) -----
 (1) -----gAatt

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

(377) GCgAGCAcCTCgGAGCCCAaccGcAACTCCAAG---TACGAtcCtAAgAAGCCGCAC
 (19) GacAGCAttcCaGAGgatAAGgctAcCTC---G---T-----CgAAatcGaCtCAT
 (61) aCtAcCgaCTtcaAGCCCAAtGaGgAACaCAAGggcTACGAcgtcAgcAAGCCGCAC

(431) ATTaCAGAcAtgCCcATcACgCggtcaAACTGGTAccAGCAtGTCAACTGGCTCAAC
 (64) ATTcaAtAtcaAgaagTaActtTtcgGAACTGGTATAAGaAgaTaaATTTGGCTCAAC
 (118) ATTtCcGAgAcACcTAtgACaCTcaaGAACTGGcATAAGCAcGTCAACTGGCTCAAC

(488) gtCAtCTTCATCaTcggCGTGCctCTCGCTGGCTgCGTCgCCgCCTtCTGGaCCcCT
 (121) ACgACGcTggTggTGcTcTaACC---CGCT--CTTgGaCTcTACCTAacacGCaCCa
 (175) ACCACCTTCATctTgtTtGTGCCcCTgGCTGGtcTcTaTCCAcTFACTGGGtCCCT

(545) CTGCAGTGGAA-GACCGCTGcG---TGGGCTGTcATCTACTAtTTCTGgACTGGCC
 (173) CgCCAcTtacAcGACctacGCTcatcTGGtCcGTCCtGFACTACTTCTGCACaGctt
 (232) CTGCAGTGGAA-GACgGCTGta---TGGGCTGTcGTCCTACTACTTTCaaCACcGGCC

FIG. 2a

(597) TCGGtATCACcGCCGGATACCAATCGtCTcTGGGCaCACAagTCaTACAACGCCgGTc
(230) TCGGcATCACaGcCGGATAtCATCGACTaTGGagTCatcGCagCTACTCCGGTcCGTc
(284) TgGGaATtACTGCCGGtTACCacCGACTtTGGGCTCACAGCTCgTACAAGGCtCgC

(654) TTCCtCTgAGgATCTgGCTcGCCGCCGTcGGCGTGGTGGCTGTtGAGGGTTCCATCC
(287) TaCCGCTacGctTaTtCCTaGCCttCacaGGCGCcGGaGCCaTCCaAGGTagtgctC
(341) TTCCGCTcAaaATCTaCCTtGCCGCCGTtGGCGTGGTGGCCGTGAGGGcTCCATCa

(711) GcTGGTGGAGcCGtGAcCACCGGCCACCACCGcTACACCGACACCAAcAAGGACC
(344) GATGGTGGAGcgaaATCACCGGGCCACCACCGATggACCGACACaAtGAAGGACC
(398) GATGGTGGtcCaacGgTCACCGGGCaCACCACCGATACACCGAtACCGAGAAGGACC

(768) CCTACagtGTCCGCAAGGGCCTtCTcTACagcCAtcTCGGATGGATGGTcaTGAAGC
(401) CCTACTCcGttatgcgCGCCtAtTaTtCTCgCACATCGGATGGATGGTatTGAACA
(455) CCTACTCaGTCCGCAAGGGtCTcCTgTACTCaCACATgGGATGGATGcTtTGAAGC

(825) AGAACCCCAAGcgtAtcGGCGGCACCGACATCACCGACTTGAAGGAGGACCCCGTTG
(458) gcgACCCCAAGatcAAAGGCCGaACaGACgTCAGtGAtCTcgACagcGACCCCGTcG
(512) AGAACCCCAAGaagcAgGGCGGCACCGACATCACCGACCTGAAGGAGGACCCCGTTG

(882) TCGTCTGGCAGCACAAGAActAaTCAAGgcCGTcgTCacCATGGgCTTGATCTTtC
(515) TaGTCTGGCAGCACAAGcACTAAGgCAAGTGCCTgcTgTTCgCCGcTgGATaTTC
(569) TCGTtTGGCAGCACcgcAACTtCtCAAGTGTGtTatCTTCATGSCCCTcgTCTTC

(939) CCTtTgcCGTcGCCGGtCTCatgTGGGGcGATTGGatGGGtGGCTTCATCTACCGCtG
(572) CCAtgaTCGTaGCCGGCCTCGGaTGGGGaGATTGGTGGGGAGGCcTgtTCTACCGCcG
(626) CCACacTtGTgGCTGGCCTtGGcTGGGGtGAcTAcTGGGGAGGTTCATCTACCGgaG

(996) GTATCCTcCGTaTCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGGCTCAACTCGCTTGGcC
(629) GcATCaTtCGaGcgTgtTTCGTCCAGCAGGCCgACaTtTGGCGTgAACTCtCTcGGcC
(683) GTATtCTgCGTGTCTTCTTCGTCCAGCAGGCCACCTTCTGGCTCAACTCGCTTGGcC

(1053) ACTGGCTCGGTGACCAGCCcTTCGACGACCGCAACTCtCCTCGTGACCACGTCAITa
(686) AtTGGaTCCGcGAgCAGCCgTTCGACGACaGacgCaCGCCTCGaGACCAGTttIga
(740) ACTGGCTCGGTGACCAGCCtTTCGACGATCGCAACTCGCCgCGTGatCACGTCAITa

(1110) CcGCtCTtGTCACTCTcGGAGAGGGcTACCACAACCTTCCACCACGAGTTCCcTCC
(743) CAGCgtTGGTaACgaTgGGAGaAGGATAtCATAACTTCCACCACGAaTTCCCAagCG
(797) CAGCcCTGGTCACcCTtGGAGAGGGATACCAACAACCTTCCACCACGAGTTCCCTTCgG

(1167) ACTACCGCAACGCcATCGAGTGGcACCAGTACGACCCTACCAAGTGGTCCATCTGGC
(800) AtTAtCGCAACGCgATCatcTGGTACCAaTACGACCCTACCAAAATGGctCAttTacc
(854) ACTACCGCAACGCtAtTgAGTGGTACCAGTAtGACCCcACCAAGTGGTCAATCTGGA

FIG. 2b

(1224) TgTGGG-----GCaAGCTCGGCCTCGCCTcGAACCTCAAGCAGTTCCGCTCCAACG
 (857) FCTtctccctcgGCCcctTCccCTTCGCaTACTcgCTCAAaaccTTCCGgTCCAAtG
 (911) FCTGGA-----agCAGCTtGGtCTtGCCcACAACCTgAAGCAGTTCCGcCaaAACG

(1275) AaATcGAGAAGGGtCGtGTCCAGCAGCTcCAGAAAGAAGaTtGACCAGAAGCCGCGCCA
 (914) AGATTGAaAAAGGgCGgtTgCAaCAaCaaCAaAAagccCTgGACaAGAAGCCGctCag
 (962) AGATTGAGAAGGGaCGcGTCCAGCAGCTgCAGAAAGAAGCTcGACCAGAAGCCGCGCCA

(1332) AGCTcGAcTGGGGTgTcCCTCTCGACCAGCTgCCTGTTCATAgaaTGGGACGACTaTG
 (971) gaCTTGATTGGGGccTaCCCTCttCCAaCTcCCTGTTCATAtcgTGGGACGACTTcc
 (1019) AGCTTGATTGGGGTAtTCCCTTgGAgCAGCTtCCcGttgTtagcTGGGAtGACTTTG

(1389) TcGAGCAG-GCCAAGAA-CgGcCGtGGT-CTcATcGCTGTCCGtGGTGTcGtTCAtG
 (1028) aaGcCGgttGCaAAGAgTCCGCGAGaTgCTGgTTGCTGTCCCaGGTGTgATTCAAG
 (1076) TtGAGCAG-tCCAAGAA--CGGaaAGGcttgGATTGCaGtTCCcGGTGTCAtcCAGC

(1443) ACGTTAcCGACTTCATCAAcGAgCACCCcGGTGGCAaGACgCTtATCAAGAGcGgCG
 (1085) ACGTcAGCcAgTTtATtgAaGAtCACCTGGaGGCAGGAgTtTgATTcGAGtGCgG
 (1130) AtGTTgTgTgACTTCATCAAgGAcCACCTGGTGGCAGagCTCTcATCAActcgGCCa

(1500) TTGGCAAGGATGCcACCcCcaTGTTCaACGGCGGTGTcTACttCCACTCCAACCGgaG
 (1142) TgGGCAaAGATGggACaGggATGTTtAAtGGaGGcGTaIAtgAgCACagTAAtGCgG
 (1187) TTGGCAAGGAcGCaACCcCaATcTTCAACGGCGGTGTtTACaACCCTCCAACCGCcG

(1557) CcCAACCTcCTtTcTAcATGAGGGTtGGTGTcaTcCGcGGTGGCTGTgAaGTTG
 (1199) CgCAtAAtCTGtTgTGGaCaATGAGGGTGGGagTgcTtaGagCTGGgcagGAGGTgG
 (1244) CtCAACCTGCTcTGGActAIGcGtTGGGTGCTttTgCGtGGcGGCTGcGAGGTTG

(1614) AGATCTGGAAGCGCGctCAGcGTGAgAACAAAGGATGTCCGtctGGTC--CTgGAcGA
 (1256) AGgTgTGGAAAGaa-GCagAGaGTGg-----AtGtTtTaGGgAaGagCGaCaTttTGA
 (1301) AGATCTGGAAGCGCGccCAGtccGAaACAAGGAcGTCTcaAccGTGC--TTGATtc

(1669) cgCAGGcAACCCaATCaTcAGGGCTGGTaaCAGattACCAAGGTTGCGCAaCCcAT
 (1307) gaCAGGtTAcGcgggtGgagaGGtTGGTt--gAGGgGgCtgtGGcTGCgtAGctAc
 (1356) ttCgGGTAACcgcATCGTccGcCGGGTgggCAaGcGACCAAGGTCgtcCAGCctgT

(1726) TCAGaTGCTagtgCaGCaTagattggatcttcatcttcacgagcgatgtatggcgt
 (1362) TgAccaTGg-----
 (1413) TCcGgGTGCTcagGCcGCgTga-----

FIG. 2c

(1783) ttggttgctctctctccttggcggacagagtaaatattcaatttcttagcgatcgta
(1371) -----
(1435) -----

(1840) gaaagcatcatggttacgatgctcagtcatgtagatggcgtatggtttagccttc
(1371) -----
(1435) -----

(1897) ctcgagtgatggstatgaaaagtagcctcacggcctagaccaagaatgaaaacatt
(1371) -----
(1435) -----

(1954) cacgatttcagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgagggggggcc
(1371) -----
(1435) -----

FIG. 2d



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

(1) -----MAALDSI
 (1) -----MPSHQAVAGMQAIDPEFVKQSPMASTSEPN
 (1) -----MSAPTADI
 (1) -----MASSSSSVPELAAAFPDGTTDFKPM
 (23) SGIVDEVDLTEANILATGLNKKAPRIVNGFGSLMGSKEMVSVEFDKKGNEKSNLDRL

(8) PEDKA----TSSKSTHIQYQEVTFRNWYKKNWLNNTTLVVLIPALGLYLTRT--TELT
 (32) RNSK----YDPKPHITDMPIITRSNHYQHVNWLNVIIFIIGVPLAGCVAAFW--TPLO
 (9) RARA----PEAKKVHIADTAINRHNWYKHVNWLNVFLIIGIPLYGCIQAFW--VPLQ
 (26) RNTKG----YDVSKPHISETPMTLKNWHKHVNWLNNTTFILFVPLAGLISTYW--VPLQ
 (81) LEKDNQEKEEAKTKIHISEQPWTLNWHQHNLNMLVLCGMPIGWFALSQKVPVH

(60) RPTLIWSVLYFCTAFGITGGYHRLWSHRYSARLPLRLFLAFTGAGAIQGSARWWSA
 (83) WKTAAWAVIYYFWTGLGITAGYHRLWAHKSYNAGLPLRIWLAAVGAGAVEGSIRWWSR
 (60) LKTAIWAVIYYFFWTGLGITAGYHRLWAHCSYSATLPLRIWLAAVGGGAVEGSIRWWSR
 (78) WKTAVWAVVYFNTGLGITAGYHRLWAHSSYKASLPLKIYLAAVGAGAVEGSIRWWSN
 (139) LNVFLFSVFYAVGGVSIITAGYHRLWSHRYSAHWPLRLFYAIFGCASVEGSAKWWGH

(118) NHRAHREWTDTKDPYSVMRGLLFSHIGWMLNSDPKVKGRTEVSELDSDPVVVWQHK
 (141) DHRAHREYTDTKDPYSVRKGLLYSHLGMVMKQNPKRIGRTDITELNEDPVVVWQHK
 (118) DHRAHREYTDTKDPYSVRKGLLYSHLGMVMKQNPKRIGRTDISELNEDPVVVWQHR
 (136) GHRAHREYTDTEKDPYSVRKGLLYSHMGWMLLKQNPQKQGRTDITELNEDPVVVWQHR
 (197) SHRIHREYTDTLRDPYDARRGLWYSHMGWMLLKPNPKYKARADITDMDTDDWTIRFOHR

(176) HYGKCLLFAAWIFPMIVAGLGWGDWGGGLVYAGIIRACFVQOATFCVNSLAHWIGEQP
 (199) NYIKAVVTMGLIFPSAVAGLMWGDWGGFIYAGILRIFVQOATFCVNSLAHWLGDQP
 (176) NYLKVVFTMGLAVPMLVAGLGWGDWLGGFVYAGILRIFVQOATFCVNSLAHWLGDQP
 (194) NFLKCVIFMALVFP TLVAGLGWGDYWGFIYGGILRVFFVQOATFCVNSLAHWLGDQP
 (255) HYILLMLLTAFVIFTLICGYFFNDYMGGLIYAGFIRVFIQOATECINSMAHYIGTOP

(234) FDDRTPRDHVLTALVTMGEYHNFHHEFPDYRNAIKWYQYDPTKWLIIYFLSLGPPF
 (257) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYRNALEWHQYDPTKWSIWLWSK--LG
 (234) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYRNALEWHQYDPTKWSIWAWKQ--LG
 (252) FDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYRNALEWHQYDPTKWSIWIWKQ--LG
 (313) FDDRTPRENWITAIIVTFEGEGYHNFHHEFPDYRNAIKWYQYDPTKVIIYLTSL--VG

FIG. 3a

(292) LAYSLKTFERSNETEKGRLOOQOKALDKKRSGLDWGLPLFQLFVISWDDFQARCKESGE
 (313) LASNLKQFRSNETEKGRVQLOKKIDQKRAKLDWGVPLDQLFVIEWDDYVEQAK-NGR
 (290) LAYDLKKFRANETEKGRVQLOKKLDRKRATLDWCTPLDQLFVMEWDDYVEQAK-NGR
 (308) LAHNLKQFRONETEKGRVQLOKKLDQKRAKLDWGIPLDQLFVVSWDDFVEQSK-NGK
 (369) LAYDLKKFSQNAIEEALIQEQKKINKKAKINWGPVLTDLPMWDKQTFLLAKSK-ENK

(350) MLVAVAGVIHDVSQFIEDHPGGRSLIRSAVGKDGTMFNCGVYEHNSNAAHNLLSTMV
 (370) GLIAVAGVVHDVTDFINEHPGGKTLKSGVGKDATAMFNCGVYFHSNGAHNLLSTMV
 (347) GLVAIAGVVHDVTDFTKDHPPGGKAMISSGIGKDATAMFNCGVYHNSNAAHNLLSTMV
 (365) AWIAVAGVIHDVGDFTKDHPPGGRALINSAIGKDATAIFNCGVYHNSNAAHNLLSTMV
 (426) GLVIIISGIVHDVSGYI SEHPGGETLEKTKALGKDATKAFSGGVYHNSNAAHNLLADMV

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

FIG. 3b

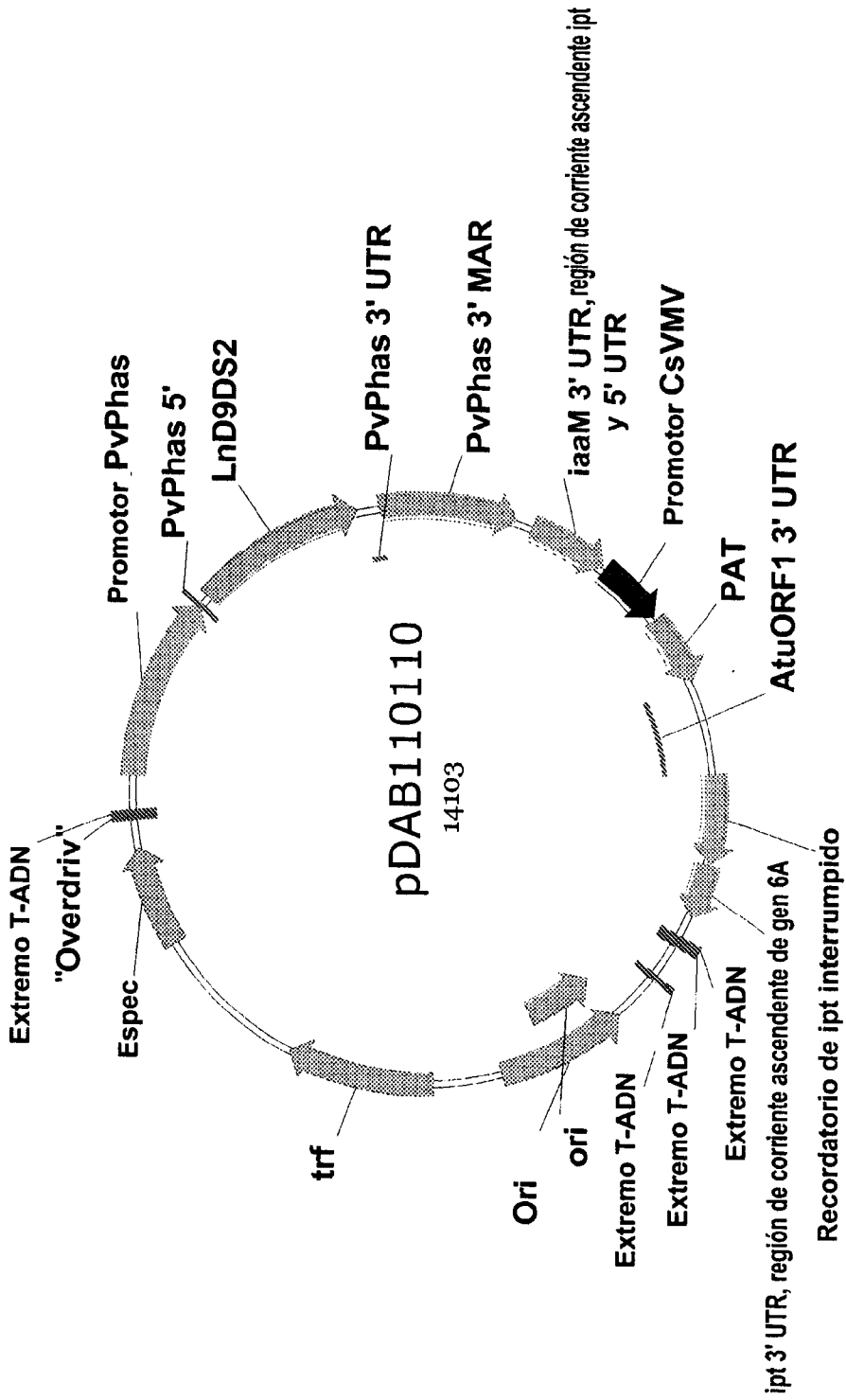


FIG. 4a

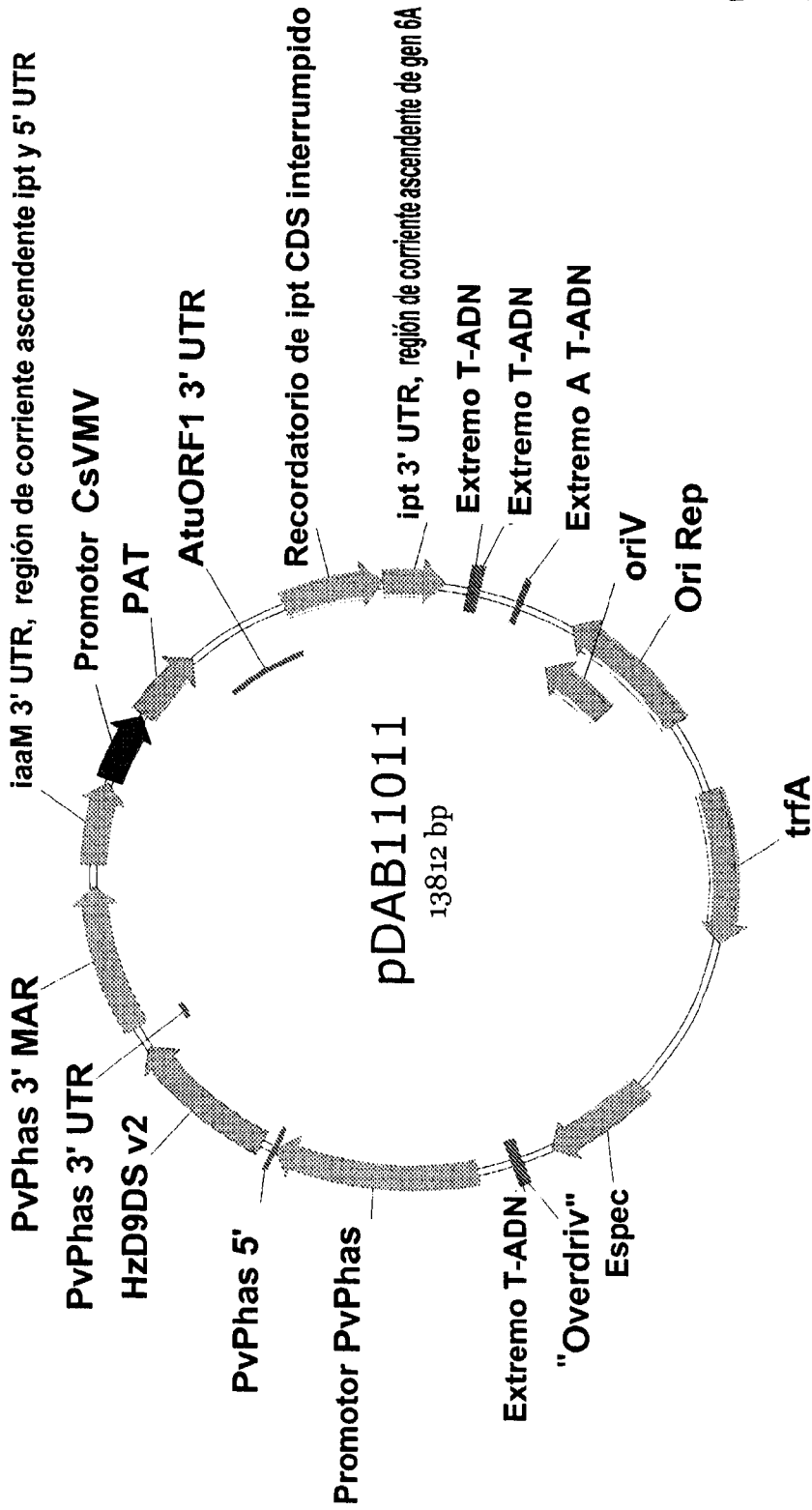


FIG. 4b

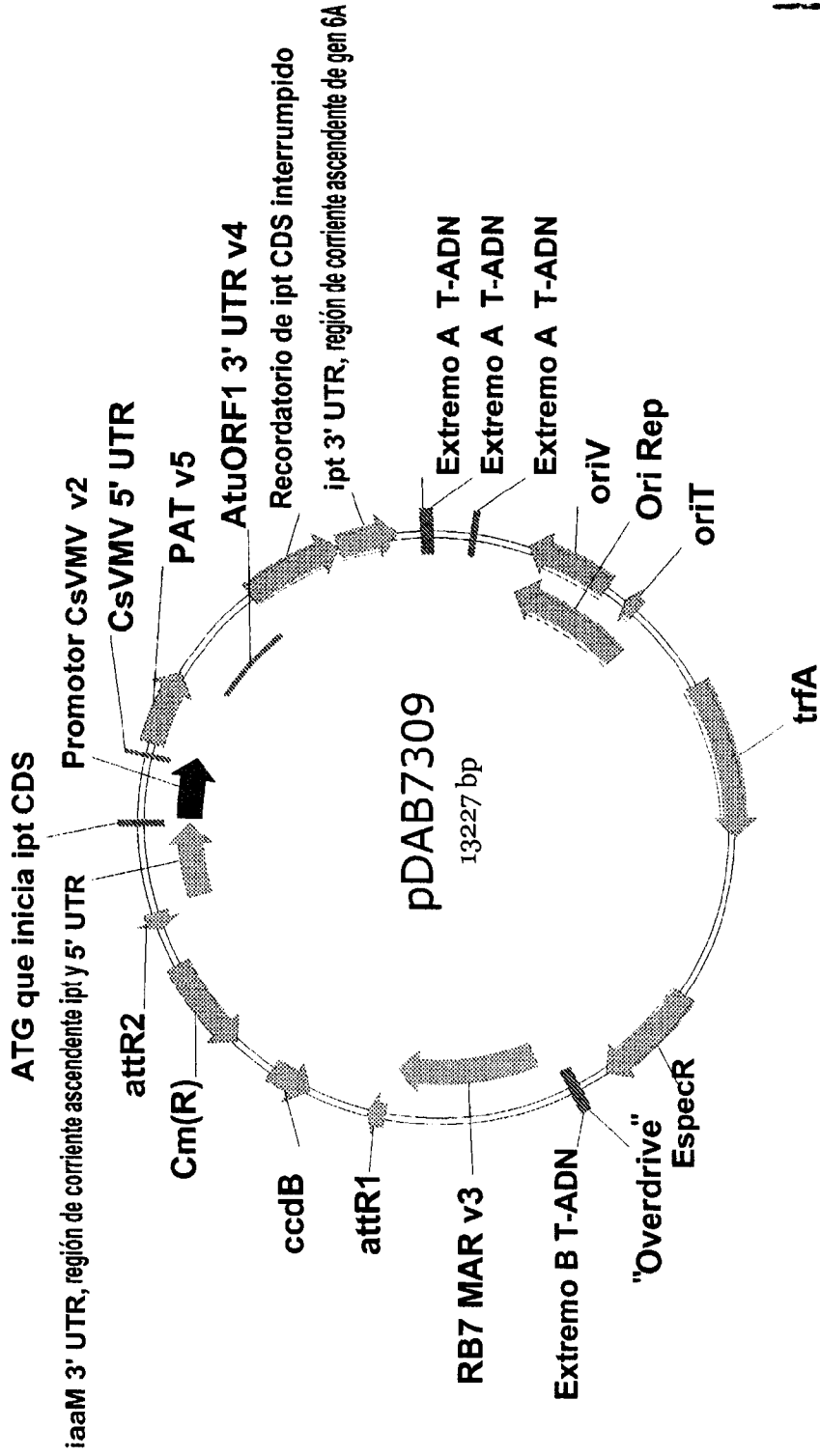


FIG. 5

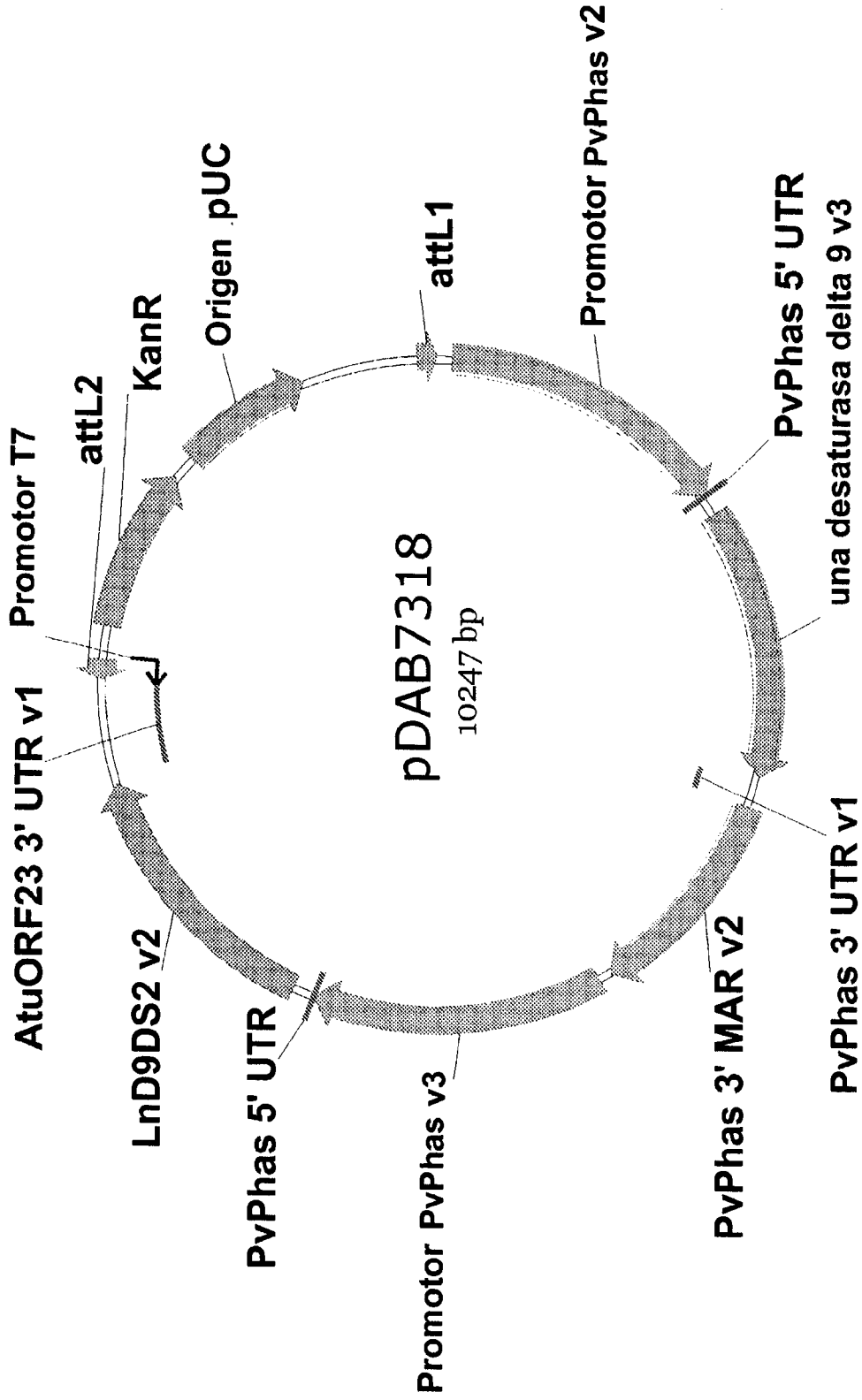


FIG. 6

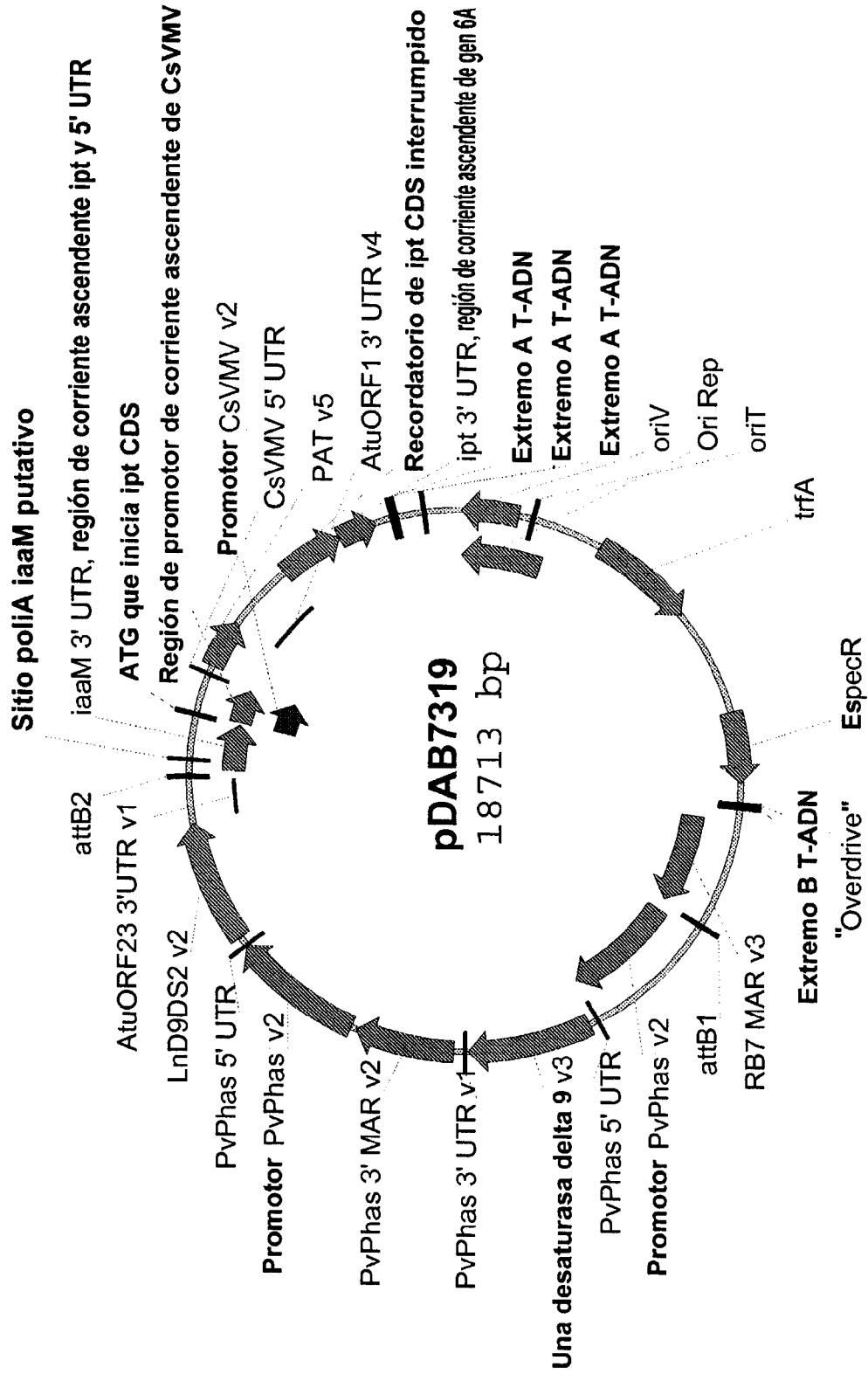


FIG. 7

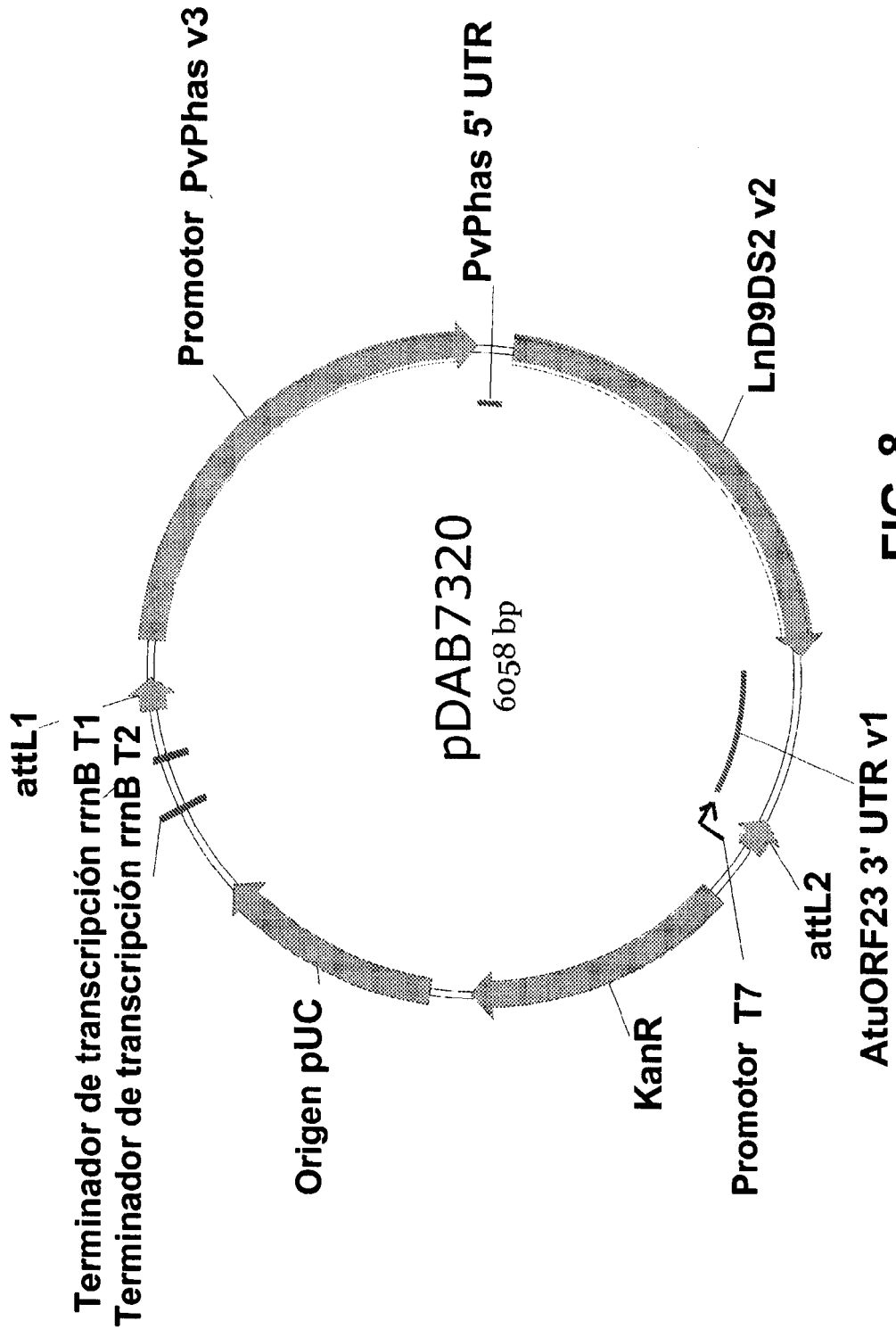


FIG. 8

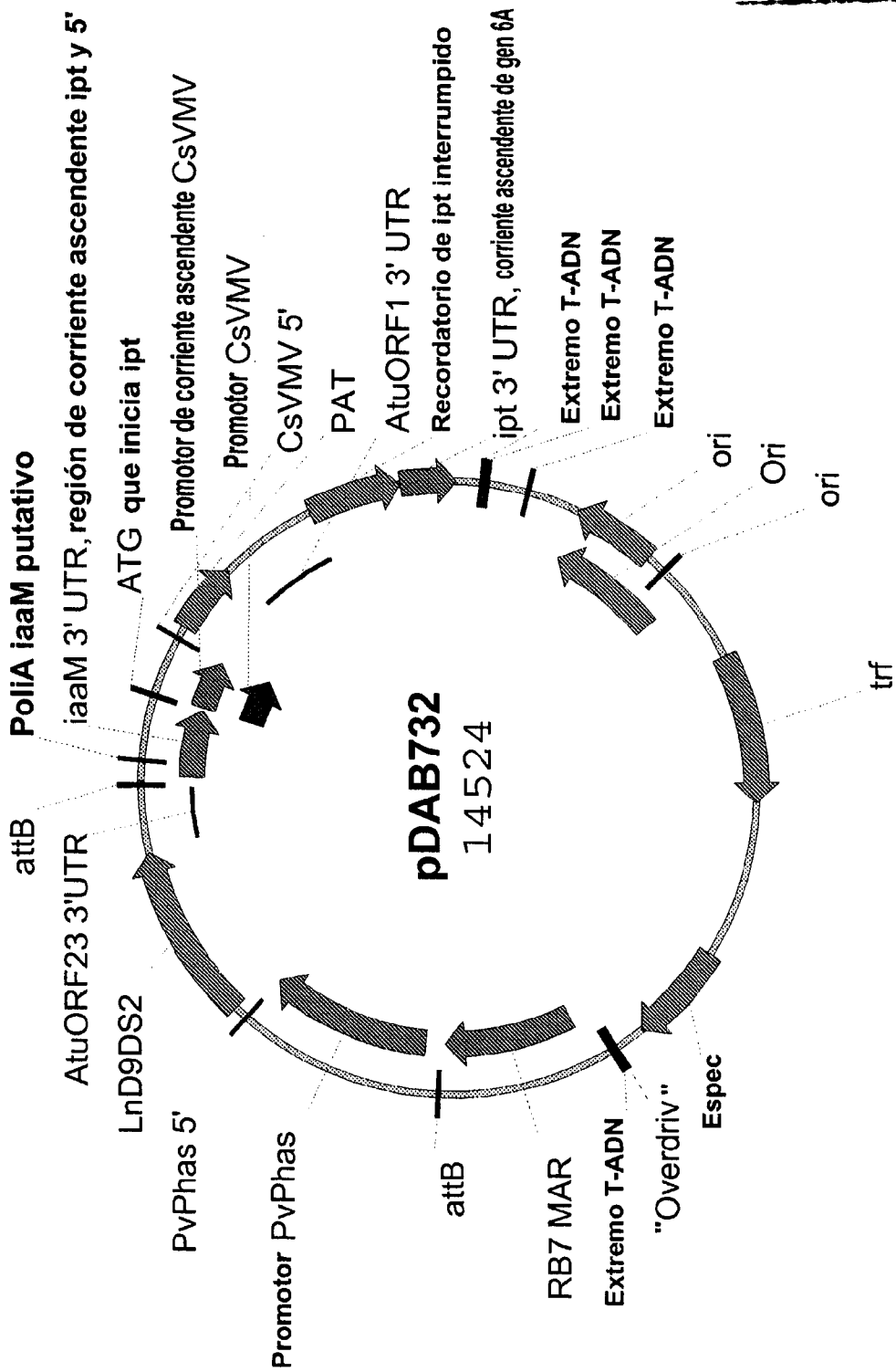


FIG. 9

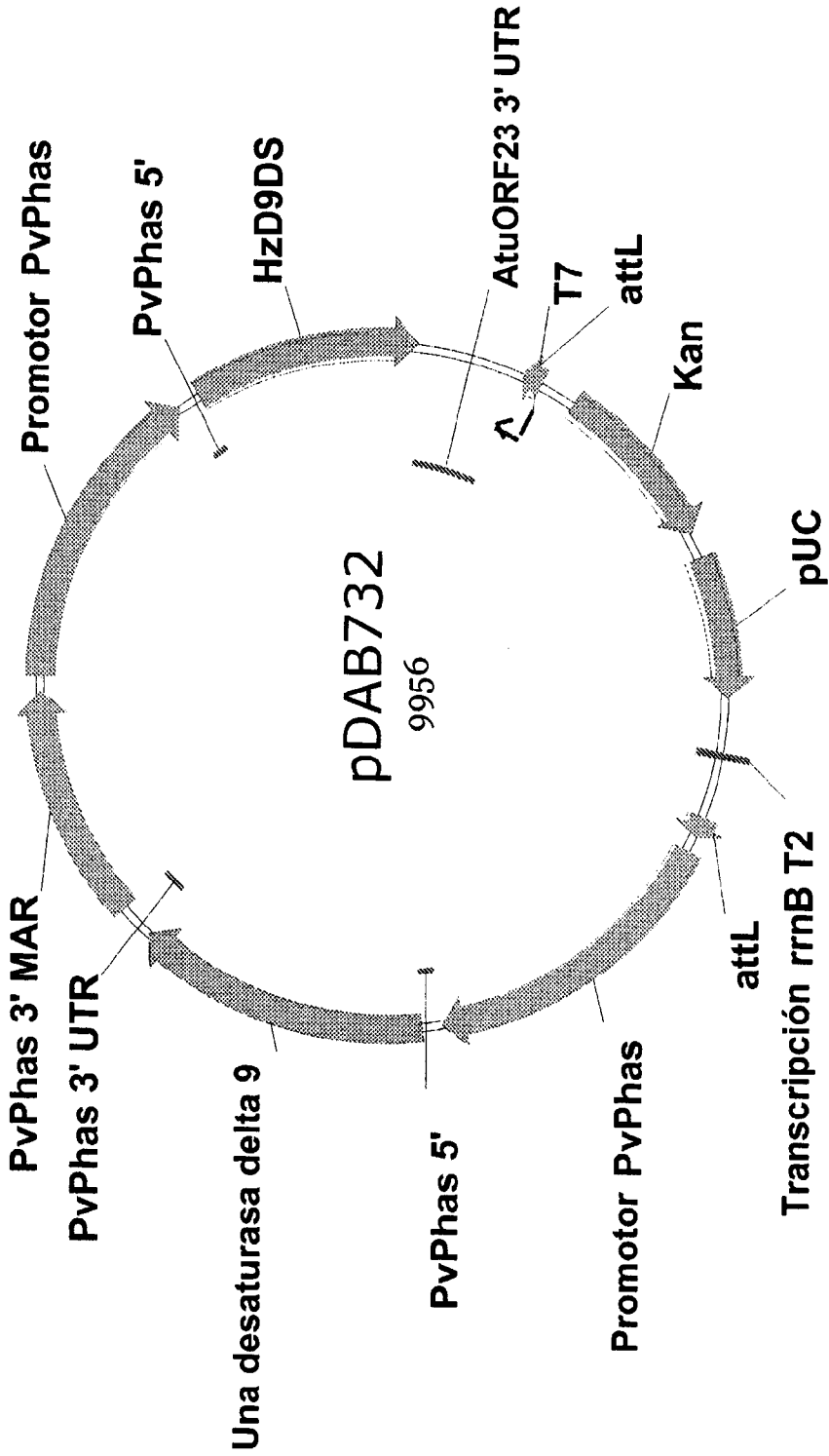


FIG. 10

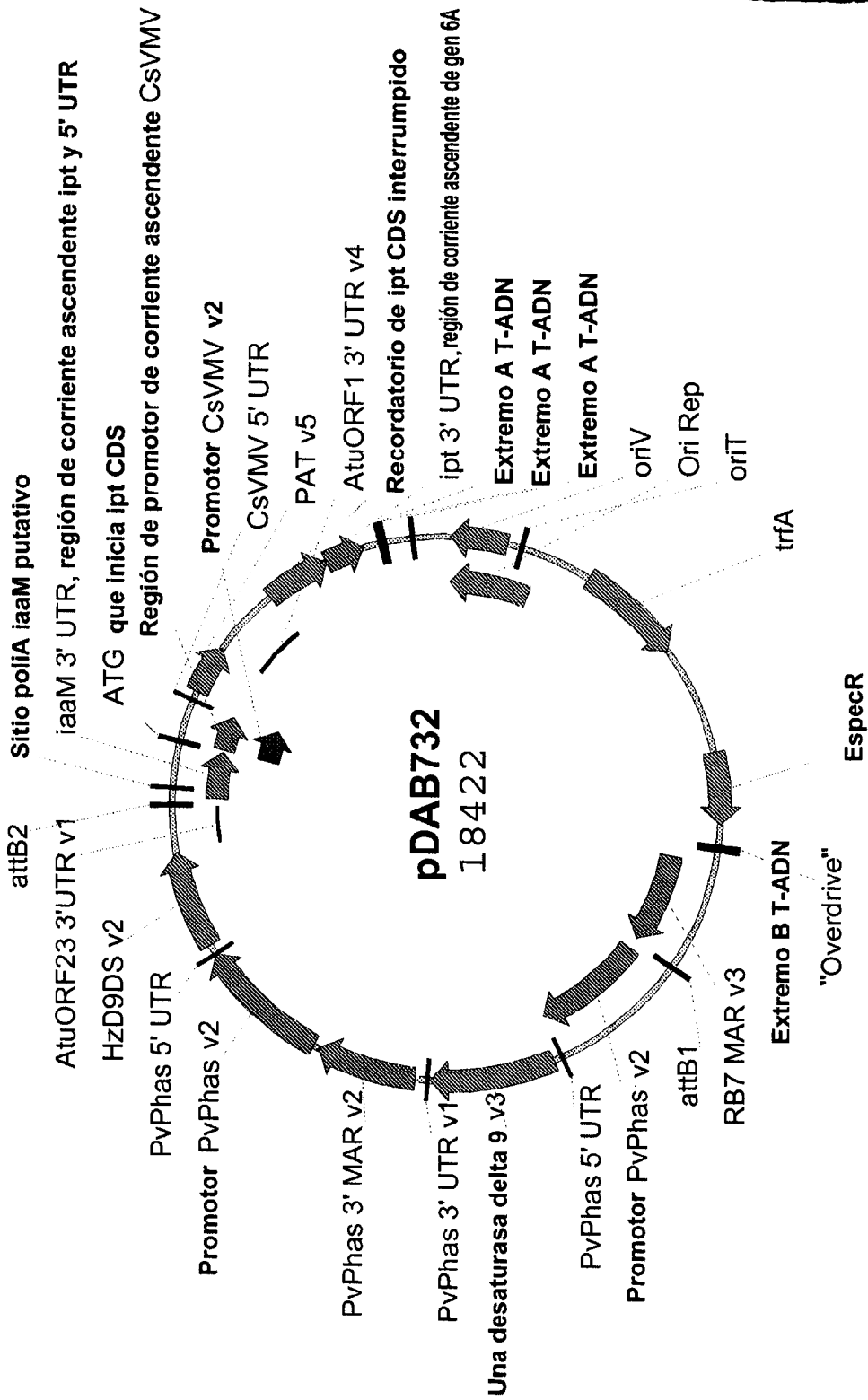


FIG. 11

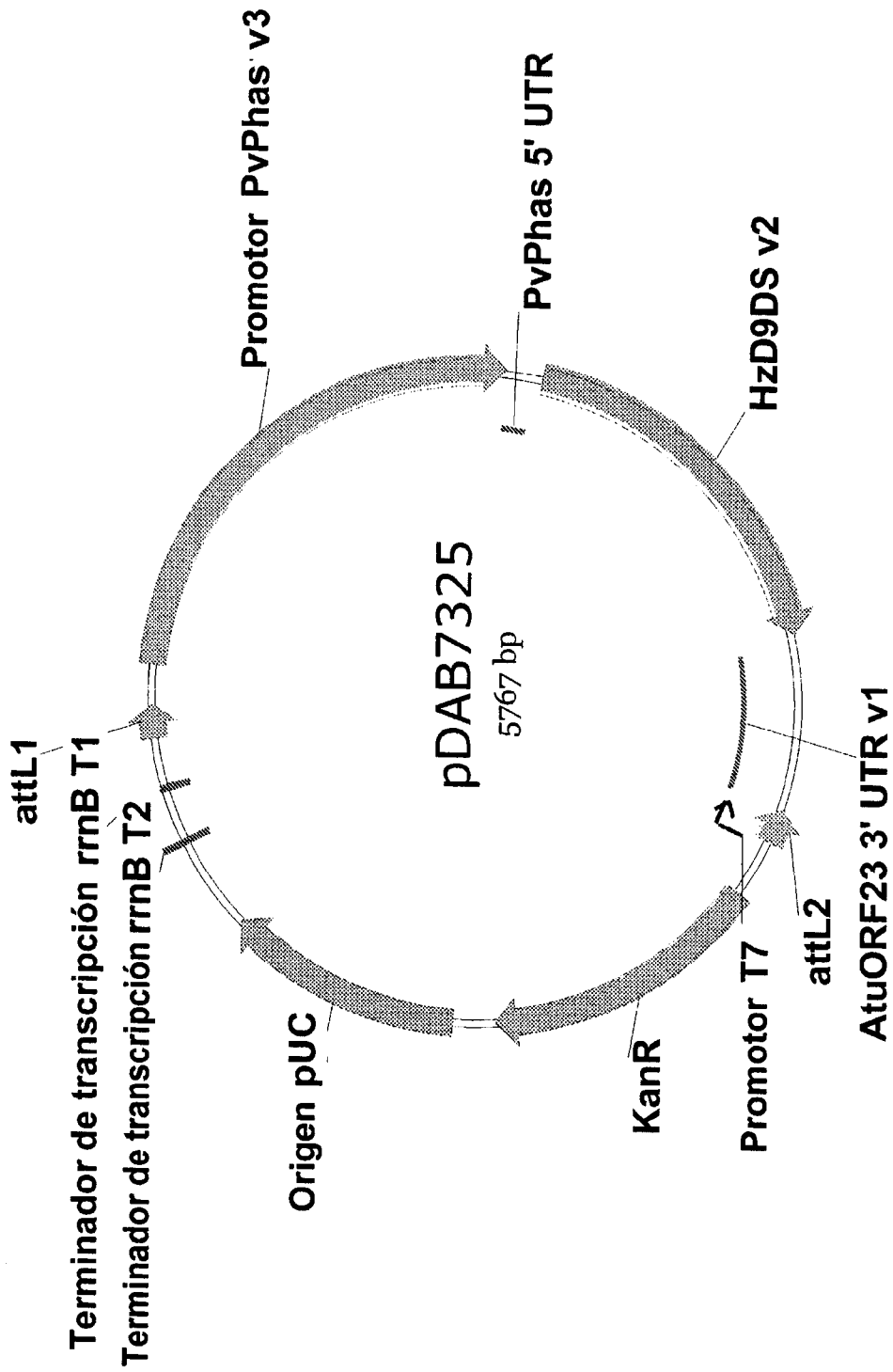


FIG. 12

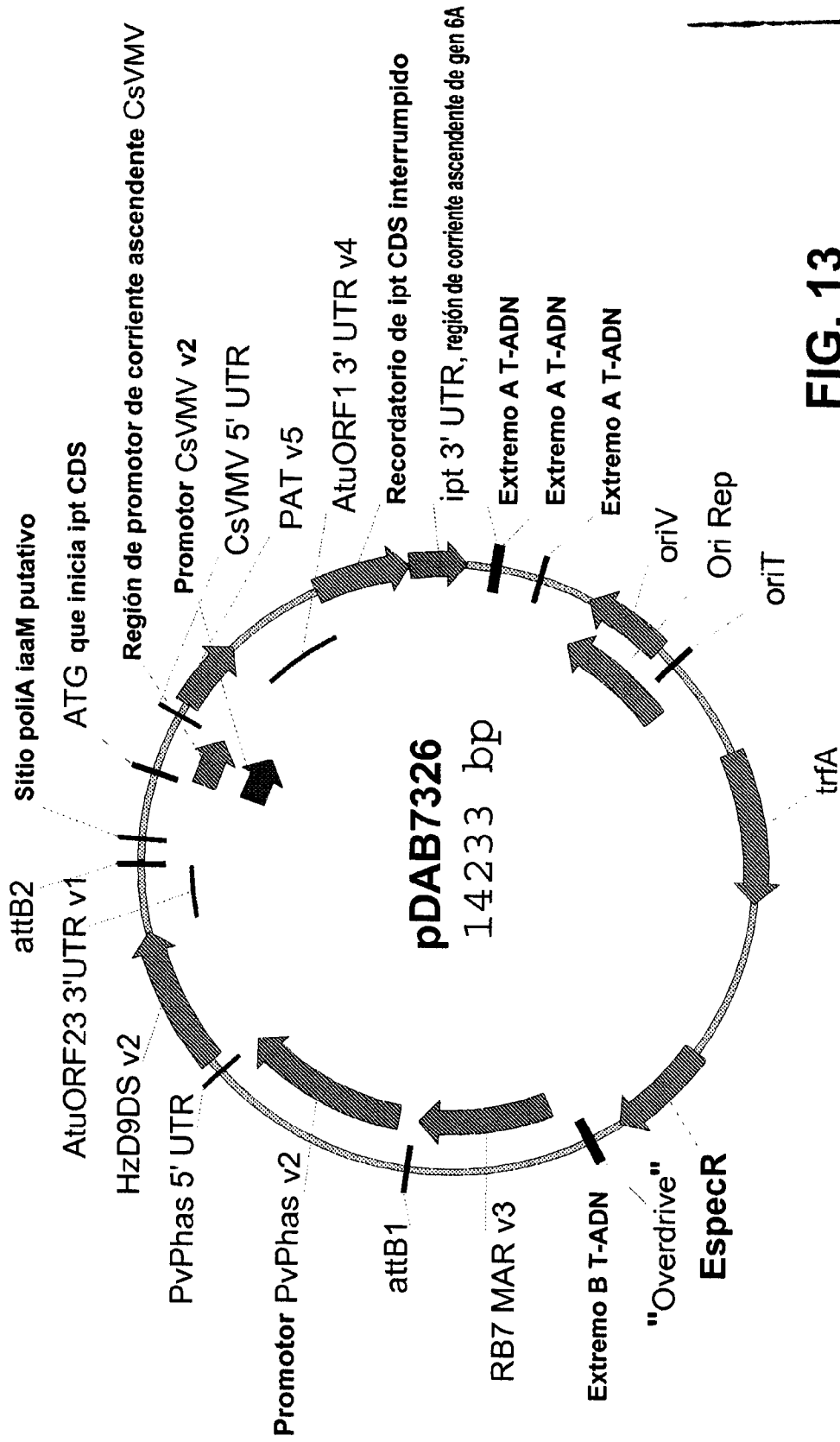


FIG. 13

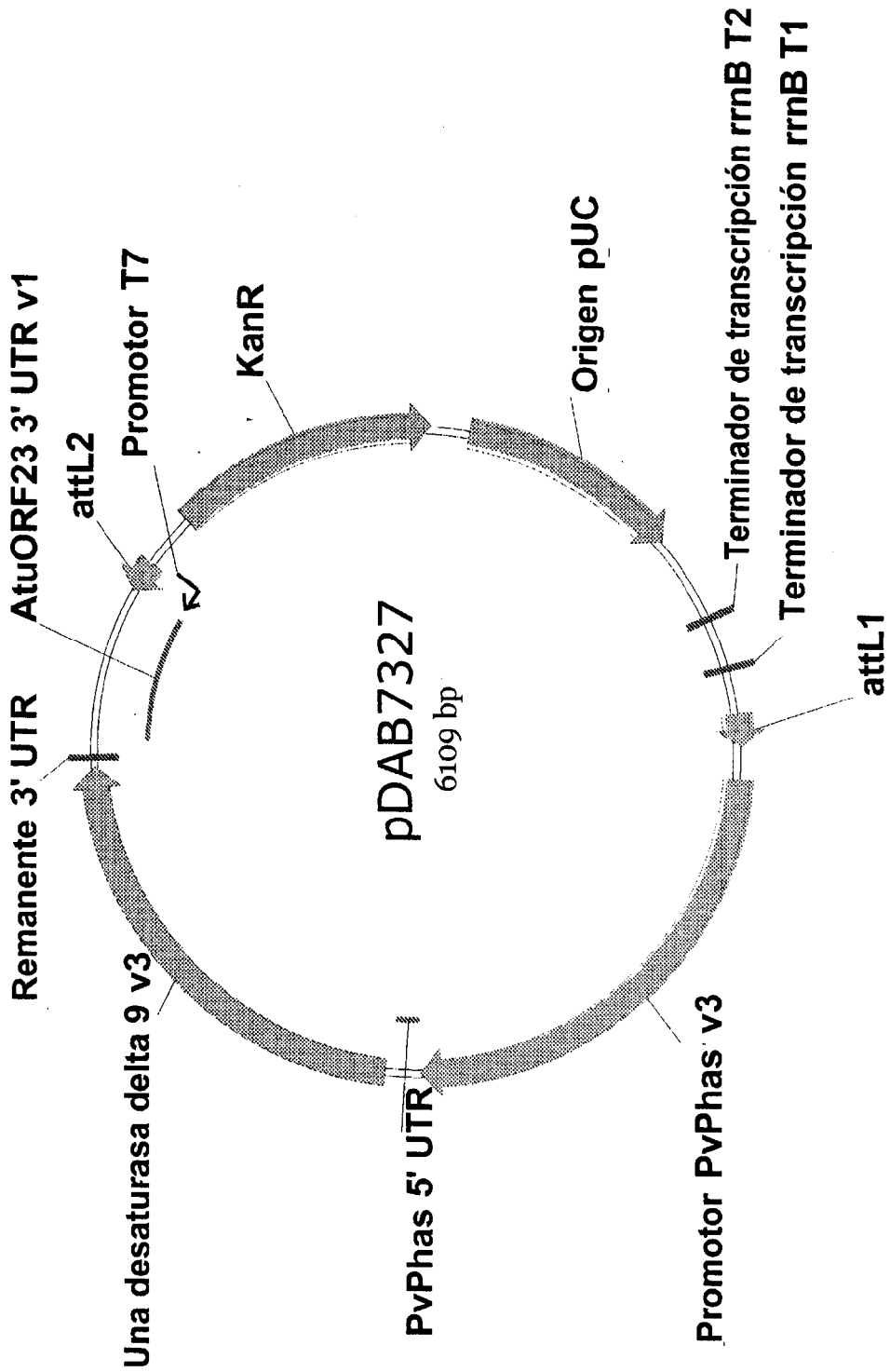


FIG. 14

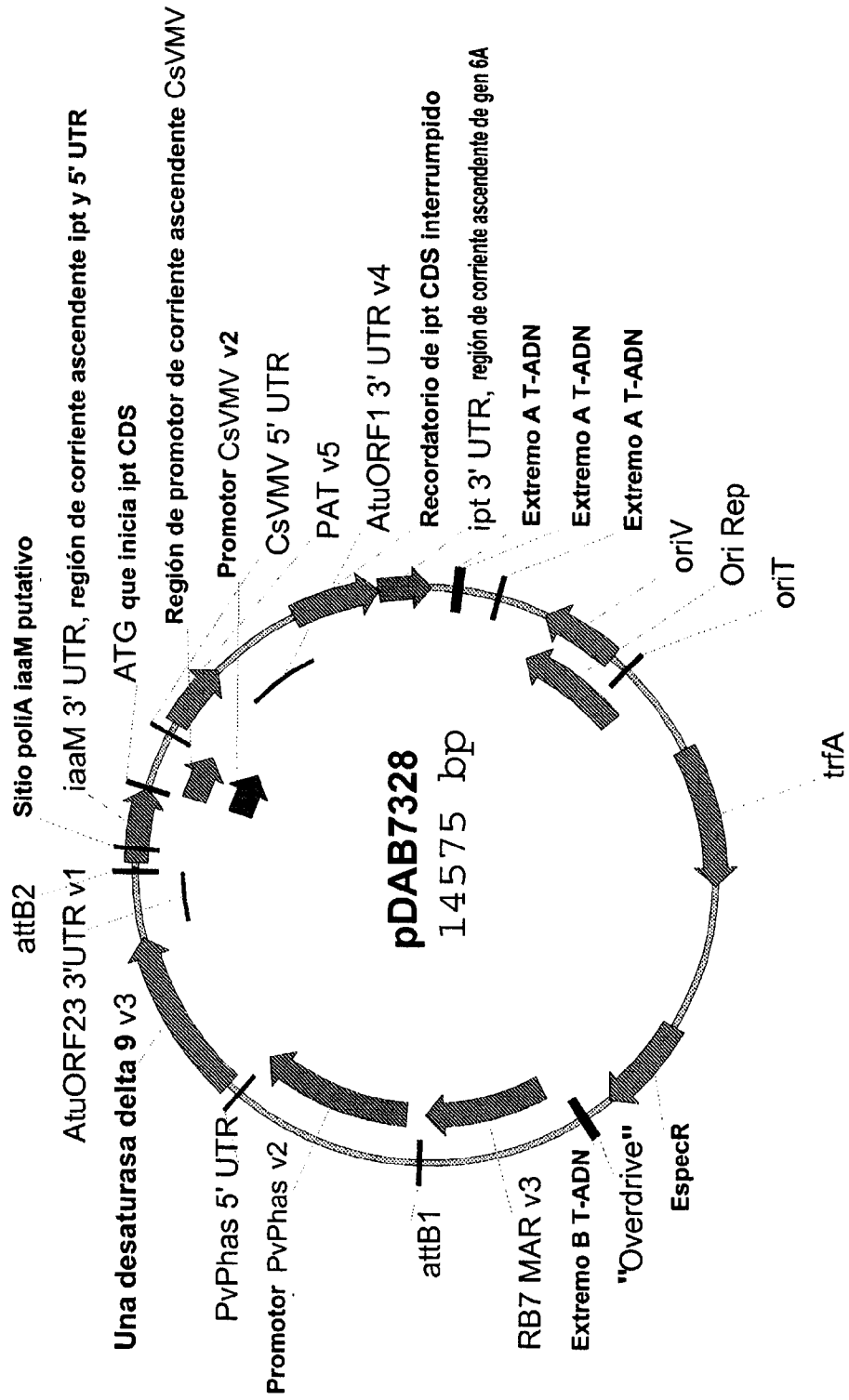


FIG. 15

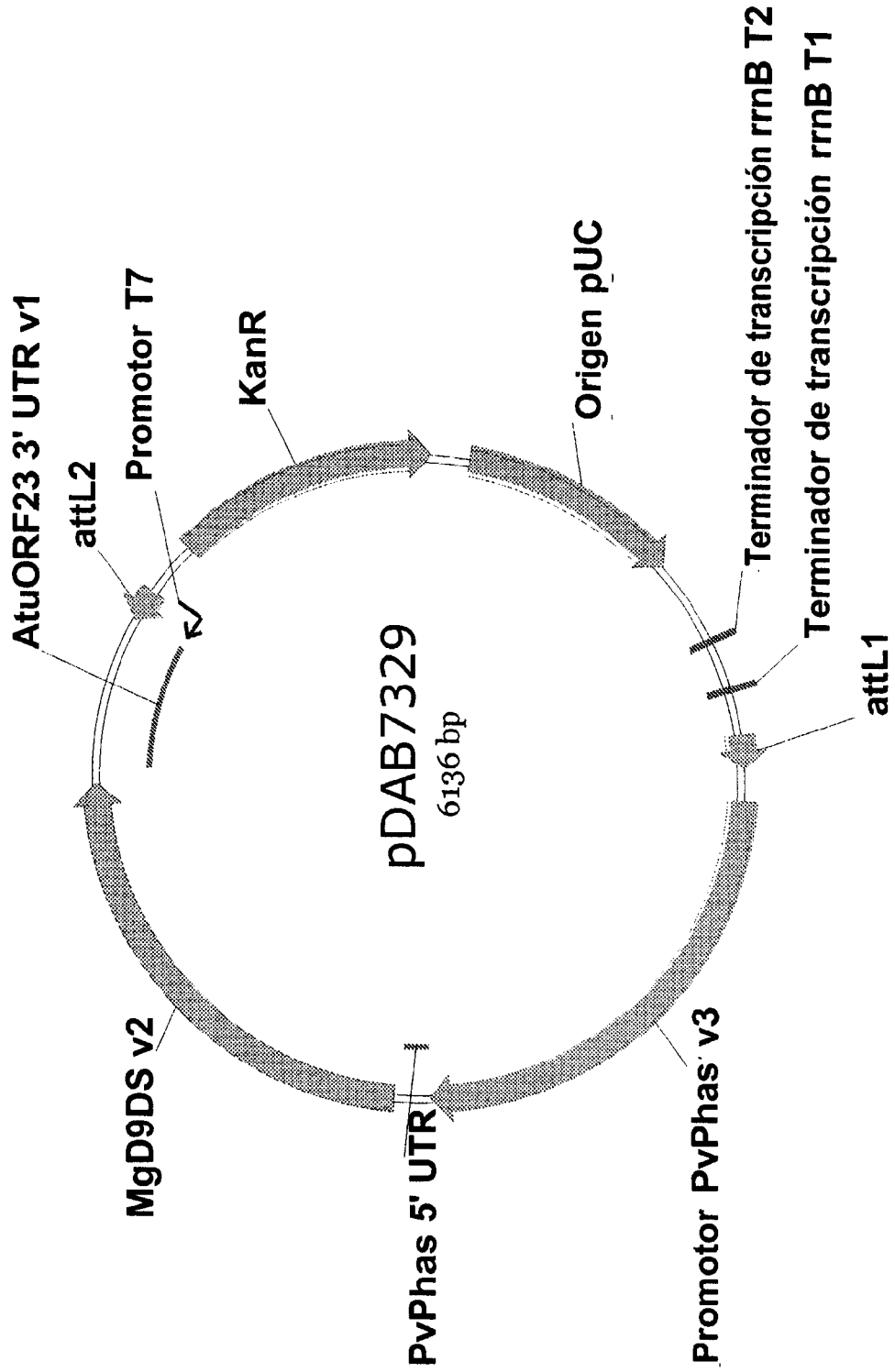


FIG. 16

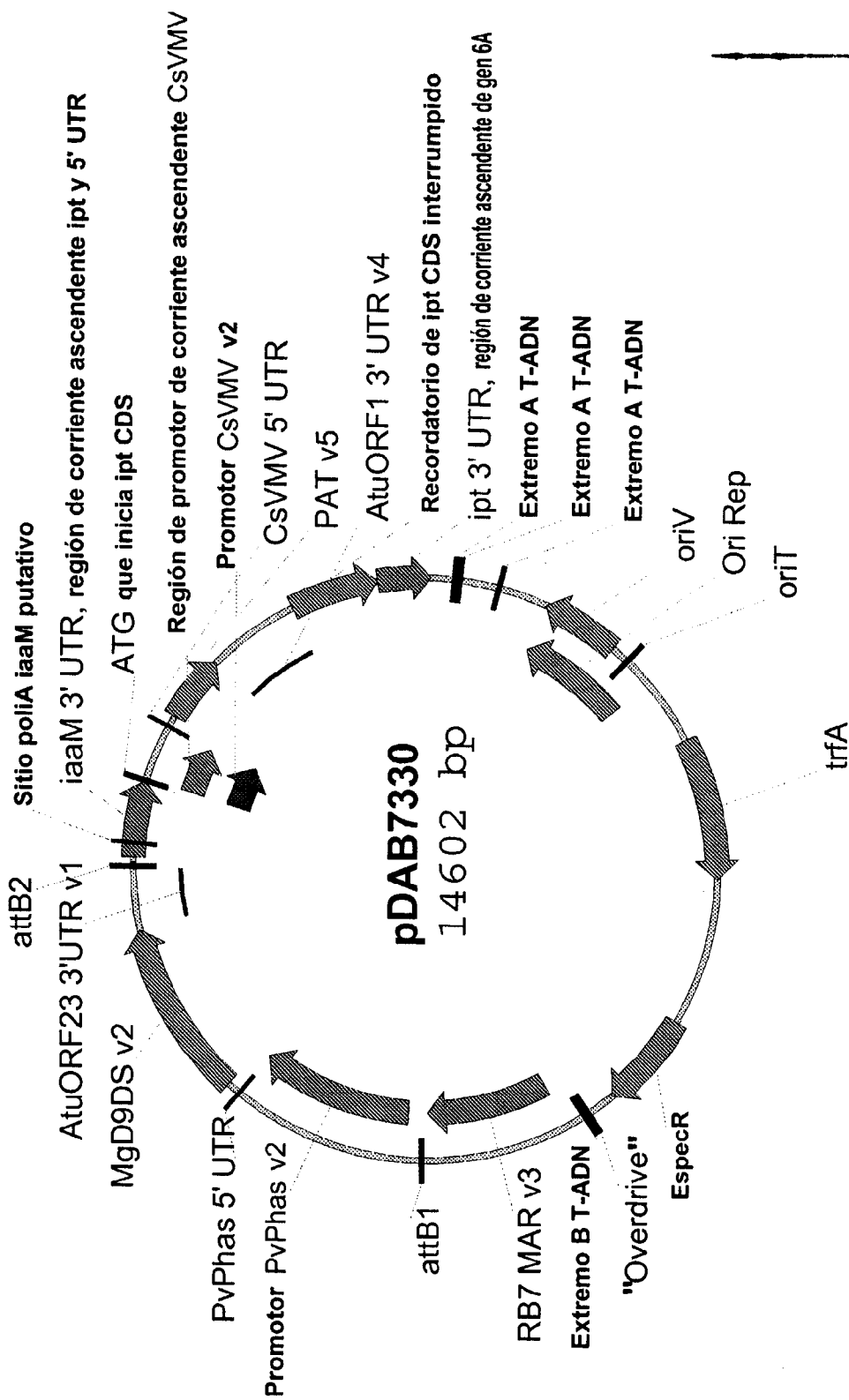


FIG. 17

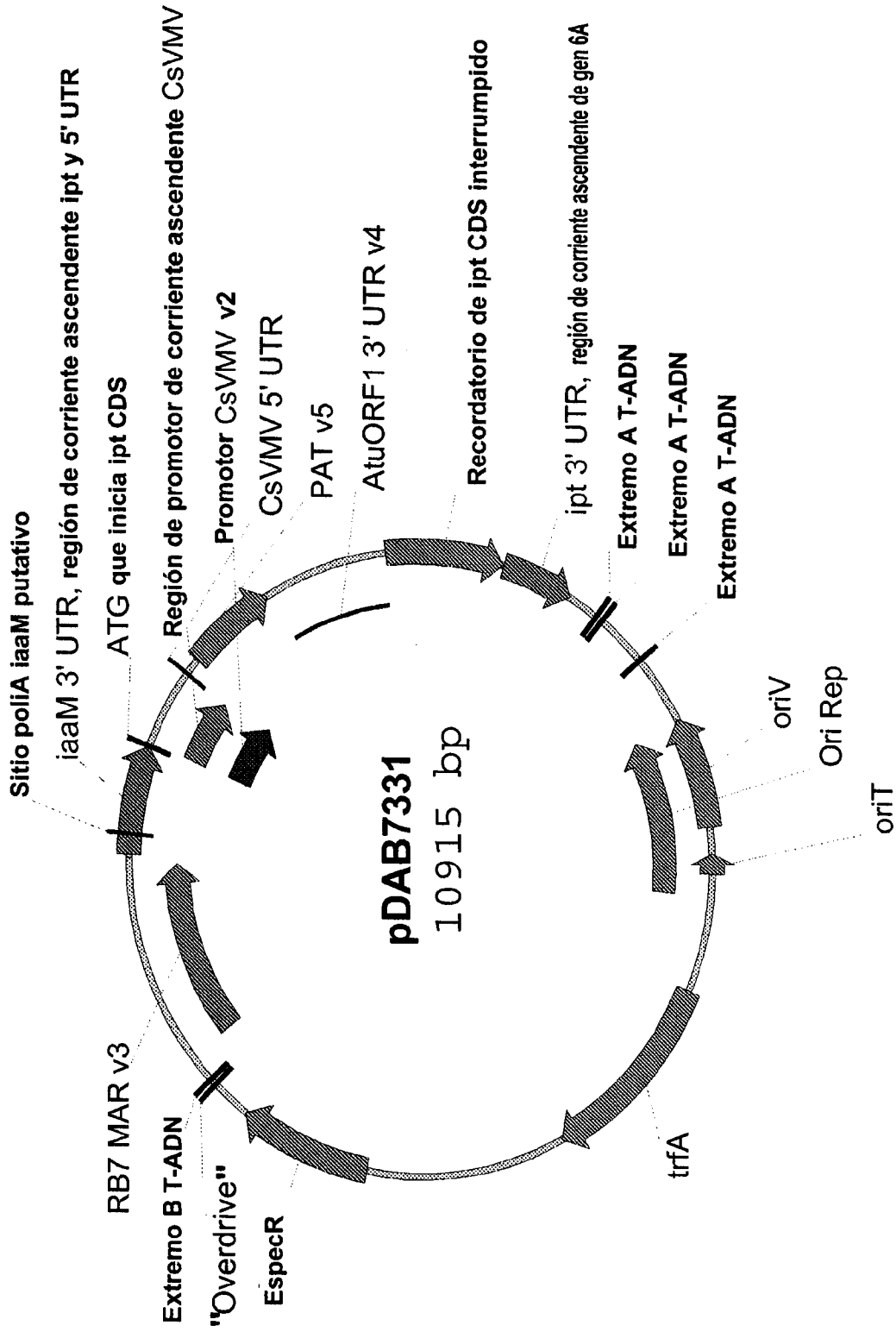
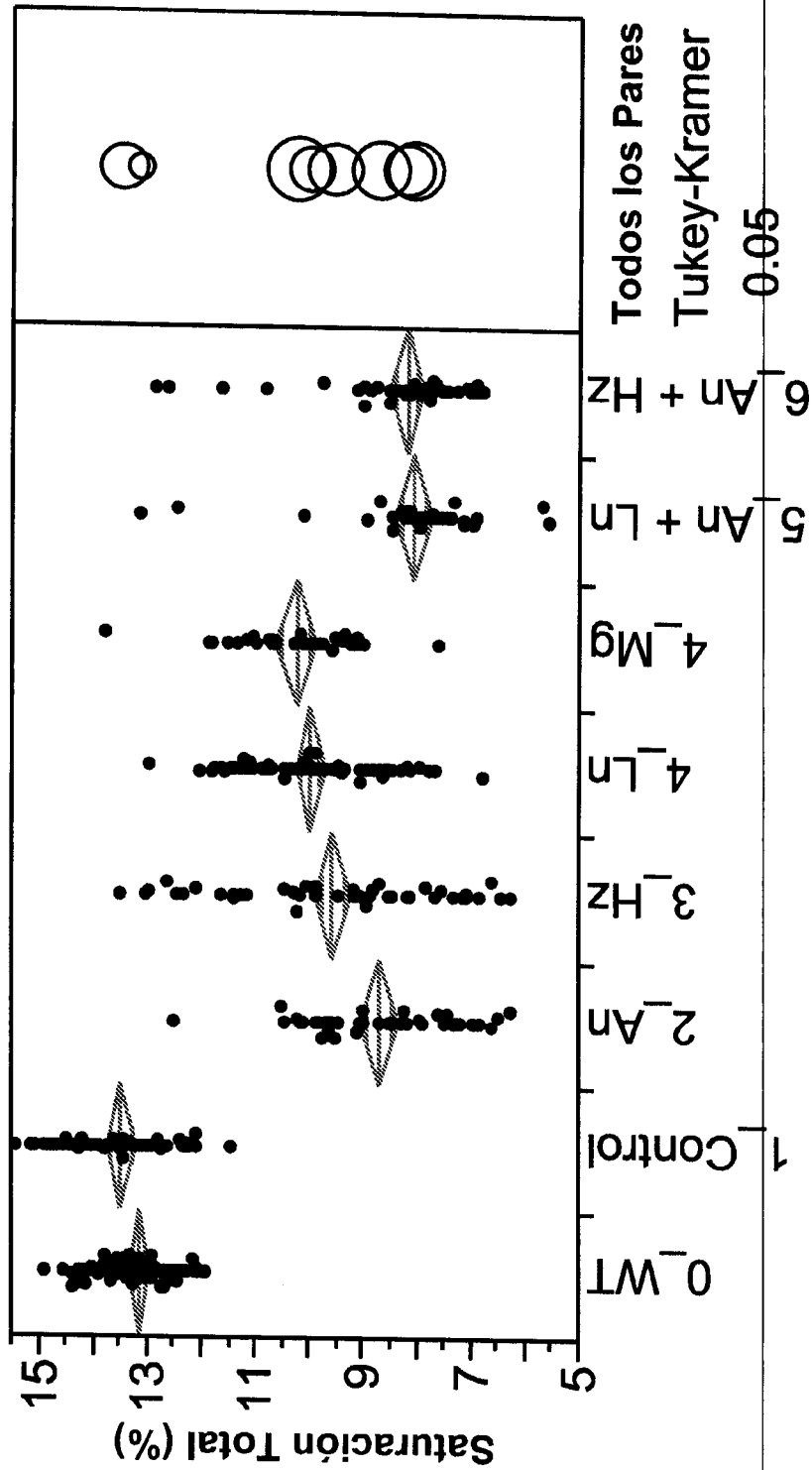
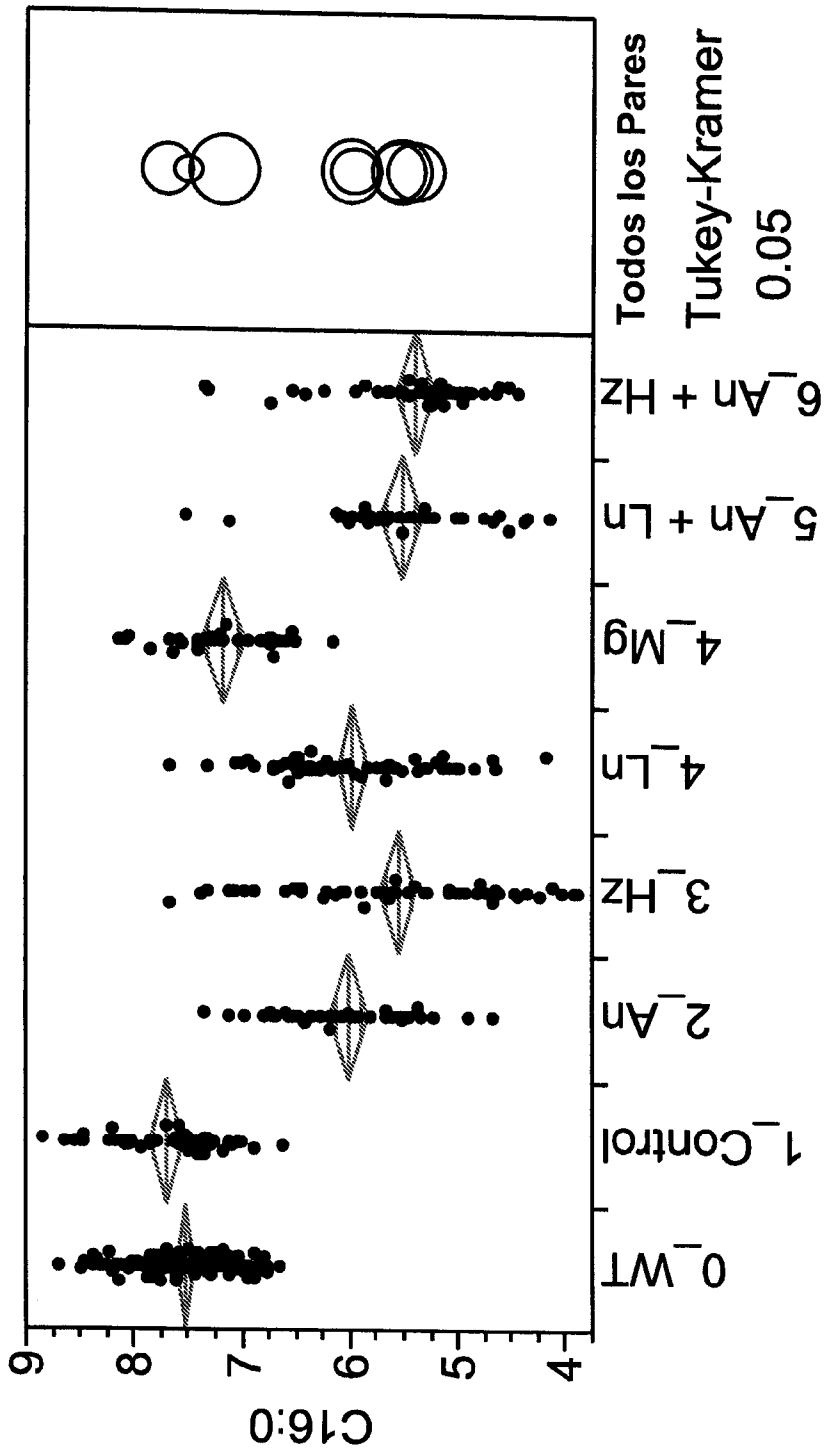


FIG. 18



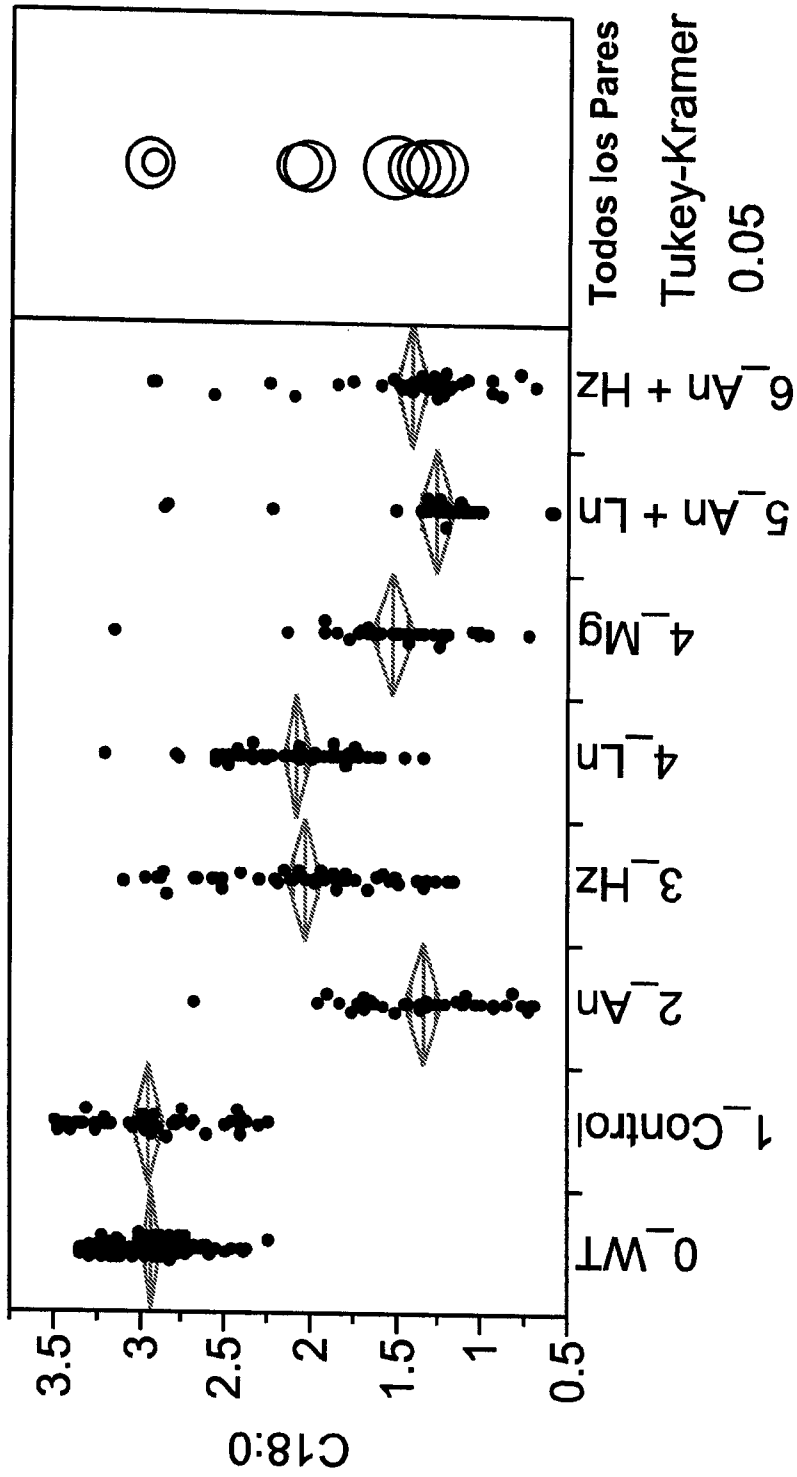
Construcción

FIG. 19



Construcción

FIG. 20



Construcción

FIG. 21

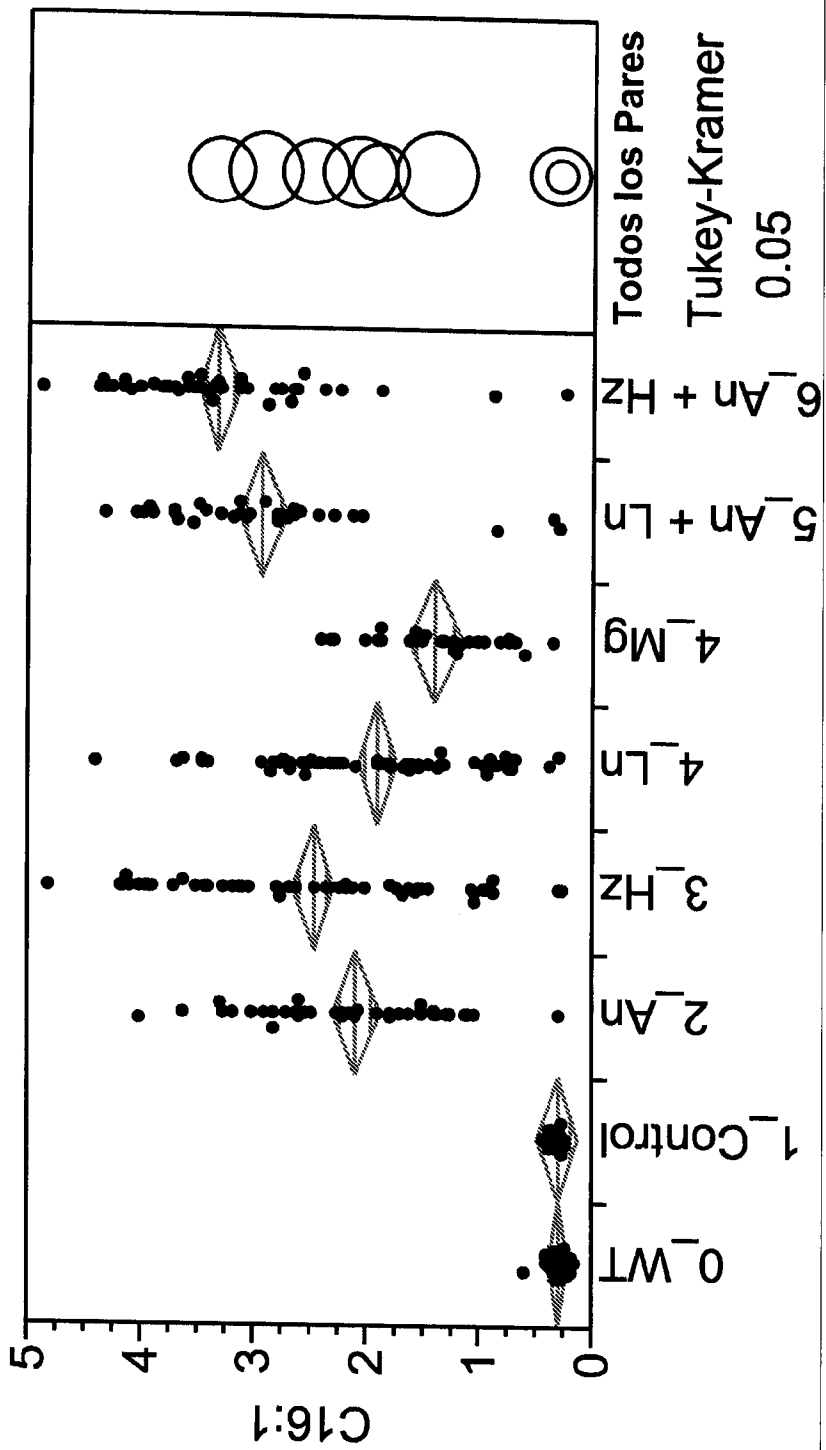


FIG. 22

Construcción

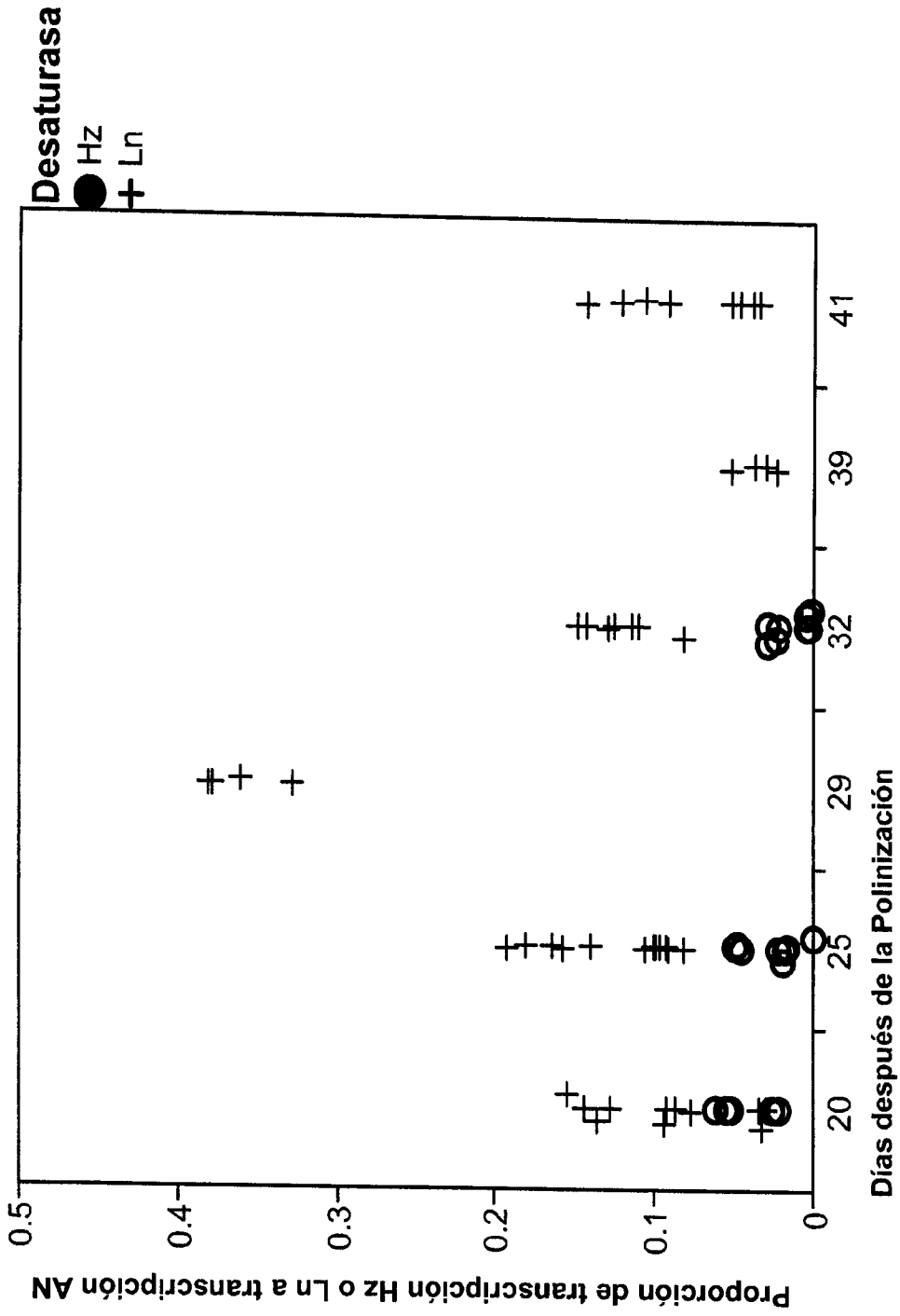


FIG. 23

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Dow Agrosiences LLC
Merlo, Ann O
Gachotte, Daniel J
Thompson, Mark A
Walsh, Terence A
- 5 <120> **Disminución de Contenido de Ácido Graso Saturado de Semillas de Planta**
- <130> 2971-p10092.1US
- <150> US 61/358,314
<151> 2010-06-24
- <160> 78
- <170> PatentIn version 3.4
- 10 <210> 1
<211> 44
<212> **ADN**
<213> Artificial
- <220>
<223> **Cebador Delantero** Mgdelta9F
- <400> 1
gaagaattca tggcttcgtc atcttctccc gtgccggagt tggc 44
- 15 <210> 2
<211> 41
<212> **ADN**
<213> Artificial
- <220>
<223> **Cebador Inverso** Mg9deltaR
- <400> 2
ctcgagctag ttagtcacgc ggcttgagca cccggaacag g 41
- 20 <210> 3
<211> 1523
<212> **ADN**
<213> Artificial
- <220>
<223> **Fragmento de MgD9Ds amplificado mediante PCR**
- <400> 3
gaattcatyg cttcgtcatc ttctccggtg ccggagttgg ctgccgcctt cctgatggc 60
actaccgact tcaagcccat gaggaacacc aagggtacg acgtcagcaa gccgcacatt 120
tccgagacac ctatgacact caagaactgg cataagcacg tcaactggct caacaccacc 180
ttcatcttgt ttgtgccct ggctggtctc atatccactt actgggtccc tctgcagtyg 240
aagacggctg tatgggctgt cgtctactac ttcaacaccg gcttgggaat tactgccggt 300
aagtggctct tgaacaaacg agctaggccg ccgccctgta tccaatcacc tgtatccacc 360
- 25

	cctagatgct aactagaaaa cttgcggggtt accaccgact ttgggctcac agctcgtaca	420
	aggcctcgtc tccgctcaaa atctaccttg ccgccgttgg cgctggtgcc gtcgagggct	480
	ccatcagatg gtggtccaac ggtcaccgcg cacaccaccg atacaccgat accgagaagg	540
	accctactc agtccgcaag ggtctcctgt actcacacat gggatggatg cttctgaagc	600
	agaaccccaa gaagcagggc cgcaccgaca tcaccgacct gaacgaggac cccgttgctg	660
5	tttggcagca ccgcaacttc ctcaagtgtg ttattctcat ggcctcgtc ttccccacac	720
	ttgtggctgg ccttggctgg ggtgactact ggggaggttt catctacgga ggtattctgc	780
	gtgtcttctt cgtccagcag gccaccttct gcgtcaactc gcttcccac tggctcggtg	840
	accagccttt cgacgatcgc aactcgccgc gtgatcacgt catcacagcc ctggtcaccc	900
	ttggagaggg ataccacaac ttccaccacg agttcccttc ggactaccgc aacgctattg	960
	agtggtacca gtatgacccc accaagtggc caatctggat ctggaagcag cttggtcttg	1020
10	cccacaacct gaagcagttc cgccaaaacg agattgagaa gggacgcgtc cagcagctgc	1080
	agaagaagct cgaccagaag cgcgccaagc ttgattgggg tattcccttg gagcagcttc	1140
	ccgttgtag ctgggatgac tttgttgagc agtccaagaa cggaaaggct tggattgcag	1200
	ttgccgggtg catccacgat gttggtgact tcatcaagga ccacctggt ggcagagctc	1260
	tcatcaactc ggccattggc aaggacgcaa ccgcaatctt caacggcggc gtttacaacc	1320
	actccaacgc cgctcacaac ctgctctcga ctatgcgtgt ggggtgtttg cgtggcggct	1380
15	gcgaggttga gatctggaag cgcgccagc cggaaaaca ggacgtctca accgtcgttg	1440
	attcttcggg taaccgcatc gtccgcgcgg gtgggcaagc gaccaaggc gtccagcctg	1500
	ttccgggtgc tcaggccgcg tga	1523
	<210> 4	
	<211> 1428	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Clon sin intrón MgD9Ds	
	<400> 4	
	atggcttcgt catcttcctc cgtgccggag ttggctgccg ccttcctga tggcactacc	60
	gacttcaagc ccatgaggaa caccaagggc tacgacgtca gcaagccgca catttccgag	120
	acacctatga cactcaagaa ctggcataag cacgtcaact ggctcaacac caccttcac	180
	ttgtttgtgc ccttggctgg tctcatatcc acttactggg tccctctgca gtggaagacg	240
	gctgatatgg ctgtcgtcta ctacttcaac accggcctgg gaattactgc cggttaccac	300
25	cgactttggg ctcacagctc gtacaaggcc tcgcttccgc tcaaatcta ccttgcggcc	360

	gttggcgctg gtgccgtcga gggctccatc agatgggtggc ccaacgggtca ccgcgcacac	420
	caccgataca ccgataccga gaaggacccc tactcagtcg gcaaggggtct cctgtactca	480
	caecatgggat ggatgcttct gaagcagaac cccaagaagc agggccgcac cgacatcacc	540
	gacctgaacg aggaccccgt tgtcgtttgg cagcaccgca acttctctca gtgtgttctc	600
5	ttcatggccc tcgtcttccc cacacttggt gctggccttg gctgggggtga ctactgggga	660
	ggtttcatct acggaggtat tctgcgtgct ttcttcgtcc agcaggccac cttctgcgtc	720
	aactcgcttg cccactggct cggtgaccag cctttcgacg atcgcaactc gccgcgtgat	780
	cacgtcatca cagccctggt cacccttgga gagggatacc acaacttcca ccacgagttc	840
	ccttcggact accgcaacgc tattgagtgg taccagtatg accccaccaa gtggtcaatc	900
	tggatctgga agcagcttgg tcttgcccac aacctgaagc agttccgcca aaacgagatt	960
	gagaagggac gcgtccagca gctgcagaag aagctcgacc agaagcgcgc caagcttgat	1020
10	tggggtatct ccttgagca gcttcccgtt gttagctggg atgactttgt tgagcagtc	1080
	aagaacggaa aggcttggat tgcagttgcc ggtgtcatcc acgatgttgg tgacttcatc	1140
	aaggaccacc ctgggtggcag agctctcatc aactcggcca ttggcaagga cgcaaccgca	1200
	atcttcaacg gcggtgttta caaccactcc aacgccgctc acaacctgct ctcgactatg	1260
	cggtggtggg ttttgcgtgg cggctgcgag gttgagatct ggaagcgcgc ccagtcggaa	1320
	aacaaggacg tctcaaccgt cgttgattct tcgggtaacc gcatcgctccg cgcgggtggg	1380
15	caagcgacca aggtcgtcca gcctgttccg ggtgctcagg ccgctgta	1428
	<210> 5	
	<211> 1997	
	<212> ADN	
	<213> Leptosphaeria nodorum	
	<400> 5	
	cccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg gcagtgagcg	60
	caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct	120
20	tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta	180
	tgaccatgat tacgccaagc tcgaaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggagct	240
	ccaccgcggt ggcggccgct ctagaactag tggatcccc gggctgcagg aattcggcac	300
	gagtatgctt tcccaccagg ctggtgctgg catgcaggcc atcgacccc agtttgtcaa	360
	gcagccgtct cctatggcga gcacctcgga gcccaccgc aactccaagt acgatcctaa	420
	gaagccgcac attacagaca tgccatcac gcggtcaaac tggtagcagc atgtcaactg	480
	gctcaacgct atcttcatca tcggcgtgcc tctcgttggc tgcgtcggc ccttctggac	540
25	ccctctgcag tggaaagacc ctgcgtgggc tgcatctac tatttctgga ctggcctcgg	600

	tatcaccgcc ggataccatc gtctctgggc acacaagtca tacaacgccc gtcttctct 660	
	gaggatctgg ctcgccgccc tggcgctgg tgctgtgag ggttccatcc gctgggtggag 720	
	ccgtgaccac cgcgcccacc accgctacac cgacaccaac aaggaccctt acagtgtccg 780	
	caagggcctt ctctacagcc atctcggatg gatgggtcatg aagcagaacc ccaagcgtat 840	
5	cggccgcacc gacatcaccg acttgaacga ggaccccggt gtcgtctggc agcacaagaa 900	
	ctacatcaag gccgtcgtca ccatgggctt gatctttccc tctgccgtcg ccggtctcat 960	
	gtggggcgat tggatgggtg gcttcatcta cgctggatc ctccgtatct tcttcgtcca 1020	
	gcaggccacc ttctcgtca actcgttgc tactggctc ggtgaccagc ccttcgacga 1080	
	ccgcaactct cctcgtgacc acgtcattac cgctcttgc actctcggag agggctacca 1140	
	caacttccac cacgagttcc cctccgacta ccgcaacgcc atcgagtggc accagtacga 1200	
	ccctaccaag tgggtccatct ggctgtggag caagctcggc ctcgcctcca acctcaagca 1260	
10	gttccgctcc aacgaaatcg agaagggtcg tgtccagcag ctccagaaga agattgacca 1320	
	gaagcgcgcc aagctcgact ggggtgtccc tctcgaccag ctgcctgtca tagaatggga 1380	
	cgactatgtc gagcaggcca agaacggccg tgggtctatc gctgtcgtg gtgtcgttca 1440	
	tgacgttacc gacttcatca acgagcacc cggtggcaag acgcttatca agagcggcgt 1500	
	tggcaaggat gccaccgcca tgttcaacgg cggtgtctac ttccactcca acggagccca 1560	
	caacctcctt tctaccatga gggttggtg catccgcggt ggctgtgaag ttgagatctg 1620	
	gaagcgcgct cagcgtgaga acaaggatgt cggctctggc ctggacgacg caggcaacct 1680	
15	aatcatcagg gctggtaacc agattaccaa ggttgcgcaa cccattcaga gtgctagtgc 1740	
	agcatagatt ggatcttcat cttcacgagc gatgtatggc gtttggttgt ctctcttct 1800	
	tggcggacag agtaatattc aatttcttag cgatcgttag aaagcatcat ggttacgatg 1860	
	ctcagtcatg ttagatggcg tatgtttgta gccttctcgc agtgattggs tatgaaaagt 1920	
	agcctcacgg cctagaccaa gaatgaaaac attcacgatt tcagaaaaaa aaaaaaaaaa 1980	
	aaactcgagg gggggcc 1997	
20	<210> 6	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Delantero Lnd9FAD2F	
	<400> 6	
	ggatccatgg cggccttggc cagcattcca gaggataag 39	
25	<210> 7	
	<211> 38	

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador Inverso Lnd9FAD2R

<400> 7
ccatggtcag ttagctacgc agccacagcc ccctcaac 38

5 <210> 8
<211> 1370
<212> ADN
<213> Leptosphaeria nodorum

<400> 8
ggatccatgg cggccttgga cagcattcca gaggataagg ctacctcgtc gaaatcgact 60
catattcaat atcaagaagt aacttttcgg aactggtata agaagataaa ttggctcaac 120
acgacgctgg tggtgctcat acccgctctt ggactctacc taacacgcac cacgccactt 180
10 acacgaccta cgctcatctg gtccgctctg tactacttct gcacagcttt cggcatcaca 240
ggcggatatt atcgactatg gagtcatcgc agctactccg ctcgcttacc gctacgctta 300
ttcctagcct tcacagggcg cggagccatc caaggtagtg ctcgatggtg gagcgcaaat 360
caccgcgccc accaccgatg gaccgacaca atgaaggacc cctactccgt tatgcgcggc 420
ctattattct cgcacatcgg atggatggta ttgaacagcg accccaaaagt caaaggccga 480
acagacgtca gtgatctcga cagcgacccc gtcgtagtct ggagcacaac gactacggc 540
aagtgcctgc tgttcgcccgc gtggatattc cccatgatcg tagccggcct cggatgggga 600
15 gattggtggg gaggccttgt ctacgcccgc atcattcgag cgtgtttcgt ccagcagggc 660
acattttgcg tgaactctct cgcgcattgg atcggcgagc agccgttcga cgacagacgc 720
acycctcgag accacgtttt gacagcgttg gtaacgatgg gagaaggata tcataacttc 780
caccacgaat tcccaagcga ttatcgcaac gcgatcatct ggtaccaata cgaccctacc 840
aaatggctca tttacctctt ctccctcggc cccttcccc tcgcatactc gctcaaaacc 900
ttccggtcca atgagattga aaaagggcgg ttgcaacaac aacaaaaagc cctggacaag 960
20 aagcgcctcag gacttgattg gggcctaccc ctcttccaac tccctgtcat atcgtgggac 1020
gacttccaag cgcgttgcaa agagtccggc gagatgctgg ttgctgtcgc aggtgtgatt 1080
cacgacgtca gccagtttat tgaagatcac cctggaggca ggagtttgat tcggagtgcg 1140
gtgggcaaaag atgggacagg gatgtttaat ggaggcgtat atgagcacag taatgcggcg 1200
cataatctgt tgtcgacaat gagggtgagg gtgcttagag gtgggcagga ggtggaggtg 1260
tggaagaagc agagagtgga tgttttaggg aagagcgaca ttttgagaca ggttacgcgg 1320
25 gtggagaggt tggttgaggg ggctgtggct gcgtagctaa ctgaccatgg 1370

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

<400> 9
atggcttcgt catcttcctc cgtgccggag ttggctgccg ccttcctga tggcactacc 60
5 gacttcaagc ccatgaggaa caccaagggc tacgacgtca gcaagccgca catttccgag 120
acacctatga cactcaagaa ctggcataag cacgtcaact ggctcaacac caccttcac 180
ttgtttgtgc ccttggtgg tctcatatcc acttactggg tcctctgca gtggaagacg 240
gctgtatggg ctgtcgtcta ctactcaac accggcctgg gaattactgc cggttaccac 300
cgactttggg ctcacagctc gtacaaggcc tcgcttccgc tcaaaatcta ccttgccgcc 360
gttgccgctg gtgccgtcga gggctccatc agatggtggt ccaacggcga ccgcccacac 420
caccgataca ccgataccga gaaggacccc tactcagtcc gcaaggtct cctgtactca 480
10 cacatgggat ggatgcttct gaagcagaac cccaagaagc agggccgac cgacatcacc 540
gacctgaacg aggaccccgt tgtcgtttgg cagcaccgca acttctcaa gtgtgttacc 600
ttcatggccc tcgtcttccc cacacttgtg gctggccttg gctgggggta ctactgggga 660
ggtttcatct acggaggtat tctgcgtgtc ttcttcgtcc agcaggccac cttctgcgtc 720
aactcgcttg cccactggct cggtgaccag cttttcgacg atcgcaactc gccgcgtgat 780
cacgtcatca cagccctggt cacccttggga gagggatacc acaacttcca ccacgagttc 840
15 ccttcggact accgcaacgc tattgagtgg taccagtatg accccacca gtggtcaatc 900
tggatctgga agcagcttgg tcttgcccac aacctgaagc agttccgcca aaacgagatt 960
gagaagggac gcgtccagca gctgcagaag aagctcgacc agaagcgcgc caagcttgat 1020
tggggatttc ccttgagca gcttcccgtt gttagctggg atgactttgt tgagcagttc 1080
aagaacggaa aggcttggat tgcagttgcc ggtgtcatcc acgatgttgg tgacttcac 1140
aaggaccacc ctggtggcag agctctcatc aactcggcca ttggcaagga cgcaaccgca 1200
atcttcaacg gcggtgttta caaccactcc aacgccgctc acaacctgct ctgactatg 1260
20 cgtgtgggtg ttttgcgtgg cggtgcgag gttgagatct ggaagcgcgc ccagtccgaa 1320
aacaaggacg tctcaaccgt cgttgattct tcgggtaacc gcatcgtccg cgcggtggg 1380
caagcgacca aggtcgtcca gcctgttccg ggtgctcagg ccgctgta 1428

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

<400> 10
25 atggctccaa atatatcgga ggatgtgaac ggggtgctct tcgagagtga tgcagcgacg 60

	ccggacctgg cgctgtccac gccgcctgtg cagaaggctg acaacaggcc caagcaactg	120
	gtgtggagga acatactact gttcgcgtat cttcacttag cggctctt ta eggaggttat	180
	ctgttcctct tctcagctaa atggcagaca gacatatttg cctacatcct gtatgtgatc	240
	tccgggcttg gtatcacggc tggagcacat cgcctgtggg cccacaagtc ctacaaagct	300
5	aatggcctc tccgagttat cctggtcatc tttaacacag tggcattcca ggatgccgct	360
	atggactggg cgcgcgacca ccgcatgcat cacaagtact cggaaaccga tgctgatcct	420
	cataatgcga cccgaggatt cttcttctct cacattggct ggctgcttgt caggaaacat	480
	cccgacctta aggagaaggg caagggactc gacatgagcg acttacttgc tgacccatt	540
	ctcaggttcc agaaaaata ctacctgatc ctgatgccct tggcttgctt cgtgatgcct	600
	accgtgattc ctgtgtactt ctggggtgaa acctggacca acgcattctt tgtggcggcc	660
	atgttccgct acgcgttcat cctaaatgtg acgtggctcg tcaactctgc cgctcacaaag	720
10	tggggagaca agccctacga caaaagcatt aagccttccg aaaacttgtc ggtcgccatg	780
	ttcgtctcgc gagaaggatt ccacaactac caccacactt tcccttggga ctacaaaact	840
	gctgagctgg gcaacaacaa actcaacttc actaccact ttattaactt cttcgtataa	900
	attggctggg cttacgacct gaagacagtg tctgatgata tcgtcaagaa cagggtgaag	960
	cgcactgggtg acggtccca ccacctgtgg ggctggggag acgaaaatca atccaaagaa	1020
	gaaattgatg ccgctatcag aatcaatcct aaggacgatt aa	1062
15	<210> 11 <211> 1350 <212> ADN <213> Leptosphaeria nodorum	
	<400> 11	
	atggcggcct tggacagcat tccagaggat aaggctacct cgtcgaatc gactcatatt	60
	caatatcaag aagtaacttt tcggaactgg tataagaaga taaattggct caacacgacg	120
	ctgggtggtgc tcataccgc tcttggactc tacctaacac gcaccacgcc acttacacga	180
20	cctacgctca tctgggccgt cctgtactac ttctgcacag ctttcggcat cacaggcgga	240
	tatcatcgac tatggagtca tcgcagctac tccgctcgtc taccgctacg cttattccta	300
	gccttcacag gcgccggagc catccaaggt agtgctcgat ggtggagcgc aaatcaccgc	360
	gccaccacc gatggaccga cacaatgaag gaccctact ccgttatgcg cggcctatta	420
	ttctcgaca tcggatggat ggtattgaac agcgaccca aagtcaaagg ccgaacagac	480
	gtcagtgatc tcgacagcga ccccgctcgt gtctggcagc acaagcacta cggcaagtgc	540
	ctgctgttcg ccgctggat attccccatg atcgtagccg gcctcggatg gggagattgg	600
25	tggggaggcc ttgtctacgc cggcatcatt cgagcgtggt tcgtccagca ggcgacattt	660

tgcgtgaact ctctcgcgca ttggatcggc gagcagccgt tgcacgacag acgcacgcct 720
 cgagaccacg ttttgacagc gttggaacg atgggagaag gatatacataa ctccaccac 780
 gaattcccaa gcgattatcg caacgcgatc atctgtacc aatacgacce taccaaatgg 840
 ctcatctacc tcttctccct cggccccctc cccctcgcac actcgcctcaa aacctcccg 900
 tccaatgaga ttgaaaaagg gcggttgcaa caacaacaaa aagccctgga caagaagcgc 960
 5 tcaggacttg attggggcct acccctctc caactccctg tcatatcgtg ggacgacttc 1020
 caagcgcggt gcaaagagtc cggcgagatg ctggttgctg tcgcaggtgt gattcacgac 1080
 gtcagccagt ttattgaaga tcaccctgga ggcaggagtt tgattcggag tgcggtgggc 1140
 aaagatggga cagggatggt taatggaggc gtatatgagc acagtaatgc ggcgcataat 1200
 ctgttgctga caatgagggt gggagtgcct agaggtgggc aggaggtgga ggtgtggaag 1260
 aagcagagag tggatgtttt agggaagagc gacattttga gacaggttac gcgggtggag 1320
 10 aggttggttg agggggctgt ggctgcgtag 1350

<210> 12
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Magnaporthe grisea

<400> 12

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

Ser Ile Arg Trp Trp Ser Asn Gly His Arg Ala His His Arg Tyr Thr
 130 135 140

Asp Thr Glu Lys Asp Pro Tyr Ser Val Arg Lys Gly Leu Leu Tyr Ser
 145 150 155 160

5 His Met Gly Trp Met Leu Leu Lys Gln Asn Pro Lys Lys Gln Gly Arg
 165 170 175

Thr Asp Ile Thr Asp Leu Asn Glu Asp Pro Val Val Val Trp Gln His
 180 185 190

Arg Asn Phe Leu Lys Cys Val Ile Phe Met Ala Leu Val Phe Pro Thr
 195 200 205

10 Leu Val Ala Gly Leu Gly Trp Gly Asp Tyr Trp Gly Gly Phe Ile Tyr
 210 215 220

Gly Gly Ile Leu Arg Val Phe Phe Val Gln Gln Ala Thr Phe Cys Val
 225 230 240

Asn Ser Leu Ala His Trp Leu Gly Asp Gln Pro Phe Asp Asp Arg Asn
 245 250 255

Ser Pro Arg Asp His Val Ile Thr Ala Leu Val Thr Leu Gly Glu Gly
 260 265 270

15 Tyr His Asn Phe His His Glu Phe Pro Ser Asp Tyr Arg Asn Ala Ile
 275 280 285

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

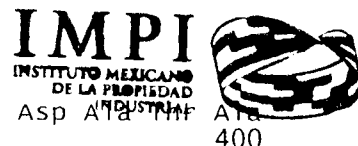
Gln Leu Gly Leu Ala His Asn Leu Lys Gln Phe Arg Gln Asn Glu Ile
 305 310 315 320

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

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

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

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



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

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

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

5

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

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

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

10

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

<400> 13

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

15

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

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

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

20

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

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

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

25

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

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

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

5

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

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

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

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

10

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

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

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

15

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

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

Tyr Asp Leu Lys Thr Val Ser Asp Asp Ile Val Lys Asn Arg Val Lys
305 310 315 320

20

Arg Thr Gly Asp Gly Ser His His Leu Trp Gly Trp Gly Asp Glu Asn
325 330 335

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

Asp

<210> 14

25

<211> 449
<212> PRT
<213> Leptosphaeria nodorum

<400> 14

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

5 Ser Thr His Ile Gln Tyr Gln Glu Val Thr Phe Arg Asn Trp Tyr Lys
20 25 30

Lys Ile Asn Trp Leu Asn Thr Thr Leu Val Val Leu Ile Pro Ala Leu
35 40 45

Gly Leu Tyr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Leu Thr Arg Pro Thr Leu Ile
50 55 60

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

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

Arg Leu Phe Leu Ala Phe Thr Gly Ala Gly Ala Ile Gln Gly Ser Ala
100 105 110

15 Arg Trp Trp Ser Ala Asn His Arg Ala His His Arg Trp Thr Asp Thr
115 120 125

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

Gly Trp Met Val Leu Asn Ser Asp Pro Lys Val Lys Gly Arg Thr Asp
145 150 155 160

Val Ser Asp Leu Asp Ser Asp Pro Val Val Val Trp Gln His Lys His
165 170 175

20 Tyr Gly Lys Cys Leu Leu Phe Ala Ala Trp Ile Phe Pro Met Ile Val
180 185 190

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

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

25 Leu Ala His Trp Ile Gly Glu Gln Pro Phe Asp Asp Arg Arg Thr Pro

<220>
<223> **secuencia de desaturasa optimizada por canula**

<400> 15
atggccagca gttcttcaag tgtgccagaa cttgccgcag ctttccctga tgggacaacg 60
gacttcaaac ccatgaggaa caccaaaggc tatgatgtct ccaaacctca catctctgaa 120
acaccgatga ctttgaagaa ctggcacaaa catgtgaact ggctcaacac cacattcatt 180
5 ctctttgttc cactggctgg gttgatctca acctattggg ttctctttca atggaaaact 240
gcagtgtggg cagttgtgta ctacttcaac actggacttg ggatcactgc tggctacat 300
agattgtggg cacattcctc ttacaaggcc agcttgccct tcaaaatcta ccttgccgca 360
gttggtgctg gagccgttga aggttccata agatggtgga gcaacggaca cagagcacat 420
cacagataca cagacacaga gaaagatcct tactcagtga ggaagggatt gctctacagc 480
cacatgggtt ggatgctctt gaagcagaat ccaaagaagc aagggaggac ggacattact 540
10 gatctgaatg aggaccagt tgtggtctgg caacatagga actttctcaa gtgtgtgatc 600
ttcatggctt tggcttttcc cacccttgtt gctggcctgg gatggggaga ctactgggga 660
ggtttcatct atggagggat cttgagagtg ttctttgttc agcaagccac cttctgtgtc 720
aactcacttg cacattggct tggatgataa ccgtttgatg acagaaactc tccacgtgac 780
catgtcataa ctgctcttgt cacgctgggt gaaggctatc acaactttca ccatgagttt 840
ccgtcagact atagaaatgc gattgagtgg tatcagtatg accccacgaa gtggagcatt 900
tggatttggga agcaacttgg acttgctcac aatctcaagc agttcagaca gaatgagata 960
15 gagaagggaa gggttcaaca gttgcagaag aaactggatc agaagagagc gaaacttgat 1020
tggggaatac cgttgaaca actccctgtt gtgtcttggg atgactttgt tgaacagtca 1080
aagaatggca agcatggat tgctgttctt ggtgtcattc acgatgttg tgacttcac 1140
aaggatcatc ctggtgagc tgctctcacc aactctgcga ttggcaaaga tgccacagcg 1200
atcttcaatg gaggtgtcta caatcattca aatgccgcac acaaccttct ctccaccatg 1260
agggttggtg tcctccgtgg aggggtgcga gtggagatat ggaaacgtgc tcaaagtgag 1320
20 aacaagatg tctctactgt gttgatagt tctggcaacc gtattgtgag agctggtgga 1380
caagctacca aagtgttca gccagtcctt ggtgctcaag cagcttga 1428

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

<220>
<223> **secuencia de desaturasa optimizada por canula**

25 <400> 16

	atggctccca acatttctga ggatgtcaat ggtgttcttt ttgagtcaga tucggcaacc	60
	cctgatttgg ctctttccac accacctgtg caaaaagctg acaacagacc caagcaactt	120
	gtgtggagga acattttgct tttegcctac ttgcacctg cagctctcta cggaggctat	180
	ttgtttctct tcagtgcaaa atggcagacc gacattttcg cttacattct ttatgtcatc	240
	tctggactgg ggataactgc tggggcacat agactctggg ctcaaaagtc atacaaagcc	300
5	aagtggccac tcagagttat actggtcatc ttcaacacgg ttgcctttca agacgctgct	360
	atggatttgg ctcgtgacca tagaatgcat cacaagtaca gcgagaccga cgcggaccga	420
	cacaatgcaa cgagaggttt cttcttctct cacattggct ggcttcttgt taggaaacat	480
	cctgatctga aagaaaaagg gaagggactc gacatgagtg atctccttgc tgatccaata	540
	ctccgttttc agaagaagta ctatctgac ctcatgcctc tggcctgttt tgtgatgcca	600
	accgttatcc cggtttactt ttggggagaa acttgagcaa atgctttctt cgtggcagcc	660
10	atgttccggt atgctttcat cctgaatgtt acctgggttg tgaactctgc cgcacacaag	720
	tggggagaca aaccctatga caagtcctc aagccttccg aaaacctttc agttgcatg	780
	tttgctttgg gagaaggatt tcacaattac catcacactt ttccgtggga ctacaagaca	840
	gcagagcttg gaaacaacaa gttgaactc acaacaacgt tcatcaattt ctttgcaaaa	900
	atcggttggg cctatgattt gaagactgtg agtgatgaca ttgtcaagaa cagggctcaag	960
	agaactggcg atggaagcca tcatctctgg ggctgggggtg atgagaatca gagcaaagaa	1020
	gagatagatg cagccattag gatcaacctt aaagacgatt ga	1062
15	<210> 17	
	<211> 1350	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de desaturasa optimizada por canula	
	<400> 17	
	atggctgcac ttgatagcat cctgaggac aaagcaacta gctccaagtc aaccacata	60
	cagtaccaag aggtcacggt taggaactgg tacaagaaaa tcaactggct caacacgacc	120
20	cttgtgtgcc tcattcctgc tcttgggttg tacttgacga gaaccacacc tctcaccaga	180
	cctaccctca tttggtctgt tctctactat ttctgtacag cgtttggcat cactggtggc	240
	taccacagac tttggtccca taggtcttac agtgcgaggt tgccattgag actcttctctg	300
	gctttcactg gagctggtgc gatccaaggt tctgcaagat ggtggtcagc caatcatagg	360
	gcacatcacc gttggacgga caccatgaag gaccctact ctgtgatgag aggactgctg	420
	ttctcccaca taggttggat ggttctcaac tctgatccaa aggtcaaagg cagaacagat	480
25	gtttctgatc ttgactctga tcccgtcgtt gtgtggcaac acaaacta tggaagtgt	540

	ttgctctttg ccgcttggat ctttccgatg atagtggctg ggctgggttg gggagattgg	600
	tggggtgagc ttgtctatgc tggcatcata cgtgcctgct ttgttcagca agccactttc	660
	tgtgtcaact cattggcaca ttggataggt gaacaaccgt ttgatgacag acgtactcca	720
	agggatcatg tctgactgc gttggtcaca atgggagaag gataccaca cttccacat	780
	gagtttccga gtgactacag aaatgccatc atttggatc agtatgacc tacaagtgg	840
5	ctcatctatc tcttcagctt gggctccttc ccattggcct actctctcaa gaccttccgt	900
	tccaatgaga ttgagaaagg aaggcttcag caacagcaaa aggctcttga caagaaaaga	960
	agtggctttg attggggact tcctctcttc cagcttccag tgatctcatg ggatgacttt	1020
	caagctcgtt gcaaagaaag tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt gatccatgat	1080
	gtctcccagt tcattgaaga tcctcctggt gggaggagcc tcattagaag tgctgttggg	1140
	aaagatggga ctggcatggt caatggtgga gtgtatgaac attcaaacgc cgcacacaac	1200
10	ttgctgagca caatgagagt tggagtcttg agaggtggac aagaagtgga ggtttggag	1260
	aaacagaggg tggatgttct tgggaagtca gacattcttc gtcaagtgac aagggtggag	1320
	cgtctggtgg aaggagctgt tgcagcgtga	1350
	<210> 18	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador MAS414	
	<400> 18	
	tgaagcattc cataagccgt cacg	24
	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador MAS415	
	<400> 19	
	gaaattatca cgcttccgca cacg	24
	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador MAS413	
	<400> 20	

	tgggctgaat tgaagacatg ctcc	
	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador arw008	
	<400> 21	
	acacctctca ccagacctac cctca	25
	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador arw009	
10	<400> 22	
	cacacaacga cgggatcaga gt	22
	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador arw010	
15	<400> 23	
	caagtcatac aaagccaagt ggcc	24
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador arw011	
20	<400> 24	
	taacggaaca tggctgccac ga	22
	<210> 25	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador AntiLnD9DS2F	
25	<400> 25	
	catatgttcg acgacagacg cagcctcga gac	33

	<210> 26	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador AntiLnD9DS2Rh	
	<400> 26	
5	ggatccgcag ccacagcccc ctcaaccaac ctctc	35
	<210> 27	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador AntiMgD9DSF	
	<400> 27	
10	catatgttcg acgatcgcaa ctgcccggt gatcac	36
	<210> 28	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador AntiMgD9DSRh	
	<400> 28	
	ggatccgcgg cctgagcacc cggaacaggc tg	32
15	<210> 29	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador AntiHzD9DSF	
	<400> 29	
	catatgtatg acaagtccat caagccttcc	30
20	<210> 30	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador AntiHzD9DSRh	
	<400> 30	
	ggatcctcgt ctttagggt gatcctaag gctgc	35
25	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador delantero para AnD9Ds objetivo	
	<400> 31	
	ggactttctct actctcacct tgga	24
5	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso para AnD9Ds objetivo	
	<400> 32	
	tccgatcctc tttgggttct	20
10	<210> 33	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador delantero para HZD9Ds objetivo	
	<400> 33	
	gaccacaca atgcaacg	18
15	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso para HZD9Ds objetivo	
	<400> 34	
	cctaacaaga agccagccaa t	21
20	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador delantero para LnD9Ds objetivo	
	<400> 35	
	gttctgactg cgttggtcac	20
25	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

	<223> Cebador inverso para Lnd9Ds objetivo	
	<400> 36 cggaaactca tgggtggaagt	20
5	<210> 37 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador delantero para actina objetivo	
	<400> 37 ctactggtat tgtgctcgac t	21
	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador inverso para actina objetivo	
	<400> 38 ctctctcggt gagaatcttc at	22
	<210> 39 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Sonda de actina	
	<400> 39 cacgctatcc tccgtctcga tc	22
	<210> 40 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia Kozak	
	<400> 40 ggatccaaca atg	13
	<210> 41 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia Kozak	
	<400> 41	

acaaccaaaa atg

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

5

<220>
 <223> **Secuencia Kosak**
 <400> 42
 acaaccaacc taccatgg

18

<210> 43
 <211> 14
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> **Secuencia Kosak**
 <400> 43
 acaaccaaaa aatg

14

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

<220>
 <223> **Desaturasa optimizada por canola**

15

<400> 44
 atggctgctc ttgattctat cccagaggat aaggctacct cttctaagtc taccacatc 60
 caataccaag aagttacctt caggaactgg tacaagaaga tcaactggct taaccacc 120
 cttgttggtc ttatcccagc tcttgactt taccttacca ggaccacccc acttaccagg 180
 ccaaccctta tctggctctgt tctttactac ttctgcaccg ctttcggaat aaccggagga 240
 taccacaggc tttggctca caggtcttac tctgctaggc ttccacttag gcttttcctt 300
 gctttcaccg gagctggagc tatccaagga tctgctagat ggtggtctgc taaccacagg 360
 gctcaccaca ggtggaccga taccatgaag gaccatact ctgttatgag gggacttctt 420
 20 tctctcaca tggatggat ggttctaac tctgatccaa aggttaaggg aaggaccgat 480
 gtttctgatc ttgattctga tccagttgtt gtttggaac acaagcacta cggaaagtgc 540
 cttcttttcg ctgcttgat cttcccaatg atcgttgctg gacttgatg gggagattgg 600
 tggggaggac ttgtttacgc tggaatcatc agggcttgct tcyttcaaca agctaccttc 660
 tgcgtaact ctcttgctca ctggatcgga gagcaaccat tcyacgatag gaggacccca 720
 agggatcacg ttcttaccgc tcttggtacc atgggagagg gataccacaa cttccaccac 780
 25 gagttcccat ctgattacag gaacgctatc atctggtacc aatagatcc aaccaagtgg 840

	cttatctacc ttttctctct tggaccattc ccacttgctt actctcttaa gaccttcagg	900
	tctaacgaga tcgagaaggg aaggcttcaa caacaacaaa aggctcttga taagaagagg	960
	tctggacttg attggggact tccacttttc caacttcag ttatctcttg ggatgatttc	1020
	caagctaggt gcaaggagtc tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt tatccacgat	1080
	gtttctcaat tcatcgagga tcaccagga ggaaggctc ttatcaggtc tgctgttgga	1140
5	aaggatgaa ccggaatgtt caacggagga gtttacgagc actctaacgc tgctcacaac	1200
	cttctttcta ccatgagggt tggagttctt aggggaggac aagaggttga ggtttggaag	1260
	aagcaaaggg ttgatgttct tggaaagtca gatatcctta ggcaagttac cagggttgag	1320
	aggcttggtg agggagctgt tgctgcttga	1350
	<210> 45	
	<211> 1062	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Desaturasa optimizada por canola	
	<400> 45	
	atggctcaa acatctctga ggatgttaac ggagttcttt tcgagtctga tgctgctacc	60
	ccagatcttg ctctttctac cccaccagtt caaaaggctg ataacaggcc aaagcaactt	120
	gtttgaggga acatccttct tttcgcttac cttcaccttg ctgctcttta cggaggatac	180
15	cttttccttt tctctgctaa gtggcaaacc gatatcttcg cttacatcct ttacgttatc	240
	tctggacttg gaataaccgc tggagcacac aggccttggg ctcaacagtc ttacaaggct	300
	aagtggccac ttagggttat ccttgttatc ttcaacaccg ttgctttcca agacgctgct	360
	atggattggg ctagggatca caggatgcac cacaagtact ctgagaccga cgctgatcca	420
	cacaacgcta ccaggggatt cttcttctct cacatcggat ggcttcttgt taggaagcac	480
	ccagatctta aggagaaggg aaagggactt gatatgtctg atcttcttgc tgatccaatc	540
	cttaggttcc aaaagaagta ctaccttatc cttatgccac ttgcttgctt cgttatgcca	600
20	accgttatcc cagtttactt ctggggagag acctggacca acgctttctt cgttgctgct	660
	atggtcaggt acgctttcat ccttaacggt acctggcttg ttaactctgc tgctcacaag	720
	tggggagata agccatacga taagtctatc aagccatctg agaacctttc tgttgctatg	780
	ttcgctcttg gagagggatt ccacaactac caccacacct tcccatggga ttacaagacc	840
	gctgagcttg gaaacaacaa gcttaacttc accaccacct tcatcaactt cttcgctaag	900
	atcggatggg cttacgatct taagaccggt tctgatgata tcgtaagaa cagggttaag	960
25	aggaccggag atggatcaca ccacctttgy ggatggggag atgagaacca atctaaggag	1020

gagatc gatg ctgctatc gatcaacca aaggatgatt ga

- <210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> **Etiqueta Myc**
- <400> 46
- Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10
- <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> **Etiqueta de hemaglutina**
- <400> 47
- Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5
- <210> 48
<211> 1368
<212> ADN
<213> Aspergillus nidulans
- 15 <400> 48
- atgtctgctc caaccgctga catcagggct agggctccag aggctaagaa ggttcacatc 60
gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc 120
ctcatcatcg gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc 180
aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaat caccgctgga 240
taccacaggc tttgggctca ctgctcttac tctgctactc ttccacttag gatctggett 300
gctgctggtg gaggaggagc tgttgagggg tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg 360
- 20 gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctgttaggaa gggacttctc 420
tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaaccaa agaggatcgg aaggaccgac 480
atctctgatc tcaacgagga cccagttggt gtttggaac acaggaacta cctcaagggt 540
gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttggatg gggagattgg 600
cttggaggat tcgtgtacgc tggaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctaccttc 660
tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttggg gatcaacat tcgatgatag gaactctctc 720
- 25 agggatcacg tgatcaccgc tcttgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac 780

	gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg	840
	tctatctggg cttggaagca acttggattg gcttacgatc tcaagaagtt cagggctaac	900
	gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact	960
	cttgattggg gaacccact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag	1020
	caagctaaga acggaagggg acttgttgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac	1080
5	ttcatcaagg atcaccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct	1140
	accgctatgt tcaacggagg agtgactac cactctaacg cagctcaca cttcttagc	1200
	accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggttg agatctggaa gagggctcag	1260
	aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag	1320
	caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttga	1368
	<210> 49	
	<211> 1368	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mutante silente AnD9Ds v3	
	<400> 49	
	atgtctgctc caaccgctga catcagggtc agggctccag aggctaagaa ggttcacatc	60
	gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc	120
	ctcatcatcg gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc	180
15	aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaaat caccgctgga	240
	taccacaggc tttgggctca ctgctcatac tctgctactc ttccacttag gatctggctt	300
	gctgctgttg gaggaggagc tgttgagga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg	360
	gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctgttaggaa gggacttctc	420
	tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac	480
	atctctgatc tcaacgagga cccagttggt gtttggaac acaggaacta cctcaaggtt	540
	gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttggatg gggagattgg	600
20	cttgaggat tcgtgtacgc tggaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctacctc	660
	tgcgtgaact ctcttgctca ctggcttggga gatcaaccat tcgatgatag gaactctcct	720
	agggatcacg tgatcaccgc tcttgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac	780
	gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg	840
	tctatctggg cttggaagca acttggattg gcttacgatc tcaagaagtt cagggctaac	900
	gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact	960
25	cttgattggg gaacccact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag	1020

caagctaaga acggaagggg acttggtgct atcgctggag ttgttcacga tgttaccgac 1080
 ttcatacaagg atcaccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcga aaaggatctt 1140
 accgctatgt tcaacggagg agtgactac cactctaacg cagctcacia ccttcttagc 1200
 accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggttg agatctggaa gagggctcag 1260
 aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag 1320
 5 caaccaacca agatcccaga gccaatccca accgctgatg ctgcttga 1368

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

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Lys Arg Ala Gln Lys Glu Asn Val Glu Tyr Val Arg Asp Gly Ser Gly

420

425

430

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

Ile Pro Thr Ala Asp Ala Ala
 450 455

5

<210> 51
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Aspergillus nidulans
 <400> 51

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

10

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

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

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

15

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

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

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

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

20

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

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

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

25

Tyr Leu Lys Val Val Phe Thr Met Gly Leu Ala Val Pro Met Leu Val

180 185 190

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

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

5
 Leu Ala Leu Trp Leu Gly Asp Gln Pro Phe Asp Asp Arg Asn Ser Pro
 225 230 235 240

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

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

10
 His Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Trp Ser Ile Trp Ala Trp Lys Gln Leu
 275 280 285

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

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

15
 Leu Asp Trp Gly Thr Pro Leu Asp Gln Leu Pro Val Met Glu Trp Asp
 325 330 335

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

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

20
 Lys Ala Met Ile Ser Ser Gly Ile Gly Lys Asp Ala Thr Ala Met Phe
 370 375 380

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

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

25
 Lys Arg Ala Gln Lys Glu Asn Val Glu Tyr Val Arg Asp Gly Ser Gly
 420 425 430

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

Ile Pro Thr Ala Asp Ala Ala
 450 455

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

<400> 52

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

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

10
 Glu Ala Asn Ile Leu Ala Thr Gly Leu Asn Lys Lys Ala Pro Arg Ile
 35 40 45

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

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

15
 Leu Glu Lys Asp Asn Gln Glu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Lys Ile His
 85 90 95

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

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

20
 Phe Ala Leu Ser Gly Lys Val Pro Leu His Leu Asn Val Phe Leu Phe
 130 135 140

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

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

25
 Leu Phe Tyr Ala Ile Phe Gly Cys Ala Ser Val Glu Gly Ser Ala Lys
 180 185 190

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

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

5 Trp Met Leu Leu Lys Pro Asn Pro Lys Tyr Lys Ala Arg Ala Asp Ile
 225 230 235 240

Thr Asp Met Thr Asp Asp Trp Thr Ile Arg Phe Gln His Arg His Tyr
 245 250 255

Ile Leu Leu Met Leu Leu Thr Ala Phe Val Ile Pro Thr Leu Ile Cys
 260 265 270

10 Gly Tyr Phe Phe Asn Asp Tyr Met Gly Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Phe
 275 280 285

Ile Arg Val Phe Val Ile Gln Gln Ala Thr Phe Cys Ile Asn Ser Met
 290 295 300

Ala His Tyr Ile Gly Thr Gln Pro Phe Asp Asp Arg Arg Thr Pro Arg
 305 310 315 320

15 Asp Asn Trp Ile Thr Ala Ile Val Thr Phe Gly Glu Gly Tyr His Asn
 325 330 335

Phe His His Glu Phe Pro Thr Asp Tyr Arg Asn Ala Ile Lys Trp Tyr
 340 345 350

Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Val Ile Ile Tyr Leu Thr Ser Leu Val Gly
 355 360 365

Leu Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Phe Ser Gln Asn Ala Ile Glu Glu Ala
 370 375 380

20 Leu Ile Gln Gln Glu Gln Lys Lys Ile Asn Lys Lys Lys Ala Lys Ile
 385 390 395 400

Asn Trp Gly Pro Val Leu Thr Asp Leu Pro Met Trp Asp Lys Gln Thr
 405 410 415

Phe Leu Ala Lys Ser Lys Glu Asn Lys Gly Leu Val Ile Ile Ser Gly
 420 425 430

25 Ile Val His Asp Val Ser Gly Tyr Ile Ser Glu His Pro Gly Gly Glu
 435 440 445

Thr Leu Ile Lys Thr Ala Leu Gly Lys Asp Ala Thr Lys Ala Phe Ser
450 455 460

Gly Gly Val Tyr Arg His Ser Asn Ala Ala Gln Asn Val Leu Ala Asp
465 470 475 480

Met Arg Val Ala Val Ile Lys Glu Ser Lys Asn Ser Ala Ile Arg Met
485 490 495

5

Ala Ser Lys Arg Gly Glu Ile Tyr Glu Thr Gly Lys Phe Phe
500 505 510

<210> 53
<211> 13227
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> plásmido pDAB7309

10

<400> 53
ggactagtcc agaaggtaat tatccaagat gtagcatcaa gaatccaatg tttacgggaa 60
aaactatgga agtattatgt aagctcagca agaagcagat caatatgcmg cacatatgca 120
acctatgttc aaaaatgaag aatgtacaga tacaagatcc tatactgccca gaatacgaag 180
aagaatacgt agaaattgaa aaagaagaac caggcgaaga aaagaatctt gaagacgtaa 240
gcactgacga caacaatgaa aagaagaaga taaggtcggt gattgtgaaa gagacataga 300
ggacacatgt aagggtgaaa atgtaagggc ggaaagtaac cttatcacaag aggaatctta 360
tccccacta cttatccttt tatatctttc cgtgtcattt ttgcccttga gttttcctat 420
ataaggaacc aagttcggca tttgtgaaaa caagaaaaaa tttggtgtaa gctatcttct 480
ttgaagtact gaggatacaa cttcagagaa atttgtaagt ttgtaggtac cagatctgga 540
tcccaaacca tgtctccgga gaggagacca gttgagatta ggccagctac agcagctgat 600
atggccgcmg tttgtgatat cgttaacat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg 660
acagagccac aaacaccaca agagtggatt gatgatctag agaggttgca agatagatac 720
ccttggttgg ttgctgaggt tgaggggtgtt gtggctggtg ttgcttacgc tgggcccctgg 780
aaggctagga acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttacgtgtc acataggcat 840
caaaggttgg gcctaggatc tacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcgcga 900
ggttttaagt ctgtggttgc tgttataggc cttccaaacg atccatctgt taggttgcac 960
gaggcttgg gatacacagc ccgggtgaca ttgcgcgcag ctggatacaa gcatggtgga 1020
tggcatgatg ttggtttttg gcaaagggat tttgagttgc cagctcctcc aaggccagtt 1080
aggccagtta cccaaatctg agtagttagc ttaatcacct agagctcgat cggcggcaat 1140

25

	agcttcttag cgccatcccg ggttgatcct atctgtgttg aaatagttgc ggtgggcaag	1200
	gctctctttc agaaagacag gcggccaaag gaacccaagg tgaggtgggc tatggetctc	1260
	agttccttgt ggaagcgctt ggtctaaggt gcagaggtgt tagcgggatg aagcaaaagt	1320
	gtccgattgt aacaagatat gttgatccta cgtaaggata ttaaagtatg tattcatcac	1380
	taatataatc agtgtattcc aatatgtact acgatttcca atgtctttat tgtcgccgta	1440
5	tgtaatcggc gtcacaaaat aatccccggt gactttcttt taatccagga tgaaataata	1500
	tgttattata atttttgcca tttggtccgt tataggaatt gaagtgtgct tgaggtcggg	1560
	cgccaccact cccatttcat aattttacat gtatttgaaa aataaaaatt tatggatttc	1620
	aatttaaaca cgtatacttg taaagaatga tatcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt	1680
	attgataaaa taacaagtca ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca	1740
	agtttaaatt cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg	1800
10	aaagactgag tgcgatatta tgggtgaata cataggaatt cgtttaaacg atctgcgtct	1860
	aattttcggg ccaacttgca caggaaagac gtcgaccgcg gtagctcttg ccagcagac	1920
	tgggcttcca gtcctttcgc tcgatcgggt ccaatgttgt cctcagctgt gaaccggaag	1980
	cgagcagca acagtggaag aactgaaagg aacgagccgt ctataccttg atgatcggcc	2040
	tctggtgaag ggtatcatcg cagccaagca agctcatgaa aggctgatgg gggaggtgta	2100
	taattatgag gcccacggcg ggcttattct ttagggagga tctatctcgt tgctcaagtg	2160
	catggcgcaa agcagttatt ggagtgcgga ttttcgttgg catattattc gccacgagtt	2220
15	agcagacgaa gagaccttca tgaacgtggc caaggccaga gttaagcaga tgttacgccc	2280
	tgctgcaggc ctttctatta tccaatagtt ggttgatcct tggaaagagc ctcggctgag	2340
	gcccatactg aaagagatcg atggatatcg atatgccatg ttgtttgcta gccagaacca	2400
	gatcacatcc gatatgctat tgcagcttga cgcagatatg gaggataagt tgattcatgg	2460
	gatcgctcag gagtagctca tccatgcacg ccgacaagaa cagaaattcc gtcgagttaa	2520
	cgcagccgct tacgacggat tcgaaggcca tccattcggga atgtattagt ttgaccagc	2580
20	tccgcgtcac acctgtcttc atttgaataa gatgtagca attgttttta gctttgtctt	2640
	gttgtggcag ggcggcaagt gcttcagaca tcattctggt ttcaaatttt atgctggaga	2700
	acagcttctt aattcctttg gaaataatag actgcgtctt aaaattcaga tgtctggata	2760
	tagatatgat tgtaaaataa cctatttaag tgtcatttag aacataagtt ttatgaatgt	2820
	tcttccattt tcgtcatcga acgaataaga gtaatacac cttttttaac attacaaata	2880
	agttcttata cgttgtttat acaccgggaa tcatttccat tttttcgcg caaaagtcac	2940
25	ggatattcgt gaaagcgaca taaactgcga aatttgcggg gagtgtcttg agtttgcctc	3000

	gaggctagcg	catgcacata	gacacacaca	tcatttcatt	gatgcttggg	aataattgtc	3060
	attagattgt	ttttatgcat	agatgcactc	gaaatcagcc	aattttagac	aagtatcaaa	3120
	cggatgtgac	ttcagtacat	taaaaacgtc	cgcaatgtgt	tattaagttg	tctaagcgtc	3180
	aatttgattt	acaattgaat	atatacctgcc	ccagccagcc	aacagctcga	tttacaattg	3240
	aatatatacct	gccggccggc	ccacgcgtgt	cgaggaattc	tgatctggcc	cccatttggg	3300
5	cgtgaatgta	gacacgtcga	aataaagatt	tccgaattag	aataatttgt	ttattgcttt	3360
	cgctataaaa	tacgacggat	cgtaatttgt	cgttttatca	aatgtactt	tcattttata	3420
	ataacgctgc	ggacatctac	atttttgaat	tgaaaaaaaa	ttggtaatta	ctctttcttt	3480
	ttctccatat	tgaccatcat	actcattgct	gatccatgta	gattttcccgg	acatgaagcc	3540
	atttacaatt	gaatataatcc	tgccgccgct	gccgctttgc	acccggtgga	gcttgcatgt	3600
	tggtttctac	gcagaactga	gccggttagg	cagataattt	ccattgagaa	ctgagccatg	3660
10	tgacacttcc	ccccaacacg	gtgagcgacg	gggcaacgga	gtgatccaca	tgggactttt	3720
	aaacatcatc	cgtcggatgg	cgttgcgaga	gaagcagtcg	atccgtgaga	tcagccgacg	3780
	caccgggcag	gcygcgaaca	cgatcgcaaa	gtatttgaac	gcaggtacaa	tcgagccgac	3840
	gttcacgcgg	aacgaccaag	caagcttggc	tgccattttt	ggggtgaggc	cgttcgcggc	3900
	cgagggggcg	agccccctggg	gggatgggag	gcccgcgcta	gcgggccggg	agggttcgag	3960
	aagggggggc	accccccttc	ggcgtgcgcg	gtcacgcgca	cagggcgag	ccctggttaa	4020
	aaacaagggt	tataaatatt	ggtttaaaag	caggttaaaa	gacaggttag	cggtggccga	4080
15	aaaacggggc	gaaacccttg	caaatgctgg	attttctgcc	tgtggacagc	ccctcaaattg	4140
	tcaatagggt	cgccccctcat	ctgtcagcac	tctgccccctc	aagtgtcaag	gatcgcgccc	4200
	ctcatctgtc	agtagtcgcg	cccctcaagt	gtcaataaccg	cagggcactt	atccccaggc	4260
	ttgtccacat	catctgtggg	aaactcgcgt	aaaatcaggc	gttttcgccg	atttgcgagg	4320
	ctggccagct	ccacgtcgcc	ggccgaaatc	gagcctgccc	ctcatctgtc	aacgccgcg	4380
	cgggtgagtc	ggccccctcaa	gtgtcaacgt	ccgccccctca	tctgtcagtg	agggccaaagt	4440
20	tttccgcgag	gtatccacaa	cgccggcgcc	cgcggtgtct	cgcacacggc	ttcgacggcg	4500
	tttctggcgc	gtttgcaggg	ccatagacgg	ccgccagccc	agcggcgagg	gcaaccagcc	4560
	cggtgagcgt	cggaaagggt	cgacggatct	tttccgctgc	ataaccctgc	ttcgggggtca	4620
	ttatagcgat	tttttcggta	tatccatcct	ttttcgcacg	atatacagga	ttttgcaaaa	4680
	gggttcgtgt	agactttcct	tggtgtatcc	aacggcgctca	gccgggcagg	ataggtgaag	4740
	taggcccacc	cgcgagcggg	tgttccttct	tactgtccc	ttattcgcac	ctggcgggtgc	4800
	tcaacgggaa	tcctgctctg	cgaggctggc	cggctaccgc	cggcgaaca	gatgagggca	4860
25	agcggatggc	tgatgaaacc	aagccaacca	ggaaggcgag	cccacctatc	aaggtgtact	4920

gccttccaga cgaacgaaga gcgattgagg aaaaggcggc ggcggccggc atgagcctgt 4980
 cggcctacct gctggccgtc ggccagggct acaaaatcac gggcgtcgtg gactatgagc 5040
 acgtccgcga gctggcccgc atcaatggcg acctgggccg cctgggcggc ctgctgaaac 5100
 tctggctcac cgacgaccgc cgcacggcgc ggttcggtga tgccacgatc ctcgccctgc 5160
 5 tggcgaagat cgaagagaag caggacgagc ttggcaaggt catgatgggc gtggtccgcc 5220
 cgagggcaga gccatgactt ttttagccgc taaaacggcc ggggggtgcg cgtgattgcc 5280
 aagcacgtcc ccatgcgctc catcaagaag agcgacttcg cggagctggt attcgtgcag 5340
 ggcaagattc ggaataccaa gtacgagaag gacggccaga cggctctacgg gaccgacttc 5400
 attgccgata aggtggatta tctggacacc aaggcaccag gcgggtcaaa tcaggaataa 5460
 gggcacattg ccccgcgctg agtcggggca atcccgcgaag gaggggtgaat gaatcggacg 5520
 tttgaccgga aggcatacag gcaagaactg atcgacgcgg ggttttccgc cgaggatgcc 5580
 10 gaaaccatcg caagccgcac cgtcatgctg gcgccccgcg aaaccttcca gtccgtcggc 5640
 tcgatggtcc agcaagctac ggccaagatc gagcgcgaca gcgtgcaact ggctccccct 5700
 gccctgcccg cgccatcggc cgccgtggag cgttcgcgtc gtctcgaaca ggaggcggca 5760
 ggtttggcga agtcgatgac catcgacacg cgaggaacta tgacgaccaa gaagcgaaaa 5820
 accgccggcg aggacctggc aaaacaggtc agcgaggcca agcaggccgc gttgctgaaa 5880
 cacacgaagc agcagatcaa ggaaatgcag ctttccttgt tcgatattgc gccgtggccg 5940
 15 gacacgatgc gagcgatgcc aaacgacacg gcccgctctg ccctgttcac cacgcgcaac 6000
 aagaaaatcc cgcgcgaggc gctgcaaaac aaggtcattt tccacgtcaa caaggacgtg 6060
 aagatcacct acaccggcgt cgagctgcgg gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag 6120
 gtgttgagat acgcgaagcg caccctatc ggcgagccga tcaccttcac gttctacgag 6180
 ctttgccagg acctgggctg gtcgatcaat ggccggtatt acacgaaggc cgaggaatgc 6240
 ctgtcgcgcc tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg accgcgttgg gcacctggaa 6300
 tcggtgtcgc tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg gcaagaaaac gtcccgttgc 6360
 20 caggtcctga tcgacgagga aatcgtcgtg ctgtttgctg gcgaccacta cacgaaattc 6420
 atatgggaga agtaccgcaa gctgtcgcgg acggcccgcg ggatgttcga ctatttcagc 6480
 tcgcaccggg agccgtaccg gctcaagctg gaaaccttc gcctcatgtg cggatcggat 6540
 tccaccgcg tgaagaagtg gcgcgagcag gtcggcgaag cctgcgaaga gttgcgaggc 6600
 agcggcctgg tggaacacgc ctgggtcaat gatgacctgg tgcatgcaa acgctagggc 6660
 cttgtggggt cagttccggc tgggggttca gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa 6720
 25 caagcgggca ctgctcgacg cacttgcttc gctcagtatc gtcggggacg cacggcgcgc 6780

	tctacgaact gccgataaac agaggattaa aattgacaat tgtgattaag gctcagatte 6840
	gacggcttgg agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga 6900
	aagctccaga gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt 6960
	tcgctgaacg gttgcgagat gccgtggcat tcggcgccta catcgacggc gagatcattg 7020
	ggctgtcggg cttcaaacag gaggacggcc ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg 7080
5	gcgttttcgt ggagcccga cagcagggcc gaggggtcgc cggtatgtg ctgaggcggc 7140
	tgccggcggg tttattgctc gtgatgatcg tccgacagat tccaacggga atctggtgga 7200
	tgcgcatctt catcctcggc gcacttaata tttcgtatt ctggagcttg ttgtttattt 7260
	cggctctaccg cctgccgggc ggggtcgcgg cgacggtagg cgctgtgcag ccgctgatgg 7320
	tcgtgttcat ctctgccgct ctgctaggta gcccgatacg attgatggcg gtcctggggg 7380
	ctatttgccg aactgcgggc gtggcgtgt tgggtttgac accaaacgca gcgctagatc 7440
10	ctgtcggcgt cgcagcgggc ctggcggggg cggtttccat ggcgttcgga accgtgctga 7500
	cccgaagtg gcaacctccc gtgcctctgc tcacctttac cgcttgcaa ctggcggccg 7560
	gaggacttct gctcgttcca gtagctttag tgtttgatcc gccaatcccg atgcctacag 7620
	gaaccaatgt tctcggcctg gcgtggctcg gcctgatcgg agcgggttta acctacttcc 7680
	tttggttccg ggggatctcg cgactcgaac ctacagttgt ttccttactg ggctttctca 7740
	gccccgagc gcttagtggg aatttgacc ccttatcgaa ccgggagcac aggatgacgc 7800
	ctaacaattc attcaagccg acaccgctc gcggcgcggc ttaattcagg agttaaacad 7860
15	catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgtcat 7920
	cgagcgccat ctcgaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggtccc cagtggatgg 7980
	ggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga 8040
	aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc ctggagagag 8100
	cgagattctc cgcgctgtag aagtcacatc tgttggtcac gacgacatca ttccgtggcg 8160
	ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttg agaatggcag cgcaatgaca ttcttgagg 8220
20	tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa aagcaagaga 8280
	acatagcgtt gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc tttgatccgg ttctgaaca 8340
	ggatctattt gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcggcc cggactgggc 8400
	tggcgatgag cgaaatgtag tgcttacgtt gtcccgcatt tggtagcagc cagtaaccgg 8460
	caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc cggcccagta 8520
	tcagcccgtc atacttgaag ctaggcaggc ttatcttgga caagaagatc gcttggcctc 8580
	gcgcgcagat cagttggaag aatttgttca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt 8640
25	cggcaataa tgtctaaca ttcgttcaag ccgacgccgc ttcggcggcg ggcttaactc 8700

aagcgttaga gagctgggga agactatgcg cgatctgttg aaggtggttc taagcctcgt 8760
 cttgcgatgg catttcgatc cattcccatt ccgcgctcaa gatggcttcc cctcggcagt 8820
 tcatcagggc taaatcaatc tagccgactt gtccggtgaa atgggctgca ctccaacaga 8880
 aacaatcaaa caaacatata cagcgactta ttcacacgag ctcaaattac aacggtatat 8940
 atcctgccag tcagcatcat cacacaaaaa gttaggcccg aatagtttga aattagaaag 9000
 5 ctcgcaattg aggtctacag gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctcaccggat 9060
 cctaaccggt gtgatcatgg gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttgg tctaatttag 9120
 tttggtattg agtaaaacaa attcgaacca aaccaaata taaatatata gtttttatat 9180
 atatgccttt aagacttttt atagaatttt ctttaaaaaa tatctagaaa tatttgcgac 9240
 tcttctggca tgtaatattt cgtaaatat gaagtgtcc atttttatta actttaaata 9300
 attggttgta cgatcacttt cttatcaagt gttactaaaa tgcgtcaatc tctttgttct 9360
 10 tccatattca tatgtcaaaa cctatcaaaa ttcttatata tctttttcga atttgaagtg 9420
 aaatttcgat aatttaaaat taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt 9480
 tatacttaat tactaaattt ggtaacttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa 9540
 acgactaaaa taaataaata tcatgtgta ttaagaaaat tctctataa gaatatttta 9600
 atagatcata tgtttgtaaa aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa 9660
 aatttgacia agtaagatta aaataatatt catctaacia aaaaaaaacc agaaaatgct 9720
 15 gaaaacccgg caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt tggtttggtt tgattttgat 9780
 ataaaccgaa ccaactcggg ccatttgcac ccctaatcat aatagcttta atatttcaag 9840
 atattattaa gttaacgttg tcaatcctt ggaaattttg caaaatgaat caagcctata 9900
 tggctgtaat atgaatttaa aagcagctcg atgtgggtgtt aatagtaat ttacttgatt 9960
 ctaaaaaaat atcccaagta ttaataattt ctgctaggaa gaaggtagc tacgatttac 10020
 agcaaagcca gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca 10080
 aatattttta aaaaaatcag caatgacttg gaacaaaaga aagtgatata tttttgttc 10140
 20 ttaaacaagc atcccctcta aagaatggca gttttccttt gcatgtaact attatgctcc 10200
 cttcgttaca aaaattttgg actactattg ggaacttctt ctgaaaatag tggccaccgc 10260
 ttaattaagg cgcgccatgc ccgggcaagc ggccgcacia gtttgtacia aaaagctgaa 10320
 cgagaaacgt aaaatgatat aaatatcaat atattaaatt agattttgca taaaaaacag 10380
 actacataat actgtaaaac acaacatata cagtcactat gaatcaacta cttagatggt 10440
 attagtgacc tgtagtcgac cgacagcctt ccaaatgttc ttcgggtgat gctgccaaact 10500
 25 tagtcgaccg acagccttcc aaatgttctt ctcaaaccgga atcgtcgtat ccagcctact 10560

	cgctattgtc ctcaatgccg tattaatca taaaaagaaa taagaaaaag aggtgcgagc	10620
	ctcttttttg tgtgacaaaa taaaaacatc tacctattca tatacgcctag tgtcatagtc	10680
	ctgaaaaatca tctgcatcaa gaacaatttc acaactctta tacttttctc ttacaagtcg	10740
	ttcggcttca tctggatttt cagcctctat acttactaaa cgtgataaag tttctgtaat	10800
	ttctactgta tgcacctgca gactggctgt gtataagga gcctgacatt tatattcccc	10860
5	agaacatcag gttaatggcg tttttgatgt cattttcgcg gtggctgaga tcagccactt	10920
	cttccccgat aacggagacc ggcacactgg ccatatcggg ggtcatcatg cgccagcttt	10980
	catccccgat atgcaccacc gggtaaagtt cacgggagac tttatctgac agcagacgtg	11040
	cactggccag ggggatcacc atccgtcgcc cgggctgtgc aataatatca ctctgtacat	11100
	ccacaaacag acgataacgg ctctctcttt tataggtgta aacctaaac tgcatttcac	11160
	cagccccgtg tctcgtcagc aaaagagccg ttcatttcaa taaaccggc gacctcagcc	11220
10	atcccttctt gatcttccgc tttccagcgt tcggcacgca gacgacggc ttcattctgc	11280
	atggttggtc ttaccagacc ggagatattg acatcatata tgccttgagc aactgatagc	11340
	tgtcgtgtc aactgtcact gtaatacgtt gttcatagc atacctcttt ttgacatact	11400
	tcgggtatac atatcagtat atattcttat accgcaaaaa tcagcgcgca aatacgcata	11460
	ctgttatctg gcttttagta agccggatcc acgcgcggt tacgcccc ctgccactca	11520
	tcgcagtact gttgtaattc attaacatt ctgccgacat ggaagccatc acaaacggca	11580
	tgatgaacct gaatcgccag cggcatcagc acctgtcgc cttgcgtata atattgccc	11640
15	atggtgaaaa cggggcgcaa gaagttgtcc atattggcca cgtttaaatc aaaactggtg	11700
	aaactcacc agggattggc tgagacgaaa aacatattct caataaacc ttagggaaa	11760
	taggccagg tttcaccgta acacgccaca tcttgcaat atatgtgtag aaactgccgg	11820
	aaatcgtcgt ggtattcact ccagagcgat gaaaacggtt cagtttgctc atggaaaacg	11880
	gtgtaacaag ggtgaacact atcccatatc accagctcac cgtctttcat tgccatacgg	11940
	aattccgat gagcattcat caggcgggca agaattgtgaa taaaggccgg ataaaactg	12000
	tgcttatttt tctttacggt ctttaaaaag gccgtaatat ccagctgaac ggtctggtta	12060
20	taggtacatt gagcaactga ctgaaatgcc tcaaatggt ctttacgatg ccattgggat	12120
	atatcaacgg tggatatatc agtgattttt ttctccatt tagcttctt agctcctgaa	12180
	aatctcgata actcaaaaa tacgcccggg agtgatctta tttcattatg gtgaaagttg	12240
	gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggcca gggcttccc	12300
	gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggatt	12360
	tattcggcgc aaagtgcgtc gggatgatgct gccaaacttag tcgactacag gtcactaata	12420
25	ccatctaagt agttgattca tagtgactgg atatgttgtg ttttacagta ttatgtagtc	12480

tgttttttat gcaaaatcta atttaataata ttgatattta tatcatttta cgtttctcgt 12540
 tcagctttct tgtacaaagt ggttgccgcc gcttaattaa atttaaattc aattaatgca ~~12600~~
 atcttgattt tcaacaacga aggtaatggc gtaaaagaaa aaatgtatgt tattgtattg 12660
 atctttcatg atgttgaagc gtgccataat atgatgatgt ataattaaata tattaactgt 12720
 cgcattttat tgaaatggca ctggtatttc aaccatatct ttgattctgt tacatgacac 12780
 5 gactgcaaga agtaaataat agacgccggt gttaaagaat tgctatcata tgtgcctaac 12840
 tagaggggaat ttgagcgta gacctaataa aatattaca aatatctcac tctgtcgcca 12900
 gcaatgggtg aatcagcgca gacaaatggc gtaaagatcg cggaaaaacc tccccgagtg 12960
 gcatgatagc tgcctctgta ttgctgattt agtcagcctt atttgactta aggggtgcct 13020
 cgtagtgac aaattgcttt caaggagaca gccatgcccc aactttgtt gaaaaacaaa 13080
 ttgcctttgg ggagacggtg aagccagttg ctcttcaata aggaatgtcg agggaggcaat 13140
 10 gtaaccgcct ctgtagtac acttctctaa tccaaaaatc aatttgattt caagataccg 13200
 caaaaaactt atggtttaa cctgca 13227

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7318

15 <400> 54
 cgcgccgacc cagctttctt gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt 60
 tgttgcaacg aacaggtcac tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat 120
 atccccata gtgagtcgta ttacatggc atagctgttt cctggcagct ctggcccgtg 180
 tctcaaaatc tctgatgta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa 240
 ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga gccatattca acgggaaacg 300
 tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc 360
 20 gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgtttgt atgggaagcc cgatgcgcca 420
 gagttgtttc tgaaacatgg caaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc 480
 agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact 540
 cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccgaa aaacagcatt ccaggtatta 600
 gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtggt cctgcgcccg 660
 ttgcatcga ttctgtttg taattgtcct ttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgt 720
 25 caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt 780

	aatggctggc ctggtgaaca agtctggaaa gaaatgcata aacttttggc attctcaccg	840
	gattcagtcg tcaactcatgg tgatttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa	900
	ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc	960
	atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ctttcattac agaaacggct ttttcaaaaa	1020
	tatggtattg ataatcctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt	1080
5	ttctaatacag aattgggttaa ttggttghaa cactggcaga gcattacgct gacttgacgg	1140
	gacggcgcaa gctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt acgcgtcgtt ccaactgagcg	1200
	tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc	1260
	tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtgg tttgtttgcc ggatcaagag	1320
	ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc	1380
	cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac	1440
	ctcgtctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc	1500
10	gggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt	1560
	tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt	1620
	gagcattgag aaagcgcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggttaagc	1680
	ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt	1740
	tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttttg atgctcgtca	1800
	ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt	1860
15	tgctggcctt ttgctcacat gttctttctc gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt	1920
	attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag	1980
	tcagtgagcg aggaagcggga agagcgcaca atacgcaaac cgctctccc cgcgcgttgg	2040
	ccgattcatt aatgcagctg gcacgacaggt tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc	2100
	aacgcaatta atacgcgtac cgctagccag gaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat	2160
	ccgtcaggat ggccttctgc ttagtttgat gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc	2220
	gccaccctcc gggccgttgc ttcacaacgt tcaaatccgc tcccggcgga tttgtcctac	2280
20	tcaggagagc gttcaccgac aaacaacaga taaaacgaaa ggcccagtct tccgactgag	2340
	cctttcgttt tatttgatgc ctggcagttc cctactctcg cgtaaacgct agcatggatg	2400
	ttttcccagt cacgacggtg taaaacgacg gccagtctta agctcggggcc ccaataatg	2460
	atttatattt gactgatagt gacctgttcg ttgcaacaaa ttgatgagca atgctttttt	2520
	ataatgcaa ctttgtataa aaaagcaggc tccgcggccg cactaggttt aaactctaga	2580
	agctaggaat tcaaacaaag aagcgcgcgc gcggccgcca ttgtactccc agtatcatta	2640
25	tagtgaaagt tttggctctc tcgcccgtgg ttttttacct ctatttaaag gggttttcca	2700

cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta ctggtactt taattttctca taatctttgg 2760
 ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat cctacaaat ttattatttg ttaaacattt 2820
 tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta atgtagtcta acattttcat 2880
 attgaaatat ataatttact taatttttagc gttggtagaa agcataatga tttattctta 2940
 ttctttctca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa ttctttacct taagaaggat 3000
 5 ttccccattt atattttaaa aatatattta tcaaatttt ttcaaccacg taaatctcat 3060
 aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat aattttttta ttcgactgat 3120
 cttaaagcaa caccacgtga cacaactagc ctttttttc tttgaataaa aaaatccaat 3180
 tatcattgta tttttttat acaatgaaaa tttcaccaa caatgatttg tggattttct 3240
 gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt gacactacgg aagtaactga 3300
 agatctgctt ttacatgca gacacatctt ctaaagtaat ttaataata gttactatat 3360
 10 tcaagatttc atatatcaa tactcaatat tacttctaaa aaattaatta gatataatta 3420
 aatatattact tttttaatt taagttaat tgttgaattt gtgactattg atttattatt 3480
 ctactatggt taaattggtt tatagatagt ttaaagtaaa tataagtaat gtagtagagt 3540
 gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg gtggactaat tttcatatat 3600
 ttcttattgc ttttacctt tcttggtatg taagtccgta actggaatta ctgtgggtg 3660
 ccatgacact ctgtggtctt ttggttcag catggatgct tgcgcaagaa aaagacaaag 3720
 aacaaagaaa aaagacaaaa cagagagaca aaacgcaatc acacaaccaa ctcaaattag 3780
 15 tcaactggctg atcaagatcg ccgctccat gtatgtctaa atgccatgca aagcaacacg 3840
 tgcttaacat gcactttaaa tggctcacc atctcaacc acacacaaac acattgcctt 3900
 tttcttcac atcaccacaa ccacctgtat atattcattc tcttccgca cctcaatttc 3960
 tcaacttcaa cacacgtcaa cctgcatatg cgtgtcatcc catgccc aaa tctccatgca 4020
 tgttccaacc accttctctc ttatataata cctataaata cctctaata cactcacttc 4080
 tttcatcacc catccatcca gagtactact actctactac tataataccc caaccacact 4140
 20 catattcaat actactctag gatccaacaa tgtctgctcc aaccgctgac atcagggcta 4200
 gggctccaga ggctaagaag gttcacatcg ctgataccgc tatcaacagg cacaattggt 4260
 acaagcacgt gaactggctc aacgtcttc tcatcatcgg aatcccactc tacggatgca 4320
 tccaagcttt ctgggtcca cttcaactca agaccgctat ctgggctgtg atctactact 4380
 tcttcaccgg acttggaatc accgctggat accacaggct ttgggctcac tgctcactact 4440
 ctgctactct tccacttagg atctggcttg ctgctgttg aggaggagct gttgaggat 4500
 25 ctatcagatg gtgggctagg gatcacagg ctcatcatag gtacaccgat accgacaagg 4560

	accatactc	tgtaggaag	ggactttct	actctcacct	tggatggatg	gtgatgaaqc	4620
	agaacccaaa	gaggatcgga	aggaccgaca	tctctgatct	caacgaggac	ccagttggtg	4680
	tttggaaca	caggaactac	ctcaagggtg	tgttcaccat	gggacttgct	gttccaatgc	4740
	ttgttgctgg	acttggatgg	ggagattggc	ttggaggatt	cgtgtacgct	ggaatcctta	4800
	ggatcttctt	cgttcaacaa	gctaccttct	gcgtgaactc	tcttgctcac	tggcttggag	4860
5	atcaaccatt	cgatgatagg	aactctccta	gggatcacgt	gatcaccgct	cttgttacc	4920
	ttggagaggg	ataccacaac	ttccaccacg	agttcccatc	tgactacagg	aacgctatcg	4980
	agtggcacca	gtacgatcct	accaagtgg	ctatctgggc	ttggaagcaa	cttggattgg	5040
	cttacgatct	caagaagttc	agggctaacy	agatcgagaa	gggaagggtt	caacaacttc	5100
	agaagaagct	tgataggaag	agggtactc	ttgattgggg	aacccactt	gatcaacttc	5160
	cagtgatgga	atgggatgac	tacgttgagc	aagctaagaa	cggaagggga	cttgttgcta	5220
10	tcgctggagt	tgttcacgat	gttaccgact	tcatcaagga	tcaccagga	ggaaaggcta	5280
	tgatctcttc	tggaatcgga	aaggatgcta	ccgctatggt	caacggagga	gtgtactacc	5340
	acictaacgc	agctcacaac	cttcttagca	ccatgaggyt	gggagtgatc	ayyyyaggat	5400
	gcgaggttga	gatctggaag	agggtcaga	aggagaacgt	tgagtacgtt	agggatggat	5460
	ctggacaaag	ggatgatcag	gctggagagc	aaccaaccaa	gatcccagag	ccaatcccaa	5520
	ccgctgatgc	tgcttgagta	gtagcttaa	tcacctaggt	caccagtatg	aactaaaatg	5580
	catgtaggtg	taagagctca	tggagagcat	ggaatattgt	atccgacat	gtaacagtat	5640
15	aataactgag	ctccatctca	cttcttctat	gaataaacia	aggatgttat	gatataataa	5700
	cactctatct	atgcacctta	ttgttctatg	ataaatttcc	tcttattatt	ataaatcatc	5760
	tgaatcgtga	cggcttatgg	aatgcttcaa	atagtacaaa	aacaaatgty	tactataaga	5820
	clttctaaac	aattctaact	ttagcattgt	gaacgagaca	taagtgttaa	gaagacataa	5880
	caattataat	ggaagaagtt	tgtctccatt	tatatattat	atattacca	cttatgtatt	5940
	atattaggat	gttaaggaga	cataacaatt	ataaagagag	aagtttgtat	ccatttatat	6000
20	attatatact	accattttat	atattatact	tatccactta	ttaatgtct	ttataaggtt	6060
	tgatccatga	tatttcta	atcttagttg	atagtatat	gaaaaggtag	tatttgaact	6120
	ctcttactct	gtataaaggt	tggatcatcc	ttaaagtggg	tctattta	tttattgctt	6180
	cttacagata	aaaaaaaaat	tatgagttgg	tttgataaaa	tattgaagga	ttaaaaataa	6240
	taataaataa	taataaacat	ataatatatg	tatataaatt	tattataata	taacatttat	6300
	ctataaaaaa	glaaatattg	tcataaatct	atacaatcgt	ttagccttgc	tggaacgaat	6360
	ctcaattatt	taaacgagag	taaacaatatt	tgactttttg	gttatttaac	aaattattat	6420
25	ttaacactat	atgaaatfff	ttttttttat	cagcaaagaa	taaaattaa	ttaagaagga	6480

	caatggtgtc	ccaatcctta	tacaaccaac	ticcacaaga	aagtcaagtc	agagacaaca	6540
	aaaaaacaag	caaaggaaat	tttttaattt	gagttgtctt	gtttgctgca	taatttatgc	6600
	agtaaacac	tacacataac	ccttttagca	gtagagcaat	ggttgaccgt	gtgcttagct	6660
	tcttttattt	tattttttta	tcagcaaaga	ataaataaaa	taaaatgaga	cacttcaggg	6720
	atgtttcaac	ccttatacaa	aacccccaaa	acaagtttcc	tagcaccta	ccaacgaatt	6780
5	cgcgccgct	ttcctgcatg	acatcgtcct	gcagagccaa	gcgcatgctt	aattaaacta	6840
	gtctcccagt	atcattatag	tgaaagtttt	ggctctctcg	ccggtggttt	tttacctta	6900
	tttaagggg	ttttccacct	aaaaattctg	gtatcattct	cactttactt	gttacttta	6960
	ttctcataa	tctttggttg	aaattatcac	gcttccgcac	acgatatccc	tacaaattta	7020
	ttatttgta	aacattttca	aaccgcataa	aattttatga	agtcccgtct	atctttaatg	7080
	tagtctaaca	ttttcatatt	gaaatatata	atttacttaa	ttttagcggt	ggtagaaagc	7140
10	ataatgattt	attcttattc	ttcttcatat	aatgttttaa	tatacaatat	aaacaaattc	7200
	tttaccttaa	gaaggatttc	ccattttata	ttttaaaaat	atatttatca	aatatttttc	7260
	aaccacgtaa	atctcataat	aataagttgt	ttcaaaagta	ataaaaattta	actccataat	7320
	tttttattc	gactgatctt	aaagcaacac	ccagtgcac	aactagccat	tttttcttt	7380
	gaataaaaa	atccaattat	cattgtattt	ttttataaca	atgaaaattt	caccaaaaa	7440
	tgatttgtyg	tatttctgaa	gcaagtcag	ttatgcaaaa	ttctataatt	cccatttgac	7500
15	actacggaag	taactgaaga	tctgctttta	catgagagac	acatcttcta	aagtaatttt	7560
	aataatagtt	actatattca	agatttcata	tatcaaatac	tcaatattac	ttctaaaaaa	7620
	ttaattagat	ataattaa	tattactttt	ttaattttaa	gtttaattgt	tgaatttgty	7680
	actattgatt	tattattcta	ctatgtttta	attgttttat	agatagttta	aagtaaatat	7740
	aagtaatgta	gtagagtgtt	agagtgttac	cctaaacct	aaactataag	atztatggtg	7800
	gactaatttt	catatatttc	ttattgcttt	taccttttct	tggtatgtaa	gtccgtaact	7860
	ggaattactg	tgggttgcca	tgacactctg	tggtcttttg	gttcatgcat	ggatcttgcy	7920
20	caagaaaaag	acaagaaca	aagaaaaaag	acaaaacaga	gagacaaaac	gcaatcacac	7980
	aaccaactca	aattagtcac	tggctgatca	agatcgccgc	gtccatgtat	gtctaaatgc	8040
	catgcaaagc	aacacgtgct	taacatgcac	tttaaatggc	tcacccatct	caaccacac	8100
	acaaacacat	tgctttttc	ttcatcatca	ccacaaccac	ctgtatatat	tcattctctt	8160
	ccgccacctc	aatttcttca	cttcaacaca	cgtaacctg	catatgcytg	tcatcccatg	8220
	cccaaactc	catgcatggt	ccaaccacct	tctcttttat	ataataccta	taaatacctc	8280
25	taatatact	cacttctttc	atcatccatc	catccagagt	actactactc	tactactata	8340

atacccaac ccaactcata ttcaatacta ctctaggtac cctgcagggg ~~tccaacaatg~~ 8400
 gctgcacttg atagcatccc tgaggacaaa gcaactagct ccaagtcaac ccacatacag 8460
 taccaagagg tcacgttttag gaactggtac aagaaaatca actggctcaa cacgaccctt 8520
 gttgtcctca ttctgtctt tgggttgtag ttgacgagaa ccacacctt caccagacct 8580
 acctcattt ggtctgttct ctactatttc tgtacagcgt ttggcatcac tgggtggctac 8640
 5 cacagacttt ggtcccatag gtcttacagt gcgaggttg cattgagact ctctctggct 8700
 ttacttgag ctggtgcat ccaaggttct gcaagatggt ggtcagccaa tcatagggca 8760
 catcaccgtt ggacggacac catgaaggac cctactctg tgatgagagg actgctgttc 8820
 tcccacatag gttggatggt tctcaactct gatccaaagg tcaaaggcag aacagatggt 8880
 tctgatcttg actctgatcc cgtcgttggt tggcaacaca aacactatgg caagtgtttg 8940
 ctctttgccg cttggatctt tccgatgata gtggctgggc tgggttgggg agattggtgg 9000
 ggtggacttg tctatgctgg catcatacgt gcctgctttg ttcagcaagc cactttctgt 9060
 10 gtcaactcat tggcacattg gataggtgaa caaccgtttg atgacagacg tactccaagg 9120
 gatcatgttc tgactgctgtt ggtcacaatg ggagaaggat accacaactt ccaccatgag 9180
 tttccgagtg actacagaaa tgccatcatt tggatcagt atgaccctac aaagtggctc 9240
 atctatctct tcagcttggg tcccttccca ttggcctact ctctcaagac ctctccgttcc 9300
 aatgagattg agaaaggaag gcttcagcaa cagcaaaagg ctcttgacaa gaaaagaagt 9360
 ggtcttgatt ggggacttcc tctcttccag ctccagtga tctcatggga tgactttcaa 9420
 15 gctcgtlga aagaaagtgg agagatgctt gttgctgttg ctggagtgat ccatgatgtc 9480
 tcccagttca ttgaagatca tcttgggtgg aggagcctca ttagaagtgc tgttgggaaa 9540
 gatgggactg gcatgttcaa tgggtggagt tatgaacatt caaacgccgc acacaacttg 9600
 ctgagcacia tgagagtgg agtcttgaga ggtggacaag aagtggagggt ttggaagaaa 9660
 cagaggtgg atgttcttgg gaagtcagac attcttctgc aagtgacaag ggtggagcgt 9720
 ctggtggaag gagctgttgc agcgtgatga gtagttagct taatcaccta gagctcggtc 9780
 acctcgagta tcaaaatcta tttagaaata cacaatattt tgttgcaggc ttgctggaga 9840
 20 atcgatectgc taccataaaa attacaaaaa aattttattt gcctcaatta ttttaggatt 9900
 ggtaltaagg acgcttaaat tttttgtcgg gtcactacgc atcattgtga ttgagaagat 9960
 cagcgatagc aaatattcgt agtactatcg ataatttatt tgaaaattca taagaaaagc 10020
 aaacgttaca tgaattgatg aaacaataca aagacagata aagccacgca catttaggat 10080
 attggccgag attactgaat attgagtaag atcacggaat ttctgacagg agcatgtctt 10140
 caattcagcc caaatggcag ttgaaatact caaacgccc catatgcagg agcggatcat 10200
 25 tcattgtttg tttggttgcc tttgccaaca tgggagtcca aggttg 10247

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7320

<400> 55

5 aattcgcggc cgctttcctg catgacatcg tcctgcagag ccaagcgcac gcttaattaa 60
 actagtctcc cagtatcatt atagtgaag ttttggctct ctgcccggg gttttttacc 120
 tctattttaaa ggggttttcc acctaaaaat tctggtatca ttctcacttt acttgttact 180
 ttaattttctc ataatctttg gttgaaatta tcacgcttcc gcacacgata tcctacaaa 240
 tttattattht gttaaacatt ttcaaaccgc ataaaattht atgaagtccc gtctatcttt 300
 aatgtagtct aacattttca tattgaaata tataattht ttaatthtag cgttggtaga 360
 aagcataatg atthtattctt attcttcttc atataaatgt ttaatataca atataaaca 420

10 attctttacc ttaagaagga ttcccattht tatatthttaa aaatatattht atcaaatatt 480
 tttcaaccac glaaatctca taataataag ttgtttcaaa agtaataaaa tttactcca 540
 taatthttht attcgactga tcttaaagca acaccagtg acacaactag ccattthttht 600
 ctttgaataa aaaaatcca ttatcattgt atthtthttha tacaatgaaa atthcaccia 660
 acaatgattt gtggtatttc tgaagcaagt catgttatgc aaaattctat aattccatt 720
 tgacactacg gaagtaactg aagatctgct ttacatgcy agacacatct tctaaagtaa 780

15 tthtaataat agttactata ttcaagatt catatatcaa atactcaata ttacttctaa 840
 aaaattaatt agatataatt aaaaattac tthtthtaatt ttaagthttaa ttgttgaatt 900
 tgtgactatt gatttattat tctactatgt ttaaattgtht ttatagatag tthaaagtaa 960
 atataagtaa tgtagtagag tgttagagtg ttaccctaaa ccataaacta taagatttat 1020
 ggtggactaa tthtcatata tthtctattg cthttacctt tctttggtat gtaagtccgt 1080
 aactggaatt actgtgggtt gccatgacac tctgtggtct tttggttcat gcatggatct 1140

20 tgcgcaagaa aaagacaaag aacaagaaa aaagacaaaa cagagagaca aaacgcaatc 1200
 acacaacca ctcaaattag tctactggctg atcaagatcy ccgcttccat gtatgtctaa 1260
 atgccatgca aagcaacacg tgcttaacat gcactthttaa tggctcacc atctcaacc 1320
 acacacaaac acattgcctt tthtctcatc atcaccaca ccacctgtat atattcattc 1380
 tcttccgcca cctcaattht tthtcttcaa cacacgtcaa cctgcatatg cygtctatcc 1440
 catgccc aaa tctccatgca tgttccaacc accttctctc ttatataata cctataaata 1500

25 cctctaataat cactcacttc tthtcatcct catccatcca gagtactact actctactac 1560

	tataataccc	caacccaact	catattcaat	actactctag	gtaccctgca	gggatccaac	1620
	aatggctgca	cttgatagca	tccttgagga	caaagcaact	agctccaagt	caaccacat	1680
	acagtaccaa	gaggtcargt	ttaggaactg	gtacaagaaa	atcaactggc	tcaacacgac	1740
	ccttgttgtc	ctcattcctg	ctcttgggtt	gtacttgacg	agaaccacac	ctctcaccag	1800
	acctaccctc	atltggctctg	ttctctacta	tttctgtaca	gcgtttggca	tcactgggtg	1860
5	ctaccacaga	ctttgggtccc	ataggtctta	cagtgcgagg	ttgccattga	gactcttcct	1920
	ggctttcact	ggagctgggtg	cgatccaagg	ttctgcaaga	tgggtggcag	ccaatcatag	1980
	ggcacatcac	cgttggacgg	acaccatgaa	ggacccttac	tctgtgatga	gaggactgct	2040
	gttctccac	ataggttga	tggttctcaa	ctctgatcca	aaggtcaaag	gcagaacaga	2100
	tgtttctgat	cttgactctg	atcccgtcgt	tgtgtggcaa	cacaaact	atggcaagt	2160
	tttgccttt	gccgcttga	tctttccgat	gatagtggct	gggctgggtt	ggggagattg	2220
10	gtggggtgga	cttgtctatg	ctggcatcat	acgtgcctgc	tttgttcagc	aagccacttt	2280
	ctgtgtcaac	tcattggcac	attggatagg	tgaacaaccg	tttgatgaca	gacgtactcc	2340
	aagggatcat	gtcttgactg	cgttggctac	aatgggagaa	ggataccaca	acttccacca	2400
	tgagtttccg	agtgactaca	gaaatgccat	catttgggat	cagtatgacc	ctacaaagt	2460
	gctcatctat	ctcttcagct	tgggtccctt	cccattggcc	tactctctca	agaccttccg	2520
	ttccaatgag	attgagaaag	gaaggcttca	gcaacagcaa	aaggctcttg	acaagaaaag	2580
	aagtgytctt	gattggggac	ttctctctt	ccagcttcca	gtgatctcat	gggatgactt	2640
15	tcaagctcgt	tgcaaagaaa	gtggagagat	gcttgttgc	gttgctggag	tgatccatga	2700
	tgtctccag	ttcattgaag	atcatcctgg	tgggaggagc	ctcattagaa	gtgctgttgg	2760
	gaaagatggg	actggcatgt	tcaatgggtg	agtgtatgaa	cattcaaacg	ccgcacacaa	2820
	cttgcctgagc	acaatgagag	ttggagtctt	gagaggtgga	caagaagtgg	aggtttggaa	2880
	gaaacagagg	gtggatgttc	ttgggaagtc	agacattctt	cgtaagtga	caagggtgga	2940
	gcgtctggty	gaaggagctg	ttgcagcgtg	atgagtagtt	agcttaatca	cctagagctc	3000
	ggtcacctcg	agtatcaaaa	tctatttaga	aatacacaat	atlttgttgc	aggttctgctg	3060
20	gagaatcgat	ctgctatcat	aaaaattaca	aaaaaatltt	atlttgcctca	attattttag	3120
	gattgggtatt	aaggacgctt	aaattatttg	tcgggtcact	acgcatcatt	gtgattgaga	3180
	agatcagcga	tacgaaatat	tcgtagtact	atcgataatt	tatttgaaaa	ttcataagaa	3240
	aagcaaacgt	tacatgaatt	gatgaaacaa	tacaaagaca	gataaagcca	cgcacattta	3300
	ggatattggc	cgagattact	gaatattgag	taagatcacg	gaatttctga	caggagcatg	3360
	tcttcaattc	agcccaatg	gcagttgaaa	tactcaaacc	gccccatag	caggagcggga	3420
25	tcattcattg	tttgtttggt	tgcctttgcc	aacatgggag	tccaaggttg	gcgcyccgac	3480

	ccagctttct	tgtacaaagt	tggcattata	agaaagcatt	gcttatcaat	ttgttgcaac	3540
	gaacaggtca	ctatcagtca	aaataaaatc	attatttgcc	atccagctga	tatcccctat	3600
	agtgagtcgt	attacatggt	catagctggt	tcctggcagc	tctggcccgt	gtctcaaaaat	3660
	ctctgatggt	acattgcaca	agataaaaaat	atatcatcat	gaacaataaa	actgtctgct	3720
	tacataaaca	gtaatacaag	gggtgttatg	agccatattc	aacgggaaac	gtcgaggccg	3780
5	cgattaaatt	ccaacatgga	tgctgattta	tatgggtata	aatgggctcg	cgataatgtc	3840
	gggcaatcag	gtgcgacaat	ctatcgcttg	tatgggaagc	ccgatgcgcc	agagttgttt	3900
	ctgaaacatg	gcaaaggtag	cgttgccaat	gatgttacag	atgagatggt	cagactaaac	3960
	tggctgacgg	aatttatgcc	tcttccgacc	atcaagcatt	ttatccgtac	tcctgatgat	4020
	gcatggttac	tcaccactgc	gatccccgga	aaaacagcat	tccaggtatt	agaagaatat	4080
	cctgattcag	gtgaaaatat	tgttgatgcg	ctggcagtgt	tcctgcgccg	gttgcatcgc	4140
10	attcctgttt	gtaattgtcc	tttfaacagc	gatcgcgtat	ttcgtctcgc	tcaggcgcaa	4200
	tcacgaatga	ataacggttt	ggttgatgcg	agtgattttg	atgacgagcg	taatggctgg	4260
	cctgttgaac	aagtctggaa	agaaatgcat	aaacttttgc	cattctcacc	ggattcagtc	4320
	gtcactcatg	gtgattttctc	acttgataac	cttatttttg	acgaggggaa	attaataggt	4380
	tgtattgatg	ttggacgagt	cggaatcgca	gaccgatacc	aggatcttgc	catcctatgg	4440
	aaactgcctcg	gtgagttttc	tccttcatta	cagaaacggc	tttttcaaaa	atatggtatt	4500
	gataatcctg	atatgaataa	attgcagttt	catttgatgc	tcgatgagtt	tttctaataca	4560
15	gaattggtta	attggttgta	acactggcag	agcattacgc	tgacttgacg	ggacggcgca	4620
	agctcatgac	caaaaatcct	taacgtgagt	tacgcctcgt	tccactgagc	gtcagacccc	4680
	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgcgcgtaat	ctgctgcttg	4740
	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcggty	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	4800
	ctttttccga	agglaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	ccttctagtg	4860
	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgcttacata	cctcgcctcg	4920
20	ctaactcctgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cggtgtcttac	cgggttgac	4980
	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	5040
	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	5100
	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaaag	gcggacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	5160
	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctggtatct	ttatagtcct	5220
	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	agggggcg	5280
25	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	tcctggcctt	ttgctygcct	5340

tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc 5400
 tttgagtgag ctgataccgc tgcgccgagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc 5460
 gaggaagcgg aagagcgcgc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat 5520
 taatgcagct ggcacgacag gtttcccgcac tggaaagcgg gcagtgcgca caacgcaatt 5580
 aatacgcgta ccgctagcca ggaagagttt gtagaaacgc aaaaaggcca tccgctcagga 5640
5 tggccttctg cttagtttga tgcctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cgccaccctc 5700
 cgggcccgttg cttcacaacg ttcaaattccg ctcccggcgg atttgtccta ctcaggagag 5760
 cgttcaccga caaacaacag ataaaacgaa aggccagtc ttccgactga gcctttcgtt 5820
 ttatttgatg cctggcagtt ccctactctc gcgttaacgc tagcatggat gttttcccag 5880
 tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtcctt aagctcgggc cccaaataat gattttattt 5940
 tgactgatag tgacctgttc gttgcaacaa attgatgagc aatgcttttt tataatgcca 6000
10 actttgtaca aaaaagcagg ctccgcggcc gcactagggt taaactctag aagctagg 6058

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

 <220>
 <223> **Plásmido** pDAB7323

 <400> 56
 ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tgcgccgttg ttttttacct 60
15 ctatttaaag gggttttcca cctaaaaatt ctggatcat tctcacttta ctgttactt 120
 taattttctca taatctttgg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat 180
 ttattatttg ttaaacattt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta 240
 atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taattttagc gttgtagaa 300
 agcataatga tttattctta ttcttcttca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa 360
 ttctttacct taagaaggat ttcccatttt atattttaaa aatataatita tcaaatattt 420
 ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat 480
20 aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgca cacactagc cattttttc 540
 tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa 600
 caatgatattg tggatattct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt 660
 gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcga gacacatctt ctaaagtaat 720
 ttttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa 780
 aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt 840
25 gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattggtt tatagatagt ttaaagtaaa 900

	tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg	960
	gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttaccitt tcttggtatg taagtccgta	1020
	actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtcct ttggttcatt catggatcct	1080
	gcgcaagaaa aagacaaaga acaaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca	1140
	cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgcgtccatt tatgtctaaa	1200
5	tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca	1260
	cacacaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct	1320
	cttccgccac ctcaatttct tcacttcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc	1380
	atgccaaaat ctccatgcat gttccaacca ctttctctct tatataatac ctataaatac	1440
	ctctaatact actcacttct ttcattcatc atccatccag agtactacta ctctactact	1500
	ataatacccc aaccaactc atattcaata ctactctagg taccctgcag ggatccaaca	1560
10	atggctcca acatttctga ggatgtcaat ggtgttcttt ttgagtcaga tgcggcaacc	1620
	cctgatttgg ctctttccac accacctgtg caaaaagctg acaacagacc caagcaactt	1680
	gtgtggagga acattttgct tttcgcttac ttgcacctg cagctctcta cggaggctat	1740
	ttgtttctct tcagtgcaaa atggcagacc gacattttcg cttacattct ttatgtcatc	1800
	tctggactgg ggataactgc tggggcacat agactctggg ctcaaaagtc atacaaagcc	1860
	aagtggccac tcagagttat actgggtcatc ttcaacacgg ttgcctttca agacgtgtct	1920
	atygattggg ctctgtacca tagaatgcat cacaagtaca gcgagaccga cgcggacca	1980
15	cacaatgcaa cgagaggttt ctcttctct cacattggct ggcttcttgt taggaaacat	2040
	cctgatctga aagaaaaagg gaagggactc gacatgagtg atctccttgc tgatccaata	2100
	ctccgttttc agaagaagta ctatctgatc ctcatgcctc tggcctgttt tgtgatgcca	2160
	accgttatcc cggtttactt ttggggagaa acttgacaa atgctttctt cgtggcagcc	2220
	atgttccgtt atgctttcat cctgaatgtt acctggttgg tgaactctgc cgcacacaag	2280
	tggggagaca aaccctatga caagtccatc aagccttccg aaaacctttc agttgcatg	2340
20	tttgctttgg gagaaggatt tcacaattac catcacactt ttccgtggga ctacaagaca	2400
	gcagagcttg gaaacaacaa gttgaacttc acaacaacgt tcatcaattt ctttgcgaaa	2460
	atcggttggg cctatgattt gaagactgtg agtgatgaca ttgtcaagaa cagggtcaag	2520
	agaactggcg atggaagcca tcatctctgg ggctgggggtg atgagaatca gagcaaagaa	2580
	gagatagatg cagccattag gatcaaccct aaagacgatt gagtagttag cttaatcacc	2640
	tagagctcgg tcacctgag tatcaaaatc tatttagaaa tacacaatat ttgtttgcag	2700
25	gcttgcctgga gaatcgtct gctatcataa aaattacaaa aaaattttat ttgcctcaat	2760

	tatttttagga ttggtattaa ggacgcttaa attatttgtc gggtcactac gcatcattgt	2820
	gattgagaag atcagcgata cgaaatattc gtagtactat cgataattta tttgaaaatt	2880
	cataagaaaa gcaaacgtta catgaattga tgaacaata caaagacaga taaagccacg	2940
	cacatttagg atattggccg agattactga atattgagta agatcacgga atttctgaca	3000
	ggagcatgtc ttcaattcag cccaaatggc agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca	3060
5	ggagcggatc attcattggt tgtttggtg cctttgcaa catgggagtc caaggttggc	3120
	gcgcccagcc agctttcttg taaaaagttg gcattataag aaagcattgc ttatcaattt	3180
	gttgcaacga acaggtcact atcagtcaaa ataaaatcat tatttgccat ccagctgata	3240
	tccccatag tgagtcgtat tacatggtca tagctgtttc ctggcagctc tggcccgtgt	3300
	ctcaaatct ctgatgttac attgcacaag ataaaaatat atcatcatga acaataaaac	3360
	tgictgclta cataaacagt aatacaaggy gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt	3420
	cgaggccgcg attaaattcc aacatggatg ctgatttata tgggtataaa tgggctcgcg	3480
10	ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc gatgcgccag	3540
	agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcy ttgccaatya tgttacagat gagatggtca	3600
	gactaaactg gctgacggaa tttatgcctc ttccgaccat caagcatttt atccgtactc	3660
	ctgatgatgc atggttactc accactgcga tccccgaaa aacagcattc caggtattag	3720
	aagaatatcc tgattcaggt gaaaatattg ttgatgcgct ggcagtgctc ctgcgccggt	3780
	tgcattcgat tcctgtttgt aattgtcctt ttaacagcga tcgcgtattt cgtctcgctc	3840
15	aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat gacgagcgt	3900
	atggctggcc tgttgaaaca gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca ttctcaccg	3960
	attcagtcgt cactcatggt gatttctcac ttgataacct tatttttgac gaggggaaat	4020
	taataggttg tattgatggt ggacgagtcg gaatcgaga ccgataccag gatcttgcca	4080
	tcctatggaa ctgcctcggg gagttttctc cttcattaca gaaacggctt tttcaaaaat	4140
	atggtattga taatcctgat atgaataaat tgcagtttca tttgatgctc gatgagtttt	4200
	tctaatacaga attggttaat tggttgtaac actggcagag cattacgctg acttgacggg	4260
20	acggcgcaag ctcatgacca aaatccctta acgtgagtta cgcgctgctc cactgagcgt	4320
	cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	4380
	gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc	4440
	taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	4500
	ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacalacc	4560
	tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	4620
25	ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcy gtcgggctga acgggggggt	4680

	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	4740
	agcattgaga	aagcgcacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggat	ccggtaagcg	4800
	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgagg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	4860
	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	tgctcgtcag	4920
	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	4980
5	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	5040
	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgacgcgagt	5100
	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcctaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcggttggc	5160
	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	5220
	acgcaattaa	tacgcgtacc	gctagccagg	aagagtttgt	agaaacgcaa	aaaggccatc	5280
	cgtcaggatg	gccttctgct	tagtttgatg	cctggcagtt	tatggcgggc	gtcctgcccc	5340
10	ccaccctccg	ggccgttgct	tcacaacgtt	caaatccgct	cccggcggat	ttgtcctact	5400
	caggagagcg	ttcaccgaca	aacaacagat	aaaacgaaag	gcccagcttt	ccgactgagc	5460
	ctttcgTTTT	atTTgatgcc	tggcagttcc	ctactctcgc	gttaacgcta	gcatggatgt	5520
	tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgaégg	ccagtcttaa	gctcgggccc	caaataatga	5580
	TTTTattttg	actgatagtg	acctgttctg	tgcaacaaat	tgatgagcaa	tgctTTTTta	5640
	taatgccaac	ttgtacaaa	aaagcaggct	ccgcggccgc	actaggTTta	aactctagaa	5700
	gctaggaatt	caaacaaga	agcgatcgcg	cggccgccat	tgtactccca	gtatcattat	5760
15	agtgaaagtt	ttggctctct	cgccggtggt	TTTTtacctc	tatttaaagg	ggTTTTccac	5820
	ctaaaaatc	tggtatcatt	ctcactttac	ttgttacttt	aatttctcat	aatctttggt	5880
	tgaaattatc	acgcttccgc	acacgatatc	cctacaaatt	tattatttgt	taaacatttt	5940
	caaaccgcat	aaaattttat	gaagtcccg	ctatctTTaa	tgtagtctaa	cattttcata	6000
	ttgaaatata	taatttactt	aatttttagcg	ttggtagaaa	gcataatgat	ttattcttat	6060
	tcttcttcat	ataaatgitt	aatatacaat	ataaacaat	tctttacctt	aagaaggatt	6120
20	tcccatttta	tattttaaaa	atatatttat	caaatatttt	tcaaccagct	aaatctcata	6180
	ataataagtt	gtttcaaaag	taataaaatt	taactccata	atTTTTttat	tcgactgac	6240
	ttaaagcaac	accagtgac	acaactagcc	atTTTTttct	ttgaataaaa	aaatccaatt	6300
	atcattgtat	TTTTtttata	caatgaaaat	ttcaccaaac	aatgatttgt	ggtatttctg	6360
	aagcaagtca	tgttatgcaa	aattctataa	ttcccatttg	acactacgga	agtaactgaa	6420
	gatctgcttt	tacatgcgag	acacatcttc	taaagtaatt	ttataaatag	ttactatatt	6480
25	caagatttca	tatatcaaat	actcaatatt	acttctaaaa	aattaattag	atataattaa	6540

	aatattactt	ttttaatttt	aagtttaatt	gttgaatttg	tgactattga	tttattattc	6600
	tactatgttt	aaattgtttt	atagatagtt	taaagtaaat	ataagtaatg	tagtagagtg	6660
	ttagagtgtt	accctaaacc	ataaactata	agattttatgg	tggactaatt	ttcatatatt	6720
	tcttattgct	tttaccittt	cttggatgt	aagtccgtaa	ctggaattac	tgtgggttgc	6780
	catgacactc	tgtggctctt	tggttcatgc	atggatgctt	gcgcaagaaa	aagacaaaaga	6840
5	acaaagaaaa	aagacaaaac	agagagacaa	aacgcaatca	cacaaccaac	tcaaattagt	6900
	cactggctga	tcaagatcgc	cgcgtccatg	tatgtctaaa	tgccatgcaa	agcaacacgt	6960
	gcttaacatg	cactttaaatt	ggctcaccca	tctcaaccca	cacacaaaca	cattgccttt	7020
	ttcttcatca	tcaccacaac	cacctgtata	tattcattct	cttccgccac	ctcaatttct	7080
	tcacttcaac	acacgtcaac	ctgcatatgc	gtgtcatccc	atgcccaaat	ctccatgcat	7140
	gttccaacca	ccttctctct	tatataatac	ctataaatac	ctctaataac	actcacttct	7200
10	ttcatcatcc	atccatccag	agtactacta	ctctactact	ataatacccc	aaccaactc	7260
	atattcaata	ctactctagg	atccaacaat	gtctgtcca	accgctgaca	tcagggttag	7320
	ggctccagag	gctaagaagg	ttcacatcgc	tgataccgct	atcaacaggc	acaatttgta	7380
	caagcacgtg	aactggctca	acgtcttctt	catcatcgga	atcccactct	acggatgcat	7440
	ccaagctttc	tgggttccac	ttcaactcaa	gaccgctatc	tgggctgtga	tctactactt	7500
	cttcaccgga	cttggaatca	ccgctggata	ccacaggctt	tgggctcact	gctcatactc	7560
	tgctactcct	ccacttagga	tctggcttgc	tgctgttggg	ggaggagctg	ttgagggatc	7620
15	tatcagatgg	tgggctaggg	atcacagggc	tcatcatagg	tacaccgata	ccgacaagga	7680
	cccatactct	gttaggaagg	gacttctcta	ctctcacctt	ggatggatgg	tgatgaagca	7740
	gaacccaaag	aggatcggaa	ggaccgacat	ctctgatctc	aacgaggacc	cagttgttgt	7800
	ttggcaacac	aggaactacc	tcaaggttgt	gttcaccatg	ggacttgctg	ttccaatgct	7860
	tgttgctgga	cttggatggg	gagattggct	tggaggatc	gtgtacgctg	gaatccttag	7920
	gatcttcttc	gttcaacaag	ctaccttctg	cgtgaactct	cttgctcact	ggcttggaga	7980
20	tcaaccattc	gatgatagga	actctcctag	ggatcacgty	atcacccgctc	ttgttaccct	8040
	tggagagggg	taccacaact	tccaccacga	gllcccatcl	gactacagga	acgctatcga	8100
	gtggcaccag	tacgatccta	ccaagtggtc	tatctgggct	tggagcaac	ttggattggc	8160
	ttacgatctc	aagaagttca	gggctaacga	gatcgagaag	ggaagggttc	aacaacttca	8220
	gaagaagctt	gataggaaga	gggctactct	tgattgggga	acccacttg	atcaacttcc	8280
	agtgatggaa	tgggatgact	acgttgagca	agetaagaac	ggaaggggac	ttgttgctat	8340
	cgctggagtt	gttcacgatg	ttaccgactt	catcaaggat	caccaggag	gaaaggctat	8400
25	gatctcttct	ggaatcggaa	aggatgctac	cyctatgttc	aacggaggag	tgtactacca	8460

	ctctaacgca gctcacaacc ttcttagcac catgaggggtg ggagtgatca ggggaggatg	8520
	cgaggttgag atctggaaga gggctcagaa ggagaacggt gagtacgtta gggatggatc	8580
	tggacaaagg gtgatcaggg ctggagagca accaaccaag atcccagagc caatcccaac	8640
	cgctgatgct gcttgagtag ttagcttaat cacctaggtc accagtatga actaaaatgc	8700
	atgtaggtgt aagagctcat ggagagcatg gaatattgta tccgaccatg taacagtata	8760
5	ataactgagc tccatctcac ttcttctatg aataaacaaa ggatgttatg atatattaac	8820
	actctatcta tgcaccttat tgttctatga taaatttctt cttattatta taaatcatct	8880
	gaatcgtgac ggcttatgga atgcttcaaa tagtacaanaa acaaatgtgt actataagac	8940
	tttctaanaa attctaactt tagcattgtg aacgagacat aagtgttaag aagacataac	9000
	aattataatg gaagaagttt gtctccattt atatattata tattaccac ttatgtatta	9060
	tattaggatg ttaaggagac ataacaatta taaagagaga agtttgtatc catttatata	9120
10	ttatatacta cccatttata tattatactt atccacttat ttaatgtctt tataaggttt	9180
	gatccatgat atttctaata ttttagttga tatgtatatg aaaagggtact atttgaactc	9240
	tcttactctg tataaagggt ggatcatcct taaagtgggt ctatttaatt ttattgcttc	9300
	ttacagataa aaaaaaatt atgagttggt ttgataaanaa attgaaggat ttaanaaat	9360
	aanaanaaat aaataacata taatatatgt atataaanaa attataaat aacatttatc	9420
	tataanaaag taaatattgt cataaatcta tacaatcggt tagccttgct ggaacgaatc	9480
	tcaattattt aaacgagagt aaacatattt gactttttg ttaatttaaca aattattatt	9540
15	taacactata tgaaattttt tttttttatc agcaanaaag aaaattanaa taagaaggac	9600
	aatgggtgtcc caatccttat acaaccaact tccacaagaa agtcaagtca gagacaanaa	9660
	aaaaacaagc aaaggaaatt ttttaatttg agttgtcttg tttgctgcat aatttatgca	9720
	gtaanaaact acacataacc ctttttagcag tagagcaatg gttgaccgtg tgcttagctt	9780
	cttttatttt atttttttat cagcaanaag taanaanaa aaaatgagac acttcagggg	9840
	tgtttcaacc cttatacaaa acccaanaaa caagtttctt agcaccctac caacgaattc	9900
20	gaggccgctt tctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcattgctta attaaa	9956
	<210> 57	
	<211> 5767	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Plásmido pDAB7325	
	<400> 57	
25	aattcgcggc cgctttcctg catgacatcg tctgagag ccaagcgcatt gcttaattaa	60

	actagtcgcc	cagtatcatt	atagtgaag	tttggctct	ctcgccggtg	gtttttacc	120
	tctatttaa	ggggttttcc	acctaaaaat	tctggatca	ttctcacttt	acttggtact	180
	ttaatttctc	ataatctttg	gttgaaatta	tcacgcttcc	gcacacgata	tcctacaaa	240
	tttattat	gttaaacatt	ttcaaaccgc	ataaaat	atgaagtccc	gtctatcttt	300
	aatgtagtct	aacattttca	tattgaaata	tataatttac	ttaatttttag	cgttggtaga	360
5	aagcataalg	atatttctt	attcttcttc	atataaatgt	ttaatatata	atataaacaa	420
	attctttacc	ttaagaagga	tttccattt	tatatittaa	aaatatattt	atcaaatatt	480
	tttcaaccac	gtaaactca	taataataag	ttgtttcaaa	agtaataaaa	tttaactcca	540
	taattttttt	attcgactga	tcttaaagca	acaccagtg	acacaactag	ccattttttt	600
	ctttgaataa	aaaaatccaa	ttatcattgt	atttttttta	tacaatgaaa	atttcaccaa	660
	acaatgattt	gtggtatttc	tgaagcaagt	catgttatgc	aaaattctat	aattcccatt	720
	tgacactacg	gaagtaactg	aagatctgct	tttcatgcg	agacacatct	tctaaagtaa	780
10	ttttaataat	agtactata	ttcaagattt	catatatcaa	atactcaata	ttacttctaa	840
	aaaattaatt	agataaatt	aaaatattac	tttttaatt	ttaagtttaa	ttgttgaatt	900
	tgtgactatt	gatttattat	tctactatgt	ttaaattggt	ttatagatag	tttaaagtaa	960
	atataagtaa	tgtagtagag	tgtagagtg	ttaccctaaa	ccataaacta	taagatttat	1020
	ggtggactaa	tttcatata	tttcttattg	cttttacctt	ttcttggtat	gtaagtccgt	1080
	aactggaatt	actgigggtt	gccatgacac	tctgtggtct	tttggttcat	gcatggatct	1140
15	tgcgcaagaa	aaagacaaag	aacaaagaaa	aaagacaaaa	cagagagaca	aaacgcaatc	1200
	acacaacca	ctcaaattag	tcaactggctg	atcaagatcg	ccgcgtccat	gtatgtctaa	1260
	atgccatgca	aagcaacacg	tgcttaacat	gcactttaaa	tggtccacc	atctcaacc	1320
	acacacaaac	acattgcctt	tttcttcatc	atcaccacaa	ccacctgtat	atattcattc	1380
	tcttccgcca	cctcaatttc	ttcacttcaa	cacacgtcaa	cctgcatatg	cggtgcatcc	1440
	catgcccaaa	tctccatgca	tgttccaacc	accttctctc	ttatataata	cctataaata	1500
	cctctaata	caactcactt	tttcatcctc	catccatcca	gagtactact	actctactac	1560
20	tataataccc	caaccaact	catattcaat	actactctag	gtaccctgca	gggatccaac	1620
	aatggctccc	aacatttctg	aggatgtcaa	tggtgttctt	tttgagtcag	atgcggcaac	1680
	ccctgatttg	gctctttcca	caccacctgt	gcaaaaagct	gacaacagac	ccaagcaact	1740
	tgtgtggagg	aacattttgc	ttttcgctta	cttgcacctc	gcagctctct	acggaggcta	1800
	tttgtttctc	ttcagtgcaa	aatggcagac	cgacattttc	gcttacattc	tttatgtcat	1860
	ctctggactg	gggataactg	ctggggcaca	tagactctgg	gctcacaagt	catacaaagc	1920
25	caagtggcca	ctcagagtta	tactggtcat	cttcaacacg	gttgctttc	aagacgtgc	1980

	tatggattgg gctcgtgacc atagaatgca tcacaagtac agcgagaccg acgcggaccc	2040
	acacaatgca acgagagggt tcttcttctc tcacattggc tggcttcttg ttaggaaaca	2100
	tcctgatctg aaagaaaaag ggaagggact cgacatgagt gatctccttg ctgatccaat	2160
	actccgtttt cagaagaagt actatctgat cctcatgcct ctggcctggt ttgtgatgcc	2220
	aaccgttatc ccggtttact tttggggaga aacttgaca aatgctttct tctggtcagc	2280
5	catgltccgt tatgctttca tctgaaatgt tacctggtg gtgaactctg ccgcacacaa	2340
	gtggggagac aaaccctatg acaagtccat caagccttcc gaaaacctt cagttgcgat	2400
	gtttgctttg ggagaaggat ttcacaatta ccatcacact tttccgtggg actacaagac	2460
	agcagagctt ggaaacaaca agttgaactt cacaacaacg ttcatacaatt tctttgcgaa	2520
	aatcggttgg gcctatgatt tgaagactgt gagtgatgac attgtcaaga acagggtcaa	2580
	gagaactggc gatggaagcc atcatctctg gggctgggg gatgagaatc agagcaaaga	2640
10	agagatagat gcagccatta ggatcaaccc taaagacgat tgagtagtta gcttaatcac	2700
	ctagagctcg gtcacctcga gtatcaaaat ctatttagaa atacacaata tttgttgca	2760
	ggcttgctgg agaatcgatc tgctatcata aaaattacaa aaaaatttta tttgcctcaa	2820
	ttatttttagg attggtatta aggacgctta aattatttgt cgggtcacta cgcatactg	2880
	tgattgagaa gatcagcgat acgaaatatt cgtagtacta tcgataattt atttgaaaat	2940
	tcataagaaa agcaaacglt acatgaattg atgaaacaat acaaagacag ataaagccac	3000
15	gcacatttag gatattggcc gagattactg aatattgagt aagatcacgg aatttctgac	3060
	aggagcatgt cttcaattca gccc aaatgg cagttgaaat actcaaaccg ccccatatgc	3120
	aggagcggat cattcattgt ttgtttgggt gcctttgcc aatgggagt ccaaggttgg	3180
	cgcgccgacc cagctttctt gtacaaagtt ggcattataa gaaagcattg cttatcaatt	3240
	tgttgcaacg aacaggtcac tatcagtcaa aataaaatca ttatttgcca tccagctgat	3300
	atccccata gtgagtcgta ttacatggtc atagctgttt cctggcagct ctggccccgtg	3360
	tctcaaaatc tctgatgta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa	3420
20	ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga gccatattca acgggaaacg	3480
	tcgagggcgc gattaaatc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc	3540
	gataatgctg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgcttgt atgggaagcc cgatgcgcca	3600
	gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc	3660
	agactaaact ggctgacgga atttatgcct ctccgacca tcaagcattt tatccgtact	3720
	cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggaa aacagcatt ccaggtatta	3780
25	gaagaatatc ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtggt cctgcgcccg	3840

	ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct	3900
	caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt	3960
	aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata aacttttgcc attctcaccg	4020
	gattcagtcg tcaactatgg tgattttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa	4080
	ttaataggtt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc	4140
5	atcctatgga actgcctcgg tgagttttct cttcattac agaaacggct tttcaaaaa	4200
	tatggtattg ataactctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt	4260
	ttctaactcag aattggttaa ttggttgtaa cactggcaga gcattacgct gacttgacgg	4320
	gacggcgcaa gctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt acgcgctgct ccaactgagcg	4380
	tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagalc ctttttttct gcgcgtaatc	4440
	tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggctg tttgtttgcc ggatcaagag	4500
	ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc	4560
10	cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac	4620
	ctcgcctcgc taactcctgt accagtggtc gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc	4680
	gggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt	4740
	tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt	4800
	gagcattgag aaagcggcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggtt tccggtaagc	4860
	ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt	4920
15	tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttltgt atgctcgtca	4980
	ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt	5040
	tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt	5100
	attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcag	5160
	tcagttagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg	5220
	ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccact ggaaagcggg cagttagcgc	5280
	aacgcaatta atacgcgtac cgctagccag gaagagtttg tagaaacgca aaaaggccat	5340
20	ccgtcaggat ggcttctgc ttagtttgat gcctggcagt ttatggcggg cgtcctgccc	5400
	gccacctctc gggccgttgc ttcacaacgt tcaaatccgc tcccggcggg tttgtcctac	5460
	tcaggagagc gttaccgac aaacaacaga taaaacgaaa ggcccagtct tccgactgag	5520
	cccttcgttt tatttgatgc ctggcagttc cctactctcg cgtaacgct agcatggatg	5580
	ttttcccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagcttta agctcgggcc ccaataatg	5640
	atlttatltt gactgatagt gacctgttcg ttgcaacaaa ttgatgagca atgctttttt	5700
25	ataatgccaa ctttgtacia aaaagcaggc tccgcggccg cactaggttt aaactctaga	5760

agctagg

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

5 <220>
<223> Plásmido pDAB7327

<400> 58
cggtcacctc gagtatcaaa atctatttag aaatacacia tattttgttg caggcttgct 60
ggagaatcga tctgctatca taaaaattac aaaaaaattt tatttgcttc aattatttta 120
ggattggtat taaggacgct taaattattt gtcgggtcac tacgcatcat tgtgattgag 180
aagatcagcg atacgaaata ttcgtagtac tatcgataat ttatttgaaa attcataaga 240
aaagcaaacy ttacatgaat tgatgaaaca atacaaagac agataaagcc acgcacattt 300
10 aggatattgg ccgagattac tgaatattga glaagatcac ggaatttctg acaggagcat 360
gtcttcaatt cagcccaaat ggcagttgaa atactcaaac cgccccatat gcaggagcgg 420
atcattcatt gttgtttgg ttgcctttgc caacatggga gtccaagggtt ggcgcgccga 480
cccagcttic ttgtacaaag ttggcattat aagaaaqcat tgcttatcaa ttgtttgcaa 540
cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttgc catccagctg atatccccta 600
tagtgagtcg tattacatgg tcatagctgt ttcttggcag ctctggcccc tgtctcaaaa 660
15 tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa tatatcatca tgaacaataa aactgtctgc 720
ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat gagccatatt caacgggaaa cgtcgaggcc 780
gcgattaaat tccaacatgg atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt 840
cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt 900
tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa 960
ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga 1020
tgcatggtta ctaccactg cgatccccgg aaaaacagca ttccaggat tagaagaata 1080
20 tcttgattca ggtgaaaata ttgttgatgc gctggcagtg ttcttgcgcc ggttgcattc 1140
gattctgttt tgaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctccaggcga 1200
atcacgaatg aataacggtt tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg 1260
gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt 1320
cgctactcat ggtgatttct cacttgataa ctttattttt gacgagggga aattaatagg 1380
ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccatcctatg 1440
25 gaactgcctc ggtgagtttt ctcttcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatatgggat 1500

	tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaate	1560
	agaattgggt aattggttgt aactggtgca gagcattacg ctgacttgac gggacggcgc	1620
	aagctcatga ccaaatccc ttaacgtgag ttacgcgtcg ttccactgag cgtcagaccc	1680
	cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgctgctaa tctgctgctt	1740
	gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag agctaccaac	1800
5	tccttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt	1860
	gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct	1920
	gctaatectg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tctgtcttta ccgggttggg	1980
	ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac	2040
	acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg	2100
	agaaagcggc acgcttcccg aaggggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt	2160
10	cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc	2220
	tgctgggttt cgccacctct gacttgagcg tctgattttg tgatgctcgt cagggggggc	2280
	gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgy ttcctggcct tttgctggcc	2340
	ttttgctcac atgttcttcc ctgctttatc ccctgattct gtggataacc gtaltaccgc	2400
	ctttgagtga gctgataacc ctgcccag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag	2460
	cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca	2520
	ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat	2580
15	taatacgcgt accgctagcc aggaagagtt tgtagaaacg caaaaaggcc atccgtcagg	2640
	atggccttct gcttagtttg atgctggca gtttatggcg ggcgtcctgc ccgccacct	2700
	ccgggcccgtt gcttcacaac gttcaaatcc gctcccggcg gatttgcct actcaggaga	2760
	gcgttcaccg acaacaaca gataaaacga aaggcccagt cttccgactg agcctttcgt	2820
	tttatttgat gcctggcagt tcctactct cgcgttaacg ctagcatgga tgttttccca	2880
	gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtct taagctcggg ccccaaataa tgattttatt	2940
	ttgactgata gtgacctggt cgttgcaaca aattgatgag caatgcttt ttataatgcc	3000
20	aactttgtac aaaaaagcag gctccgcggc cgcactaggt ttaactcta gaagctagga	3060
	atccgcccgc gctttcctgc atgacatcgt cctgcagagc caagcgcagc cttaattaaa	3120
	ctagctcctc agtatcatta tagtgaaagt tttggctcct cgcgggtgg tttttacct	3180
	ctatttaag gggttttcca cctaaaaatt ctggtatcat tctacttta ctgttactt	3240
	taatttctca taatctttgg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat	3300
	ttattatttg ttaaacattt tcaaaccgca taaaatttta tgaagtccc tctatcttta	3360
25	atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taattttagc gttggtagaa	3420

	agcataatga tttattccta ttcttcttca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa	3480
	ttctttacct taagaaggat ttcccatttt atatttttaa aatatattta tcaaattttt	3540
	ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat	3600
	aatTTTTTTta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgca cacaactagc cattTTTTTt	3660
	tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa	3720
5	caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt	3780
	gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcga gacacatctt ctaaagtaat	3840
	tttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaa tactcaatat tacttctaaa	3900
	aaattaatta gatataatta aatattact tttttaattt taagttaat tgttgaattt	3960
	gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattggtt tatagatagt ttaaagtaaa	4020
	tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg	4080
10	gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttacctt tcttggtatg taagtccgta	4140
	actggaatta ctgtggggtg ccatgacact ctgtggctt ttggttcatg catggatctt	4200
	gcgcaagaaa aagacaaaga acaaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca	4260
	cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgcgtccatg tatgtctaaa	4320
	tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca	4380
	cacacaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct	4440
	cttccgccac ctcaatttct tcaattcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc	4500
15	atgcccnaat ctccatgcat gttccaacca ctttctctt tatataatac ctataaatac	4560
	ctctaatac actcaattct ttcatcatc atccatccag agtactacta ctctactact	4620
	ataatacccc aaccaactc atattcaata ctactctagg taccctgcag ggatccaaca	4680
	atgtctgctc caaccgctga catcagggtt agggctccag aggctaagaa ggttcacatc	4740
	gctgataccg ctatcaacag gcacaattgg tacaagcacg tgaactggct caacgtcttc	4800
	ctcatcatcg gaatcccact ctacggatgc atccaagctt tctgggttcc acttcaactc	4860
20	aagaccgcta tctgggctgt gatctactac ttcttcaccg gacttggaaat caccgctgga	4920
	taccacaggc tttgggctca ctgctcatac tctgctactc ttccacttag gatctggctt	4980
	gctgctggtg gaggaggagc tgttgaggga tctatcagat ggtgggctag ggatcacagg	5040
	gctcatcata ggtacaccga taccgacaag gaccatact ctggttaggaa gggacttctc	5100
	tactctcacc ttggatggat ggtgatgaag cagaacccaa agaggatcgg aaggaccgac	5160
	atctctgatc tcaacgagga cccagttggt gtttggcaac acaggaacta cctcaagggt	5220
25	gtgttcacca tgggacttgc tgttccaatg cttgttgctg gacttggatg gggagatttg	5280

	cttggaggat tcgtgtacgc tggaaatcctt aggatcttct tcgttcaaca agctaccttc	5340
	tgcgtgaact ctcttgcctca ctggcttgga gatcaacat tcgatgatag gaactctcct	5400
	agggatcacg tgatcaccgc tcttgttacc cttggagagg gataccacaa cttccaccac	5460
	gagttcccat ctgactacag gaacgctatc gagtggcacc agtacgatcc taccaagtgg	5520
	tctatctggg cttggaagca acttgattg gcttacgatc tcaagaagtt cagggctaac	5580
5	gagatcgaga agggaagggt tcaacaactt cagaagaagc ttgataggaa gagggctact	5640
	cttgattggg gaaccccaact tgatcaactt ccagtgatgg aatgggatga ctacgttgag	5700
	caagctaaga acggaagggg acttgttgct atcgtctggag ttgttcacga tgttaccgac	5760
	ttcatcaagg atcaccagg aggaaaggct atgatctctt ctggaatcgg aaaggatgct	5820
	accgctatgt tcaacggagg agtgtactac cactctaacg cagctcaca ccttcttagc	5880
	accatgaggg tgggagtgat caggggagga tgcgaggttg agatctggaa gagggctcag	5940
	aaggagaacg ttgagtacgt tagggatgga tctggacaaa gggatgatcag ggctggagag	6000
10	caaccaacca agatcccaga gccaatcca accgctgatg ctgcttgagt agttagctta	6060
	atcacclagg icaccagtat gaactaaaat gcatgtaggt gtaagayct	6109
	<210> 59	
	<211> 6136	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Plásmido pDAB7329	
15	<400> 59	
	cggtcacctc gagtatcaaa atctatctag aaatacacia tattttgttg caggcttgct	60
	ggagaatcga tctgctatca taaaattac aaaaaattt tatttgcctc aattatttta	120
	ggattggtat taaggacgct taaattattt gtcgggtcac tacgcatcat tgtgattgag	180
	aagatcagcg atacgaaata ttcgtagtac tatcgataat ttatttgaaa attcataaga	240
	aaagcaaacg ttacatgaat tgatgaaaca atacaaagac agataaagcc acgcacattt	300
	aggatattgg ccgagattac tgaatattga gtaagatcac ggaatttctg acaggagcat	360
20	gtcttcaatt cagcccaaat ggcagttgaa atactcaaac cgccccatat gcaggagcgg	420
	atcattcatt gtttgtttgg ttgcctttgc caacatggga gtccaagggt ggcgcgccga	480
	cccagctttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat tgcttatcaa tttgttgcaa	540
	cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttgc catccagctg atatccccta	600
	tagtgagtcg tattacatgg tcatagctgt ttctggcag ctctggcccg tgtctcaaaa	660
	tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa tatatcatca tgaacaataa aactgtctgc	720
25	ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat gagccatatt caacgggaaa cgtcagggcc	780

	gcgattaaat lccaacatgg atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt	840
	cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt	900
	tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa	960
	ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga	1020
	tgcatygtta ctccactg cgatccccg aaaaacagca ttccaggtat tagaagaata	1080
5	tcctgattca ggtgaaaata ttgtgatgc gctggcagtg ttctgcgcc ggttgcattc	1140
	gattcctggt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctccaggcga	1200
	atcacgaatg aataacggtt tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc glaattggctg	1260
	gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaactttg ccattctcac cggattcagt	1320
	cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa ccttattttt gacgagggga aattaatagg	1380
	ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccatcctatg	1440
10	gaactgcctc ggtgagtttt ctcttcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatattggtat	1500
	tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaac	1560
	agaattgggt aattggttgt aacactggca gagcattacg ctgacttgac gggacggcgc	1620
	aagctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttacgcgctg ttccactgag cgtcagaccc	1680
	cgtagaaaag atcaaaggat ctcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt	1740
	gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac	1800
15	tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt	1860
	gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtct	1920
	gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgg	1980
	ctcaagacga tagttaccgg ataaggcga gcggctgggc tgaacggggg gttcgtgcac	2040
	acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagcattg	2100
	agaaagcgc acgcttcccg aaggggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcaggg	2160
	cggaacagga gagcgcacga gggagcttc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc	2220
20	tgtegggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg	2280
	gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc	2340
	ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc	2400
	ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag	2460
	cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgsaa accgctctc cccgcgcggt ggccgattca	2520
	ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat	2580
25	taatacgcgt accgctagcc aggaagagtt tgtagaaacg caaaaaggcc atccgctcagg	2640

	atggccttct gcttagtttg atgcctggca gtttatggcg ggcgtcctgc ccgccaccct	2700
	ccgggccggt gcttcacaac gttcaaatcc gctcccggcg gatttgcctt actcaggaga	2760
	gcgttcaccg acaaaacaaca gataaaacga aaggccagc cttccgactg agcctttcgt	2820
	tttatttgat gcctggcagt tccctactct cgcgttaacg ctagcatgga tgttttccca	2880
	gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtct taagctcggg ccccaaataa tgattttatt	2940
5	ttgactgata gtgacctggt cgttgcaaca aattgatgag caatgctttt ttataatgcc	3000
	aactttgtac aaaaaagcag gctccgcggc cgcactaggt ttaaactcta gaagctagga	3060
	attcgcggcc gctttcctgc atgacatcgt cctgcagagc caagcgcagc cttaattaaa	3120
	ctagtctccc agtatcatta tagtgaaagt tttggctctc tcgccggtgg ttttttacct	3180
	ctatttaaaag gggttttcca cctaaaaatt ctggtatcat tctcacttta cttgttactt	3240
	taattttctca taatctttgg ttgaaattat cacgcttccg cacacgatat ccctacaaat	3300
10	ttattatttg ttaaacatth tcaaaccgca taaaatttta tgaagtcccg tctatcttta	3360
	atgtagtcta acattttcat attgaaatat ataatttact taattttagc gttggtagaa	3420
	agcataatga tttattctta ttctttctca tataaatggt taatatacaa tataaacaaa	3480
	ttctttacct taagaaggat ttcccatttt atattttaaa aatatattta tcaaattttt	3540
	ttcaaccacg taaatctcat aataataagt tgtttcaaaa gtaataaaat ttaactccat	3600
	aattttttta ttcgactgat cttaaagcaa caccagtgca cacaactagc catttttttc	3660
	tttgaataaa aaaatccaat tatcattgta ttttttttat acaatgaaaa tttcaccaaa	3720
15	caatgatttg tggattttct gaagcaagtc atgttatgca aaattctata attcccattt	3780
	gacactacgg aagtaactga agatctgctt ttacatgcga gacacatctt ctaaagtaat	3840
	tttaataata gttactatat tcaagatttc atatatcaaa tactcaatat tacttctaaa	3900
	aaattaatta gatataatta aaatattact tttttaattt taagtttaat tgttgaattt	3960
	gtgactattg atttattatt ctactatggt taaattgttt tatagatagt ttaaagtaaa	4020
	tataagtaat gtagtagagt gttagagtgt taccctaaac cataaactat aagatttatg	4080
20	gtggactaat tttcatatat ttcttattgc ttttaccttt tcttggtatg taagtcgta	4140
	actggaatta ctgtgggttg ccatgacact ctgtggtcct ttggttcatg catggatcct	4200
	gcgcaagaaa aagacaaaga acaaagaaaa aagacaaaac agagagacaa aacgcaatca	4260
	cacaaccaac tcaaattagt cactggctga tcaagatcgc cgcgtccatg tatgtctaaa	4320
	tgccatgcaa agcaacacgt gcttaacatg cactttaaat ggctcaccca tctcaacca	4380
	cacacaaaaca cattgccttt ttcttcatca tcaccacaac cacctgtata tattcattct	4440
	cttccgccac ctcaatttct tcaactcaac acacgtcaac ctgcatatgc gtgtcatccc	4500
25	atgcccaaat ctccatgcat gttccaacca ctttctctct tatataatac ctataatac	4560

ctctaataatc actcacttct ttcacatcc atccatccag agtactacta ctctactact 4620
 ataatacccc aaccaactc atattcaata ctactctagg taccctgcag ggatccaaca 4680
 atggccagca gttcttcaag tgtgccagaa cttgccgcag ctttccctga tgggacaacg 4740
 gacttcaaac ccatgaggaa caccaaaggc tatgatgtct ccaaacctca catctctgaa 4800
 acaccgatga ctttgaagaa ctggcacaaa catgtgaact ggctcaacac cacattcatt 4860
 5 ctctttgttc cactggctgg gttgatctca acctattggg ttcctcttca atggaaaact 4920
 gcagtgtggg cagttgtgta ctacttcaac actggacttg ggatcactgc tggctaccat 4980
 agattgtggg cacattcctc ttacaaggcc agcttgccctc tcaaaatcta ccttgccgca 5040
 gttgggtgctg gagccgttga aggttccata agatgggtgga gcaacggaca cagagcacat 5100
 cacagataca cagacacaga gaaagatcct tactcagtga ggaagggatt gctctacagc 5160
 cacatgggtt ggatgctctt gaagcagaat ccaagaagc aaggaggac ggacattact 5220
 10 gatctgaatg aggaccagt tgtggcttgg caacatagga actttctcaa gtgtgtgatc 5280
 ttcattggctt tggcttttcc cacccttgtt gctggcctgg gatggggaga ctactgggga 5340
 ggtttcatct atggagggat cttgagagtg tctttgttc agcaagccac cttctgtgtc 5400
 aactcacttg cacattggct tggatgatcaa ccgtttgatg acagaaactc tccacgtgac 5460
 catgtcataa ctgctcttgt cacgctgggt gaaggctatc acaactttca ccatgagttt 5520
 ccgtcagact atagaaatgc gattgagtgg taccagtatg accccacgaa gtggagcatt 5580
 tggatttggga agcaacttgg acttgctcac aatctcaagc agttcagaca gaatgagata 5640
 15 gagaagggaa gggttcaaca gttgcagaag aactggatc agaagagagc gaaacttgat 5700
 tggggaatac cgttgaaca actccctggt gtgtcttggg atgactttgt tgaacagtca 5760
 aagaatggca aggcatggat tgctgttctt ggtgtcattc acgatgttgg tgacttcac 5820
 aaggatcatc ctgggtggacg tgctctcatc aactctgcca ttggcaaaga tgccacagcg 5880
 atcttcaatg gaggtgtcta caatcattca aatgccgcac acaaccttct ctccaccatg 5940
 agggttgggt tcttccgtgg aggtgctgaa gtggagatat ggaaacgtgc tcaaagtgag 6000
 20 aacaaagatg tctctactgt ggttgatagt tctggcaacc gtattgtgag agctggtgga 6060
 caagctacca aagtggttca gccagtcctt ggtgctcaag cagcttgatg agtagttagc 6120
 ttaatcacct agagct 6136

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

25 <220>
 <223> Plásmido pDAB7319

<400> 60
 ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180
 ttgaaatggc actgttatth caaccatatac tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
 aagtaaataa tagacgccgt tgttaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa cttagaggaa 300
 5 tttgagcgtc agacctaatac aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggcg 360
 taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcatgatag 420
 ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
 caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaaa attgcctttg 540
 gggagacggg aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
 tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
 10 tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
 atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
 atatgcccga catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
 tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa 900
 agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa yaagaagata aggtcgggtga 960
 ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct 1020
 tadcacaaag gaatcttata ccccactact taccctttta ttttttccg tgtcattttt 1080
 15 gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt 1140
 tgggtgaagc tttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt 1200
 gtaggtacca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg 1260
 ccagctacag cagctgatat ggccgcgggt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg 1320
 tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag 1380
 aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgtgt ggctggtatt 1440
 20 gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gactactggt 1500
 tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt 1560
 aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat 1620
 ccatctgta gggtgcatga ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgvcagct 1680
 ggatacaagc atggtggatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca 1740
 gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag 1800
 25 agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgtttaa 1860

	atagttgCGG tgggcaaggC tctctttcag aaagacaggC ggccaaagga acccaaggtg	1920
	aggtgggcta tggctctcag ttccttgtgg aagcgcttgg tctaaggtgc agaggtgta	1980
	gCGggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
	aaagtatgta ttcataccta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100
	gtctttattg tcgccgtatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga ctttctttta	2160
5	atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tggctccgta taggaattga	2220
	agtgtgcttg aggtcggctg ccaccactcc catttcataa ttttacctgt atttgaaaa	2280
	taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga	2340
	aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa	2400
	cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct	2460
	ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg	2520
10	tttaaacgat ctgctctaa ttttcggctc aacttgaca ggaaagacgt cgaccgCGgt	2580
	agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt ctttctgctc gatcgggtcc aatgttctcc	2640
	tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaaaga ctgaaaggaa cgagccgtct	2700
	ataccttgat gatcggcctc tggatgaggg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatagaaag	2760
	gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc	2820
	tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaaag cagttattgg agtgCGgatt ttcggtggca	2880
15	tattattcgc cagcagttag cagacgaaga gaccttcctg aacgtggcca aggccagagt	2940
	taagcagatg ttacgcccctg ctgaggcctt ttctattatc caatagttgg ttgatctttg	3000
	gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt	3060
	gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga	3120
	ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca	3180
	gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggctatc cattcggaat	3240
	gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgttagcaat	3300
20	tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt	3360
	caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa	3420
	aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa	3480
	cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcatcgaac gaataagagt aaatacacct	3540
	tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta	3600
	ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga	3660
25	gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgcga tgcacataga cacacacatc atctcattga	3720

	tgcttggttaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa	3780
	ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta	3840
	ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa	3900
	cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgcgtgtcg aggaattctg	3960
	atctggcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa	4020
5	taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa	4080
	atgtactttc attttataat aacgctgctg acatctacat ttttgaattg aaaaaaaatt	4140
	ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga	4200
	tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac	4260
	ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggtaggca gataatttcc	4320
	attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt	4380
	gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat	4440
10	ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc	4500
	aggtacaatc gagccgacgt tcacgcgyaa cgaccaagca agcttggctg ccatttttgg	4560
	ggtgaggccg ttcgcggccg aggggcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc	4620
	gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcg gctgctgggt cacgcgcaca	4680
	gggycgagcc ctgggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggtaaaaaga	4740
	caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg	4800
15	tggacagccc ctcaaatgtc aataggtgcg ccctcatct gtcagcactc tgccccca	4860
	gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca	4920
	gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt	4980
	tttcgccgat ttgagaggct ggccagctcc acgtcgcgg ccgaaatcga gcctgccctt	5040
	catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgg ccctcaagt gtcaacgtcc gccctcatc	5100
	tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctg	5160
	cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag	5220
20	cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat	5280
	aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatcttt ttcgcacgat	5340
	atacaggatt ttgcaaag gttcgtgtag actttccttg gtgtatcaa cggcgtcagc	5400
	cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttcttcttc actgtcctt	5460
	attcgcacct gggcgtgctc aacgggaatc ctgctctgag aggctggccg gctacccg	5520
	gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaacagg aagggcagcc	5580
25	cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg	5640

cgcccgcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggctac aaaatcacgg 5700
 gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ~~ctgggcccgc~~ 5760
 tgggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cacggcgcgg ttcggtgatg 5820
 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaagggtca 5880
 tgatgggcgt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 5 ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggtaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 gggatgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 tttccgcccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc gcccgcgaa 6300
 10 acctccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacgcggccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt 6420
 ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggctag cgaggccaag 6540
 caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttgttc 6600
 gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660
 15 ctgttcacca cgcgcaaaa gaaaatcccc cgcgaggcgc tgcaaaaaca ggtcattttc 6720
 cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac 6780
 gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg cgagccgatc 6840
 accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac 6900
 acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac 6960
 cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtcg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc 7020
 aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc 7080
 20 gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgcgcccgcg ggcggcagcg 7140
 atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga aaccttccgc 7200
 ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc 7260
 tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggtaaatga tgacctggtg 7320
 cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc agccagcgtc 7380
 ttactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
 25 tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa ttgacaattg 7500

	tgattaaggc	tcagattcga	cggcttggag	cggccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
	gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tgttcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
	aaaagcccat	ggaggcggtc	gctgaacggt	tgcgagatgc	cgtaggcattc	ggcgcctaca	7680
	tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcggctt	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740
	acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agccccgaaca	gcgaggccga	ggggctgccc	7800
5	gtatgctgct	gcgggcggtg	ccggcggggt	tattgctcgt	gatgatcgtc	cgacagattc	7860
	caacgggaat	ctggtggatg	cgcatcttca	tcctcggcgc	acttaataatt	tcgctattct	7920
	ggagcttggt	gtttatttcg	gtctaccgcc	tgccgggccc	ggtagcggcg	acggtaggag	7980
	ctgtgcagcc	gctgatggtc	gtgttcatct	ctgccgctct	gctaggtagc	ccgatacgat	8040
	tgatggcggg	cctgggggct	atgtgcggaa	ctgcccggct	ggcgcgtgtg	gtgttgacac	8100
	caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgctc	cagcgggcct	ggcgggggag	gtttccatgg	8160
	cgttcgggac	cgtagtgacc	cgcaagtggc	aacctcccgt	gcctctgctc	acctttaccg	8220
10	cctggcaact	ggcggcccga	ggacttctgc	tcgctccagt	agcttttagtg	tttgatccgc	8280
	caatcccgat	gcctacagga	accaatgttc	tcggcctggc	gtggctcggc	ctgatcggag	8340
	cgggtttaac	ctacttcctt	tggttccggg	ggatctcggc	actcgaacct	acagttgttt	8400
	ccttactggg	ctttctcagc	ccccgagcgc	ttagtgggaa	ttgtacccc	ttatcgaacc	8460
	gggagcacag	gatgacgcct	aacaattcat	tcaagccgac	accgcttcgc	ggcgcgggct	8520
	aattcaggag	ttaaacaatc	tgaggggagc	ggtgatcggc	gaagtatcga	ctcaactatc	8580
15	agaggtagtt	ggcgtcatcg	agcgcctatc	cgaaccgagc	ttgctggccg	tacatttgta	8640
	cggctccgca	gtggatggcg	gcctgaagcc	acacagtgat	attgatttgc	tggttacggg	8700
	gaccgtaagg	cttgatgaaa	caacgcggcg	agctttgatc	aacgaccttt	tggaaacttc	8760
	ggcttcccct	ggagagagcg	agattctccg	cgctgtagaa	gtcaccattg	ttgtgcacga	8820
	cgacatcatt	ccgtggcggt	atccagctaa	gcgcgaaactg	caatttgag	aatggcagcg	8880
	caatgacatt	cttgcaggta	tcttcgagcc	agccacgatc	gacattgatc	tggctatctt	8940
	gctgacaaaa	gcaagagaac	atagcgttgc	cttggtaggt	ccagcggcgg	aggaactctt	9000
20	tgatccgggt	cctgaacagg	atctatttga	ggcgcctaat	gaaaccttaa	cgctatggaa	9060
	ctcggccccc	gactgggctg	gcgatgagcg	aaatgtagtg	cttacgttgt	cccgcatttg	9120
	gtacagcgca	gtaaccggca	aatcgcgccc	gaaggatgtc	gctgccgact	gggcaatgga	9180
	gcgccctgcc	gcccagtatc	agcccgtcat	acttgaagct	aggcaggctt	atcttggaca	9240
	agaagatcgc	ttggcctcgc	gcgagatca	gttgaagaa	ttgtttcact	acgtgaaagg	9300
	cgagatcacc	aaggtagtcg	gcaaataatg	tctaacaatt	cgttcaagcc	gacgccgctt	9360
25	cgccggcggg	cttaactcaa	gcggttagaga	gctgggggag	actatgcggc	atctgttgaa	9420

ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt cgggtgaaat 9540
 gggctgcaact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
 5 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 aatataatgt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc tctggcatg taatatttcg ttaaataatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatataatc 10080
 10 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattatit 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaatit ttactaacac 10320
 atataatitac ttatcaaaaa tttgacaaaag taagattaaa ataataatitca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 15 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggctc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
 aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaatit acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatitct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaaatcgc atgacttga acaaaagaaa 10800
 gtgatataat tttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 20 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 aaacaaagaa gcgatcgcgc ggccgcatt gtactcccag tatcattata gtgaaagtit 11100
 tggctctctc gccggtggtt tttacctct atttaaagg gttttccacc taaaaatitct 11160
 ggtatcattc tcaatitact tgttacttta atitctcata atctttggtt gaaattatca 11220
 25 cgcttccgca cacgatatcc ctacaaatit attatttgtt aaacatitct aaaccgcata 11280

aaatTTTTatg aagtcccgtc tatctTTaat gtagtctaac atTTTcatat tgaaaTatat 11340
 aattTactta atTTtagcgt tggtagaaag cataatgatt tattctTatt ~~cttctTcata~~ 11400
 taaatgTTta atatacaata taaacaaatt cTTTactta agaaggattt cccattTTat 11460
 atTTTaaaaa tatattTatc aatatTTTt caaccacgta aatctcataa taataagTTg 11520
 tttcaaaagt aataaaattt aactccataa tTTTTtatt cgactgatct taaagcaaca 11580
 5 cccagtgaca caactagcca tTTTTtctt tgaataaaaa aatccaatta tcattgtatt 11640
 tTTTTtatac aatgaaaatt tcaccaaaca atgattTgtg gtattTctga agcaagTcat 11700
 gttatgcaaa attctataat tcccattTga cactacggaa gtaactgaag atctgctTTt 11760
 acatgcgaga cacatctTct aaagtaattt taataatagt tactatattc aagattTcat 11820
 atatcaata ctcaatatta cTTctaaaaa attaattaga tataattaaa atattactTT 11880
 tTTaattTTa agTTtaattg tTgaattTgt gactattgat ttattattct actatgTTta 11940
 aattgTTTta tagatagTTt aaagtaaata taagtaatgt agtagagtgt tagagtGTTa 12000
 10 ccctaaacca taaactataa gatttatggt ggactaattt tcatatattt cttattgctt 12060
 ttacctTTc tTggtatgta agTccgtaac tTgaattact gTgggTtTgc atgacactct 12120
 gTggtctTTt gTtTcatgca tggatgctTg cgcaagaaaa agacaaagaa caaagaaaaa 12180
 agacaaaaca gagagacaaa acgcaatcac acaaccaact caaattagtc actgTctgat 12240
 caagatcgcc gcgtccatgt atgtctaaat gccatgcaaa gcaacacgTg cTTaacatgc 12300
 actTTaaatg gctcaccat ctcaaccac acacaaacac attgcTTTt tctTcatcat 12360
 15 caccacaacc acctgtatat attcattctc tTccgccacc tcaattTctt cactTcaaca 12420
 cacgtcaacc tGcatatgcg tGtcatcca tGcccaatc tccatgcatg tTccaaccac 12480
 cTTctctctt atataatacc tataaatacc tTtaatatca ctcactTctt tcatcatcca 12540
 tccatccaga gtactactac tctactacta taatacccca acccaactca tattcaatac 12600
 tactctagga tccaacaatg tctgctccaa ccgctgacat cagggctagg gctccagagg 12660
 ctaagaaggt tcacatcgct gataccgcta tcaacaggca caattgTtac aagcacgTga 12720
 actgGctcaa cgtcttctc atcatcgga tcccactcta cggatgcatc caagctTTct 12780
 20 gggTtccact tcaactcaag accgctatct gggctgtgat ctactacttc tTcaccggac 12840
 tTggaatcac cgctggatac cacaggcttT gggctcactg ctcaactct gctactcttc 12900
 cacttaggat ctggctTgct gctgtTggag gaggagctgt tgagggatct atcagatggt 12960
 gggctagga tcaacaggct catcataggt acaccgatac cgacaaggac ccatactctg 13020
 ttaggaaggg actTctctac tctcacctTg gatggatggt gatgaagcag aacccaaaga 13080
 ggatcggaag gaccgacatc tctgatctca acgaggaccc agttgtTgtt tggcaacaca 13140
 25 ggaactacct caaggTtTg tTccatggt gactTgctgt tccaatgctt gttgctggac 13200

ttggatgggg agattggcct ggaggattcg tgtacgctgg aatccttagg atcttcttcg 13260
 ttcaacaagc taccttctgc gtgaactctc ttgctcactg gcttggagat caaccattcg 13320
 atgataggaa ctctcctagg gatcacgtga tcaccgctct tgttaccctt ggagagggat 13380
 accacaactt ccaccacgag ttcccatctg actacaggaa cgctatcgag tggcaccagt 13440
 acgatcctac caagtggctt atctgggctt ggaagcaact tggattggct tacgatctca 13500
 5 agaagttcag ggctaacgag atcgagaag ggaagggttca acaacttcag aagaagcttg 13560
 ataggaagag ggctactctt gattggggaa cccacttga tcaacttcca gtgatggaat 13620
 gggatgacta cgttgagcaa gctaagaacg gaaggggact tgttgctatc gctggagttg 13680
 ttcacgatgt taccgacttc atcaaggatc acccaggagg aaaggctatg atctcttctg 13740
 gaatcggaaa ggatgctacc gctatgttca acggaggagt gtactaccac tctaacgcag 13800
 ctcaaacct tcttagcacc atgagggctg gagtgatcag gggaggatgc gaggttgaga 13860
 10 tctggaagag ggctcagaag gagaacgttg agtacgttag ggatggatct ggacaaaggg 13920
 tgatcagggc tggagagcaa ccaaccaaga tcccagagcc aatcccaacc gctgatgctg 13980
 cttgagtagt tagcttaate acctaggta ccagtatgaa ctaaaatgca tgtaggtgta 14040
 agagctcatg gagagcatgg aatattgtat ccgaccatgt aacagtataa taactgagct 14100
 ccactcact tcttctatga ataaacaag gatgttatga tatattaaca ctctatctat 14160
 gcacctatt gttctatgat aaatttctc tlallattat aatcatctg aatcgtgacg 14220
 gcttatggaa tgcttcaaat agtacaaaa caaatgtgta ctataagact ttctaacaa 14280
 15 ttctaacttt agcattgtga acgagacata agtgtaaga agacataaca attataatgg 14340
 aagaagtttg tctccattta tatattatat attaccact tatgtattat attaggatgt 14400
 taaggagaca taacaattat aaagagagaa gtttgtatcc atllatatat tatatactac 14460
 ccatttatat attatactta tccacttatt taatgtcttt ataaggtttg atccatgata 14520
 ttctaatat tttagttgat atgtatatga aaaggtaacta tttgaactct ctactctgt 14580
 ataaaggttg gatcatcctt aaagtgggtc tatttaattt tattgcttct tacagataaa 14640
 20 aaaaaatta tgagttggtt tgataaaata ttgaaggatt taaaataata ataaataata 14700
 aataacatat aatatatgta tataaattta ttataatata acatttatct ataaaaagt 14760
 aatatgtgc ataaatctat acaatcgttt agccttgctg gaacgaatct caattattta 14820
 aacgagagta aacatatttg actttttggt tatttaacaa attattattt aacactatat 14880
 gaaattttt tttttatca gcaagaata aaattaaatt aagaaggaca atggtgtccc 14940
 aatcctata caaccaactt ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca 15000
 25 aaggaaatt ttaatttga gttgtcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta 15060

cacataaacc ttttagcagt agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta 15120
 tttttttatc agcaaagaat aaataaaata aatgagaca cttcagggat ~~gtttcaaccc~~ 15180
 ttatacaaaa ccccaaaaac aagtttccta gcaccctacc aacgaattcg cggccgcttt 15240
 cctgcatgac atcgtcctgc agagccaagc gcatgcttaa ttaaactagt ctcccagtat 15300
 cattatagtg aaagttttgg ctctctcgcc ggtggttttt tacctctatt taaaggggtt 15360
 5 ttccacctaa aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt tctcataatc 15420
 ttgggttgaa attatcacgc ttccgcacac gatatcccta caaatttatt atttggtaaa 15480
 cattttcaaa ccgcataaaa ttttatgaag tcccgtctat ctttaatgta gtctaacatt 15540
 ttcatattga aatatataat ttacttaatt ttagcgttgg tagaaagcat aatgatttat 15600
 tcttattctt cttcatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt taccttaaga 15660
 aggatttccc attttatatt ttaaaaatat atttatcaaa ttttttcaa ccacgtaaat 15720
 10 ctcataataa taagttgttt caaagtaat aaaatttaac tccataattt ttttattcga 15780
 ctgatcttaa agcaacaccc agtgacacaa ctagccattt ttttcttga ataaaaaaat 15840
 ccaattatca ttgtattttt tttatacaat gaaaatttca ccaaacaatg atttgtggta 15900
 tttctgaagc aagtcattgt atgcaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta 15960
 actgaagatc tgcttttaca tgcgagacac atcttctaaa gtaattttaa taatagttac 16020
 tatattcaag atttcatata tcaaaactc aatattactt ctaaaaaatt aattagatat 16080
 aattaaaata ttactttttt aattttaagt ttaattgttg aatttgtgac tattgattta 16140
 15 ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagtttaaa gtaaataaa gtaatgtagt 16200
 agagtgttag agtgttaccc taaaccataa actataagat ttatgggtga ctaattttca 16260
 tatatttctt attgctttta ctttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg 16320
 ggttgccatg aactctgtg gtcttttggg tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac 16380
 aaagaacaaa gaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaa 16440
 ttagtcactg gctgatcaag atcgccgct ccatgtatgt ctaaagcca tgcaaagcaa 16500
 20 cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac aaacacattg 16560
 cttttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc gccacctcaa 16620
 tttcttact tcaacacag tcaacctgca tatgctgtc atcccatgcc caaatctcca 16680
 tgcatttcc aaccacctc tctcttatat aatacctata aatacctcta atatcactca 16740
 cttctttcat catccatcca tccagagtac tactactcta ctactataat accccaacc 16800
 aactcatatt caatactact ctaggtagc tgcagggatc caacaatggc tgcacttgat 16860
 agcatccctg aggacaaagc aactagctcc aagtcaacc acatacagta ccaagaggtc 16920
 25 acgtttagga actggtacaa gaaaatcaac tggctcaaca cgacccttgt tgtcctcatt 16980

cctgctcttg ggttgactt gacgagaacc acacctetca ccagacctac cctcatttgg 17040
 tctgttctct actatttctg tacagcgttt ggcactactg gtggctacca cagacttggg 17100
 tcccataggt cttacagtgc gaggttgcca ttgagactct tcctggcttt cactggagct 17160
 ggtgcatcc aaggttctgc aagatggtgg tcagccaatc atagggcaca tcaccgttgg 17220
 acggacacca tgaaggacc ctactctgtg atgagaggac tgctgttctc ccacataggt 17280
 5 tggatggttc tcaactctga tccaaaggct aaaggcagaa cagatgttctc tgatcttgac 17340
 tctgatcccg tcgttggtg gcaacacaaa cactatggca agtgtttgct ctttgccgct 17400
 tggatcttct cgatgatagt ggctgggctg ggttggggag attggtgggg tggacttgct 17460
 tatgctggca tcatactgct ctgctttggt cagcaagcca cttctgtgt caactcattg 17520
 gcacattgga taggtgaaca accgtttgat gacagacgta ctccaagga tcatgttctg 17580
 actgcttgg tcacaatgg agaaggatac cacaacttcc accatgagtt tccgagtgc 17640
 10 tacagaaatg ccatcattg gtatcagtat gaccctaca agtggctcat ctatctctc 17700
 agcttgggtc ctttccatt ggcctactct ctcaagacct tccgttccaa tgagattgag 17760
 aaaggaaggc ttcagcaaca gcaaaaggct cttgacaaga aaagaagtgg tcttgattgg 17820
 ggacttcctc tcttccagct tccagtgatc tcatgggatg actttcaagc tcgttgcaaa 17880
 gaaagtggag agatgcttgt tgctgttctg ggagtgatcc atgatgtctc ccagttcatt 17940
 gaagatcatc ctggtgggag gaggctcatt agaagtgtg ttgggaaaga tgggactggc 18000
 atgttcaatg gtggagtgta tgaacattca aacgccgcac acaacttctg gagcacaatg 18060
 15 agagtgggag tcttgagagg tggacaagaa gtggagggtt ggaagaaaca gagggtgat 18120
 gttcttggga agtcagacat tcttctgcaa gtgacaaggg tggagcgtct ggtggaagga 18180
 gctgttgag cgatgatgag agttagctta atcacctaga gctcggctac ctcgagtatc 18240
 aaaatctatt tagaaataca caatatttgg ttgcaggctt gctggagaat cgatctgcta 18300
 tcataaaaat tacaaaaaaa ttttatttgc ctcaattatt ttaggattgg tattaaggac 18360
 gcttaaatta tttgtcgggt cactacgcat cattgtgatt gagaagatca gcgatacgaa 18420
 20 atattcgtag tactatcgat aatttatttg aaaattcata agaaaagcaa acgttacatg 18480
 aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa gccacgcaca tttaggatat tggccgagat 18540
 tactgaatat tgagtaagat cacggaattt ctgacaggag catgtcttca attcagccca 18600
 aatggcagtt gaaatactca aaccgccccca tatgcaggag cggatcattc attgtttggt 18660
 tggttgcctt tgccaacatg ggagtccaag gttggcgcgc cgaccagct ttc 18713

25 <210> 61
 <211> 14524
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Plásmido pDAB7321

<400> 61

	ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt	60
	ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat	120
5	gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta	180
	ttgaaatggc actgttatth caaccatata tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag	240
	aagtaaataa tagacgccgt tgttaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa	300
	tttgagcgtc agacctaatac aatattaca aatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg	360
	taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcattgatag	420
	ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga	480
10	caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaca attgcctttg	540
	gggagacggt aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc	600
	tctggtagta cactttctta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact	660
	tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga	720
	atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca	780
	atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aatgaagaa tgtacagata caagatccta	840
	tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa	900
15	agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcggatga	960
	ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	1020
	tatcaciaaag gaatcttata cccactact tatcctttta tatttttccg tgcattttt	1080
	gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	1140
	tggtgtaagc tattttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt	1200
	gtaggtacca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg	1260
20	ccagctacag cagctgatat ggccgcgggt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg	1320
	tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag	1380
	aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgttg ggctggtatt	1440
	gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactgtt	1500
	tacgtgtcac ataggatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt	1560
	aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat	1620
	ccatctgtta ggttgcattg ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct	1680
25	ggatacaagc atggtggatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca	1740

	gctcctccaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag	1800
	agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa	1860
	atagttgcgg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg	1920
	aggtgggcta tggctctcag ttccttgtag aagcgcttgg tctaagggtgc agagggtgta	1980
	gcgggatgaa gcaaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
5	aaagtatgta ttcactacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100
	gtctttattg tcgccgtatg taatcggcgt cacaaaataa tccccgggta ctttctttta	2160
	atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tgggccgtta taggaattga	2220
	agtgtgcttg aggtcggtcg ccaccactcc catttcataa ttttacatgt atttgaaaaa	2280
	taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga	2340
	aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa	2400
10	cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct	2460
	ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg	2520
	tttaaacgat ctgctgctaa ttttcgggcc aacttgcaca ggaaagacgt cgaccgcggt	2580
	agctcttgcc cagcagactg ggcttcagct cctttcgtc gatcgggtcc aatgttgtcc	2640
	tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtgaagaa ctgaaaggaa cgagccgtct	2700
	ataccttgat gatcggcctc tggggaaggg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag	2760
15	gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc	2820
	tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgcggtt ttcggtggca	2880
	tattattcgc cacgagttag cagacgaaga gaccttcag aacgtggcca aggccagagt	2940
	taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg	3000
	gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt	3060
	gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga	3120
	ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca	3180
20	gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggatc ctttcggaat	3240
	gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat	3300
	tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt	3360
	caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa	3420
	aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa	3480
	cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaac gaataagagt aaatacacct	3540
25	ttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta	3600

	ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa	3720
	gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga	3780
	tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa	3840
	ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta	3900
5	ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa	3960
	cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg	4020
	atctggcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa	4080
	taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa	4140
	atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt	4200
	ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga	4260
	tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgcccgtgc cgctttgcac	4320
10	ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc	4380
	attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt	4440
	gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgcgagaga agcagtcgat	4500
	ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc	4560
	aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtcg ccatttttgg	4620
	ggtgaggccg ttcgcgcccg aggggvcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcttagc	4680
	gggvcgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcggt cgtgcgcggt cacgcgcaca	4740
15	gggvcgagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggtaaaaaga	4800
	caggttagcg gtggccgaaa aacgggvcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg	4860
	tggacagccc ctcaaatgtc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccccaa	4920
	gtgtcaagga tcgvcgcccct catctgtcag tagtcvcgcc cctcaagtgt caataccgca	4980
	gggcacttat ccccagcctt gtccacatca tctgtgggaa actvcgctaa aatcagvcgt	5040
	tttcgvcgat ttgvcagvcgt ggccagvcct acgvcgvcgg ccgaaatcga gcctgcccct	5100
20	catctgtcaa cvccvcgvcgt ggtgagvcgt cccctcaagt gtcaacvcct gccctcatc	5160
	tgvcagvcgt ggccaagttt tccvcgagvcgt atccacaacv ccggvcgvcgt cvgtgtctcv	5220
	cacacvcgctt cvagvcgvcgt tctgvcgvcgt ttgvcagvcgt atagvcgvcgt gccagvcct	5280
	cvvcgagvcgt aaccagvcct gtgagvcgt gaaagvcgt acgvccttt tccvcgtvc	5340
	aaccctvcct cvgggtcatt atagvcgatt tttvcggtata tccatccttt ttcvcagvc	5400
	atacagvcgt ttgcvaaagv gttvcgtvcgt actttccttg gtvatccaa cvvcgtvc	5460
	cvvcgagvcgt aggtgaagta gvcvcagvcgt cvagvcgvcgt ttccttcttc actvcctt	5520
25	atvcgvcct gvcggtvcct aacvcgvcct ctvcctvcgt agvcgvcgt gctaccvcgt	

	gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaccagg aagggcggc	
	cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aagggcggc	5640
	cgccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggctac aaaatcacgg	5700
	gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggccgcc	5760
	tggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgaccgcg cacggcgcgg ttcgggtgatg	5820
5	ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggtca	5880
	tgatggcgt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg	5940
	ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg	6000
	gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg	6060
	gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc	6120
	gggtcaaatc aggaataagg gcacattgcc cggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga	6180
10	gggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg	6240
	ttttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc gccccgcgaa	6300
	accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc	6360
	gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt	6420
	ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg	6480
	acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag	6540
15	caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct ttcctgttc	6600
	gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc	6660
	ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgagggcg tgcaaaacaa ggteattttc	6720
	cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac	6780
	gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg cgagccgatc	6840
	accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac	6900
	acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac	6960
20	cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc	7020
	aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct gtttgctggc	7080
	gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac ggcccgacgg	7140
	atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtacccgc tcaagctgga aaccttccgc	7200
	ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc	7260
	tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggtaaatga tgacctggtg	7320
25	cattgcaaac gctagggcct tgtggggctca gttccggctg ggggttcagc agccagcgt	7380

	ttactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc 7440
	tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaa ttgacaattg 7500
	tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggattc cgcgagatcc 7560
	gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag cacgaggaga 7620
	aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggcgcctaca 7680
5	tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctt tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc 7740
	acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcgcgg 7800
	gtatgctgct gcggcggtg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc 7860
	caacgggaat ctggtgatg cgcatttca tcctcggcg acttaattt tcgctattct 7920
	ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggcggg ggtcgcggcg acggtaggcg 7980
	ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc ccgatacgat 8040
10	tgatggcggt cctgggggct atttgcggaa ctgcggcggt ggcgctgttg gtgttgacac 8100
	caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg gtttccatgg 8160
	cyttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc acctttaccg 8220
	cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg tttgatccgc 8280
	caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag 8340
	cgggttaaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt 8400
	ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc 8460
15	gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggtt 8520
	aattcaggag ttaaacaatca tgagggagc ggtgatcgc gaagtatcga ctcaactatc 8580
	agaggtagtt ggcgtcatcg agcgcctct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta 8640
	cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggg 8700
	gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgacctt tggaaacttc 8760
	ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga 8820
20	cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaaactg caatttgag aatggcagcg 8880
	caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt 8940
	gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcg aggaactctt 9000
	tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaacctta cgctatggaa 9060
	ctcgcgcc gactgggtg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg 9120
	gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgct gctgccgact gggcaatgga 9180
	gcyctgccc gccagtatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttgaca 9240
25	agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg 9300

cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgctgctt 9360
 cgcggcgcgg cttactcaa gcgtagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttga 9420
 ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttcccattcc gcgctcaaga 9480
 tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat 9540
 gggctgcaact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 5 caaattacaa cggatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggcccga 9660
 tagtttga 9720
 caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 aatatatagt tttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaataatga agtgctccat 9960
 10 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
 15 atatatattac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtc atttgcacc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgc aatattcctgg aaattttgca 10560
 aatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 20 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaatacgca atgacttggga acaaaagaaa 10800
 gtgatatatt ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctcctc tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgcc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcggccgctt tctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcagctta attaaactag 11100
 25 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctat 11160

ttaaaggggt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg cttccgcaca cgatatccct acaaattcat ~~11280~~
 tatttgttaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaacat tttcatattg aatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata aacaaattct 11460
 5 ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaaata tatttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgacaca actagccatt tttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
 gatttggtgg atttctgaag caagtcattg tatgcaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
 ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
 10 ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
 taattagata taattaaaat attacttttt taattttaag ttaattggt gaatttggtga 11940
 ctattgattt attattctac tatgttttaa ttgttttata gatagttaa agtaaata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatggtgg 12060
 actaattttc atatatttct tattgctttt accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcattgcatg gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaaca agaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 15 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgccgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
 atgcaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggt caccatctc aaccacaca 12360
 caaacacatt gcctttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
 cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgcgtgt catcccatgc 12480
 ccaaactccc atgcatgttc caaccacctt ctctttata taatacctat aaatacctct 12540
 aatatcactc acttctttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
 taccceaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgcagggat ccaacaatgg 12660
 20 ctgcacttga tagcatccct gaggacaaag caactagctc caagtcaacc cacatacagt 12720
 accaagaggt cacgtttagg aactggtaca agaaaatcaa ctggctcaac acgacccttg 12780
 ttgtcctcat tctgctctt gggtgtact tgacgagaac cacacctctc accagacctc 12840
 cctcatttg gtctgttctc tactatttct gtacagcgtt tggcatcact ggtggctacc 12900
 acagactttg gtccataggt tcttacagtg cgaggttgcc attgagactc ttctggctt 12960
 tcaactggagc tggtgcatc caaggttctg caagatggtg gtcagccaat catagggcac 13020
 25 atcacctgtg gacggacacc atgaaggacc cctactctgt gatgagagga ctgctgttct 13080

cccacatagg ttggatgggt ctcaactctg atccaaaggt caaaggcaga acagatgttt 13140
 ctgatcttga ctctgatccc gtcgttgtgt ggcaacacaa acactatggc aagtgtttgc 13200
 tctttgccgc ttggatcttt ccgatgatag tggctgggct gggttgggga gattgggtggg 13260
 gtggacttgt ctatgctggc atcatacgtg cctgctttgt tcagcaagcc actttctgtg 13320
 tcaactcatt ggcacattgg ataggtgaac aaccgtttga tgacagacgt actccaaggg 13380
 5 atcatgttct gactgcgttg gtcacaatgg gagaaggata ccacaacttc caccatgagt 13440
 ttccgagtga ctacagaaat gccatcattt ggtatcagta tgaccctaca aagtggctca 13500
 tctatctctt cagcttgggt cccttcccat tggcctactc tctcaagacc ttccgttcca 13560
 atgagattga gaaaggaagg cttcagcaac agcaaaaggc tcttgacaag aaaagaagtg 13620
 gtcttgattg gggacttcct ctcttcagc ttccagtgat ctcatgggat gactttcaag 13680
 ctcggtgcaa agaaagtgga gagatgcttg ttgctgttgc tggagtgatc catgatgtct 13740
 10 cccagttcat tgaagatcat cctgggtggga ggagcctcat tagaagtgct gttgggaaag 13800
 atgggactgg catgttcaat ggtggagtgt atgaacattc aaacgccgca cacaacttgc 13860
 tgagcacaat gagagttgga gtcttgagag gtggacaaga agtggagggtt tggaagaaac 13920
 agaggggtgga tgttcttggg aagtcagaca ttcttcgtca agtgacaagg gtggagcgtc 13980
 tgggtggaagg agctgttgca gcgtgatgag tagttagctt aatcacctag agctcgggtca 14040
 cctcagatcat caaaatctat llagaaatac acaatatttt gttgcaggct tgctggagaa 14100
 tcgatctgct atcataaaaa ttacaaaaaa attttatttg cctcaattat tttaggattg 14160
 15 gtattaagga cgcttaaatt atttgtcggg tcaactacgca tcattgtgat tgagaagatc 14220
 agcgatacga aatattcgta gtactatcga taatttattt gaaaattcat aagaaaagca 14280
 aacgttacat gaattgatga aacaatacaa agacagataa agccacgcac atttaggata 14340
 ttggccgaga ttactgaata ttgagtaaga tcacggaatt tctgacagga gcatgtcttc 14400
 aattcagccc aaatggcagt tgaaatactc aaaccgcccc atatgcagga gcggatcatt 14460
 cattgtttgt ttggttgctt ttgccaacat gggagtccaa ggttggcgcg ccgaccaccg 14520
 20 tttc 14524

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

<220>
 <223> Plásmido pDA87324

<400> 62
 25 ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60

	ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat	120
	gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaaa atattaactg tcgcatttta	180
	ttgaaatggc actgttattt caaccatattc ttgtattctg ttacatgaca cgactgcaag	240
	aagtaaataa tagacgccgt tgtaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa	300
	tttgagcgtc agacctaate aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatgggtg	360
5	taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcattgatag	420
	ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aaggggtgccc tcgttagtga	480
	caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaacaa attgcctttg	540
	gggagacggg aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc	600
	tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact	660
	tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga	720
10	atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca	780
	atatgcggca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta	840
	tactgccaga atacgaagaa gaatacytag aaattgaaaa agaagaacca ggcyaagaaa	900
	agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga	960
	ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	1020
	tatcacaaag gaatcttacc cccactact taccctttta ttttttccg tgtcattttt	1080
	gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gtccggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	1140
15	tggtgtaagc tttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt	1200
	gtaggtagca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg	1260
	ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg	1320
	tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag	1380
	aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgttg ggctggattt	1440
	gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gactactgtt	1500
20	tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt	1560
	aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat	1620
	ccatctgtta ggttgcataa ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct	1680
	ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca	1740
	gctcctccaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag	1800
	agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa	1860
	atagttgctg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg	1920
25	aggtgggcta tggctctcag ttccttggg aagcgtttgg tctaaggtgc agaggtgta	1980

	gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
	aaagtatgta ttcataccta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100
	gtctttattg tgcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga ctttctttta	2160
	atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tggccggtta taggaattga	2220
5	agtgtgcttg aggtcggctg ccaccactcc catttcataa ttttacatgt atttgaaaaa	2280
	taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga	2340
	aatatagttt aatatattat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa	2400
	cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct	2460
	ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg	2520
	tttaaacgat ctgcgctctaa ttttcggtcc aacttgcaca ggaaagacgt cgaccgcggt	2580
	agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cttttcgctc gatcgggtcc aatgttgtcc	2640
10	tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaaaga ctgaaaggaa cgagccgtct	2700
	ataccttgat gatcggcctc tggatgaagg tatcatcgca gccaaagcaag ctcataaaag	2760
	gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc	2820
	tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgccgatt ttcgttggca	2880
	tattattcgc cacgagttag cagacgaaga gaccttcag aacgtggcca aggccagagt	2940
	taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ttgatctttg	3000
15	gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatgtt	3060
	gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga	3120
	ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca	3180
	gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggtcatc cattcggaa	3240
	gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgtagcaat	3300
	tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt	3360
20	caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa	3420
	aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa	3480
	cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaac gaataagagt aaatacacct	3540
	tttttaacat tacaataag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta	3600
	ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga	3660
	gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga	3720
	tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcaactcga aatcagccaa	3780
25	ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta	3840

	ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa	3900
	cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgcgtgctg aggaattctg	3960
	atctggcccc catttgacg tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa	4020
	taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa	4080
	atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt	4140
5	ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga	4200
	tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac	4260
	ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc	4320
	attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt	4380
	gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgcgagaga agcagtcgat	4440
	ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc	4500
10	aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtc ccatTTTTGG	4560
	ggtgaggccg ttcgcggccg aggggcgag cccctggggg gatgggagc ccgcgttagc	4620
	gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcg cgtgcgcggt cacgcgcaca	4680
	gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga	4740
	caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg	4800
	tggacagccc ctcaaatgtc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgccccca	4860
	gtgtcaagga tcgcgccctt catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca	4920
15	gggcacttat ccccaggett gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt	4980
	tttcgccgat ttgagaggct ggccagctcc acgtgcgccg ccgaaatcga gctgccccct	5040
	catctgtcaa cgccgcgccg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcctc	5100
	tgctagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctg	5160
	cacacggctt cgacggcggt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag	5220
	cggcgagggc aaccagcccc gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat	5280
20	aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcgggata tccatccttt ttcgcacgat	5340
	atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc	5400
	cgggcaggat aggtgaagta ggcccaccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt	5460
	attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccg	5520
	gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaaccagg aagggcagcc	5580
	cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg	5640
	cgcccgcat gagcctgctg gcctacctgc tggccgctcg ccagggctac aaaatcacgg	5700
25	gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcat caatggcgac ctgggccgcc	5760

	tgggcggcct	gctgaaactc	tggetcaccg	acgacccgcg	cacggcgcg	ttcggtgatg	5820
	ccacgatcct	cgccctgctg	gcgaagatcg	aagagaagca	ggacgagctt	ggcaagggtca	5880
	tgatgggctg	ggtccgcccc	agggcagagc	catgacittt	ttagccgcta	aaacggcccg	5940
	ggggtgctcg	tgattgccaa	gcacgtcccc	atgcgctcca	tcaagaagag	cgacttcgcg	6000
	gagctggtat	tcgtgcaggg	caagattcgg	aataccaagt	acgagaagga	cggccagacg	6060
5	gtctacggga	ccgacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacaccaa	ggcaccaggc	6120
	gggtcaaadc	aggaataagg	gcacattgcc	ccggcgtgag	tcggggcaat	cccgaagga	6180
	gggtgaatga	atcggacgtt	tgaccggaag	gcatacaggc	aagaactgat	cgacgcgggg	6240
	ttttccgccc	aggatgccga	aaccatcgca	agccgcaccg	tcatgctgct	gccccgcgaa	6300
	accttccagt	ccgtcggctc	gatggctccg	caagctacgg	ccaagatcga	gcgcgacagc	6360
	gtgcaactyg	ctccccctgc	cctgcccgcg	ccatcggccg	ccgtggagcg	ttcgcgtcgt	6420
10	ctcgaacagg	agcgggcagg	tttggcgaag	tcgatgacca	tcgacacgcg	aggaactatg	6480
	acgaccaaga	agcgaaaaac	cgccggcgag	gacctggcaa	aacagggtcag	cgaggccaag	6540
	caggccgctg	tgctgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aaatgcagct	ttccttgttc	6600
	gatattgctc	cgtggccgga	cacgatgcya	gcgatgccaa	acgacacggc	ccgctctgcc	6660
	ctgttcacca	cgcgcaacaa	gaaaatcccg	cgcgaggcgc	tgcaaaacaa	ggtcattttc	6720
	cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgtcg	agctgcgggc	cgacgatgac	6780
15	gaactygtgt	gycagcaggt	gttggagtac	gcyaagcgc	cccctatcgg	cgagccgatc	6840
	accttcacgt	tctacgagct	ttgccaggac	ctgggctygt	cgatcaatgg	ccggtattac	6900
	acgaaygccg	aggaatgcct	gtcgcgccta	caggcgacgg	cgatgggctt	cacgtccgac	6960
	cycgttgggc	acctggaatc	ggtgtcgcct	ctgcaccgct	tccgcgtcct	ggaccgtggc	7020
	aagaaaacgt	cccgttgcca	ggtcctgata	gacgaggaag	tcgtcgtgct	gtttgctggc	7080
	gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tgctgcggac	ggcccgacgg	7140
	atgttcgact	atticagctc	gcaccgggag	ccgtacccgc	tcaagctyga	aaccttccgc	7200
20	ctcatygtcg	gatcgattc	caccgcgctg	aagaagtggc	gcgagcaggt	cygcgaagcc	7260
	tgcaagagt	tgcyaggcag	cgccctggty	gaacacgcct	gggtcaatga	tyacctggtg	7320
	cattgcaaac	gctagggcct	tgtggggtca	gttccgcty	ggggttcagc	agccagcgtc	7380
	ttactggcat	ttcaggaaca	agcgggcact	gctcgacgca	cttgcttcgc	tcagtatcgc	7440
	tcgggacgca	cygcgcgctc	tacgaactgc	cgataaacag	aggattaaaa	ttgacaattg	7500
	tgattaaygc	tcagattcga	cggcttygag	cygccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
25	gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tgttcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620

	aaaagcccat ggagggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggcgcctaca	7680
	tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctt tcaaacagga ggacggcctc aaggacgctc	7740
	acaagggcga tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcgccg	7800
	gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc	7860
	caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaattt tgcctattct	7920
5	ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcgcggcg acggtaggag	7980
	ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatct ctgccgtct gctaggtagc ccgatacgat	8040
	tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcccggcgt ggcgctgttg gtgttgacac	8100
	caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcgggggag gtttccatgg	8160
	cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc acctttaccg	8220
	cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg tttgatccgc	8280
10	caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag	8340
	cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt	8400
	ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc	8460
	gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgaggctt	8520
	aattcaggag ttaaacatca tgagggaaagc ggtgatcgcc gaagtatcga ctcaactatc	8580
	agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
	cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggc	8700
15	gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	8760
	ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
	cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttggag aatggcagcg	8880
	caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgacg gacattgatc tggctatctt	8940
	gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt	9000
	tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
20	ctcggccccc gactgggctg gcgatgagcg aatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
	gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
	gcgctgccc gcccagtatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca	9240
	agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttcaact acgtgaaagg	9300
	cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt	9360
	cgcgggcggg cttaactcaa gcgtagaga gctggggaag actatgcycg atctgttgaa	9420
	ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttcccattcc gcgctcaaga	9480
25	tggttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat	9540

gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct 9600
 caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaaagt ~~taggeecgaa~~ 9660
 tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaatcgcct ctagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 5 aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaataatga agtgctccat 9960
 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattatct 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 10 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
 atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggcc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
 aatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 15 tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaatacgca atgacttggga acaaaagaaa 10800
 gtgatataat tttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 20 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgccgca ctaggtttta actctagaag ctaggaattc 11040
 aaacaaagaa gcgatcgcgc ggccgccatt gtactcccag tatcattata gtgaaagttt 11100
 tggctctctc gccggtggtt ttttacctct atttaaaggg gttttccacc taaaaattct 11160
 ggtatcattc tcactttact tgttacttta atttctcata atctttggtt gaaattatca 11220
 cgcttccgca cacgatatcc ctacaaattt attatttggt aaacattttc aaaccgcata 11280
 aaattttatg aagtcccgtc tatctttaat gtagtctaac attttcatat tgaatatat 11340
 25 aatttactta attttagcgt tggtagaaag cataatgatt tattcttatt cttcttcata 11400

	taa	at	taa	ctt	aga	ccc	11460
	at	tat	aa	ca	aat	ta	11520
	ttt	aata	aact	ttt	cg	taa	11580
	ccc	ca	ttt	tga	aat	tc	11640
	ttt	aat	tc	at	gt	ag	11700
5	gt	att	tcc	ca	gta	at	11760
	aca	ca	aa	ta	ta	aa	11820
	ata	ct	ctt	ata	ta	at	11880
	ttt	agt	ttg	gac	tt	act	11940
	aatt	tag	aa	ta	ag	tag	12000
	cc	taa	gat	gg	ta	ct	12060
	tt	ac	ttt	tg	ga	at	12120
10	gt	gg	tca	tgg	ca	aga	12180
	aga	ca	ac	ca	ca	ac	12240
	ca	gat	gc	at	gc	ca	12300
	act	taa	gat	ca	ca	ca	12360
	ca	ca	ac	ca	ca	ca	12420
	ca	gc	at	gc	ca	ca	12480
15	ctt	ct	ata	tata	tca	ct	12540
	tcc	at	gt	ta	ac	ta	12600
	tac	ct	ta	ca	ca	ca	12660
	cta	aga	gc	ta	ca	ca	12720
	act	gg	ct	ca	ca	ca	12780
	gg	tt	ca	ac	ca	ca	12840
	tt	ga	at	ca	ca	ca	12900
20	ca	ct	ta	gg	ca	ca	12960
	gg	g	ta	ca	ca	ca	13020
	tt	ga	aa	ca	ca	ca	13080
	gg	at	ca	ca	ca	ca	13140
	gga	act	ca	ca	ca	ca	13200
	tt	ga	gg	ca	ca	ca	13260
25	tt	ca	ca	ca	ca	ca	13320

atgataggaa ctctcctagg gatcacgtga tcaccgctct tgttaccctt ggagagggat 13380
accacaactt ccaccacgag ttcccatctg actacaggaa cgctatcgag ~~tggeaccagt~~ 13440
acgatcctac caagtggctt atctgggctt ggaagcaact tggattggct tacgatctca 13500
agaagtccag ggctaacgag atcgagaagg gaagggttca acaacttcag aagaagcttg 13560
ataggaagag ggctactctt gattggggaa cccacttga tcaacttcca gtgatggaat 13620
5 gggatgacta cgttgagcaa gctaagaacg gaaggggact tgttgctatc gctggagttg 13680
ttcacgatgt taccgacttc atcaaggatc acccaggagg aaaggctatg atctcttctg 13740
gaatcggaaa ggatgctacc gctatgttca acggaggagt gtactaccac tctaacgcag 13800
ctcacaacct tcttagcacc atgaggggtg gagtgatcag gggaggatgc gaggttgaga 13860
tctggaagag ggctcagaag gagaacgttg agtacgttag ggatggatct ggacaaaggg 13920
tgatcagggc tggagagcaa ccaaccaaga tcccagagcc aatcccaacc gctgatgctg 13980
10 cttgagtagt tagcttaatc acctaggtca ccagtatgaa ctaaaatgca tgtaggtgta 14040
agagctcatg gagagcatgg aatattgtat ccgaccatgt aacagtataa taactgagct 14100
ccatctcact tcttctatga ataaacaaag gatgttatga tatattaaca ctctatctat 14160
gcaccttatt gttctatgat aaatttcctc ttattattat aatcatctg aatcgtgacg 14220
gcttatggaa tgcttcaaat agtacaaaaa caaatgtgta ctataagact ttctaaacaa 14280
ttctaacttt agcattgtga acgagacata agtgtaaga agacataaca attataatgg 14340
15 aagaagtttg tctccattta tatattatat attaccact tatgtattat attaggatgt 14400
taaggagaca taacaattat aaagagagaa gtttgatcc atttatatat tatatactac 14460
ccatttatat attatactta tccacttatt taatgtcttt ataaggtttg atccatgata 14520
tttctaatat tttagttgat atgtatatga aaaggtaacta tttgaactct cttactctgt 14580
ataaaggttg gatcatcctt aaagtgggtc tatttaattt tattgcttct tacagataaa 14640
aaaaaaatta tgagttgggt tgataaaata ttgaaggatt taaaataata ataaataata 14700
aataacatat aatatatgta tataaattta ttataatata acatttatct ataaaaagt 14760
20 aatattgtc ataaatctat acaatcgttt agccttgctg gaacgaatct caattattta 14820
aacgagagta aacatatttg actttttggt tatttaacaa attattattt aacactatat 14880
gaaatTTTTT ttttttatca gcaaagaata aaattaaatt aagaaggaca atggtgtccc 14940
aatccttata caaccaactt ccacaagaaa gtcaagtcag agacaacaaa aaaacaagca 15000
aaggaaattt ttttaatttg gttgtcttgt ttgctgcata atttatgcag taaaacacta 15060
cacataacc ttttagcagt agagcaatgg ttgaccgtgt gcttagcttc ttttatttta 15120
25 ttttttatc agcaaagaat aaataaaata aatgagaca cttcagggat gtttcaacc 15180

	ttatacaaaa ccccaaaaac aagtttcccta gcaccctacc aacgaattcg cggccgcttt	15240
	cctgcatgac atcgtcctgc agagccaagc gcatgcttaa ttaaactagt ctcccagtat	15300
	cattatagtg aaagttttgg ctctctcgcc ggtgggtttt tacctctatt taaaggggtt	15360
	ttccacctaa aaattctggt atcattctca ctttacttgt tactttaatt tctcataatc	15420
	tttggttgaa attatcacgc ttccgcacac gatatcccta caaatttatt atttgttaaa	15480
5	cattttcaaa ccgcataaaa ttttatgaag tcccgtctat ctttaatgta gtctaacatt	15540
	ttcatattga aatatataat ttacttaatt ttagcgttgg tagaaagcat aatgatttat	15600
	tcttattctt ctcatataa atgtttaata tacaatataa acaaattctt taccttaaga	15660
	aggatttccc attttatatt ttaaaaaatat atttatcaaa tatttttcaa ccacgtaaat	15720
	ctcataataa taagttgttt caaaagtaat aaaatttaac tcataattt ttttattcga	15780
	ctgatcttaa agcaacacc agtgacacaa ctagccattt ttttctttga ataaaaaat	15840
10	ccaattatca ttgtattttt tttatacaat gaaaatttca ccaacaatg atttggtgta	15900
	tttctgaagc aagtcattgtt atgcaaaaatt ctataattcc catttgacac tacggaagta	15960
	actgaagaic tgccttttaca tgcgagacac atcttctiaaa gtaaltttaa taatagttac	16020
	tatattcaag atttcatata tcaaatactc aatattactt ctaaaaaatt aattagatat	16080
	aattaaata ttactttttt aattttaagt ttaattggtg aatttgtgac tattgattta	16140
	ttattctact atgtttaaat tgttttatag atagtttaaa gtaaataata gtaatgtagt	16200
	agagtgttag agtgttacc taaaccataa actataagat ttatggtgga ctaattttca	16260
15	tatatttctt attgctttta ccttttcttg gtatgtaagt ccgtaactgg aattactgtg	16320
	ggttgccatg aactctgtg gtcttttgg tcatgcatgg atcttgcgca agaaaaagac	16380
	aaagaacaaa gaaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa ccaactcaaa	16440
	ttagtcactg gctgatcaag atcgccgct ccatgtatgt ctaaatgcca tgcaaagcaa	16500
	cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac aaacacattg	16560
	cctttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctcttcc gccacctcaa	16620
20	tttcttcact tcaacacacg tcaacctgca tatgctgtc atcccatgcc caaatctcca	16680
	tgcatgttcc aaccaccttc tctcttatat aatacctata aatacctcta atatcactca	16740
	cttctttcat catccatcca tccagagtac tactactcta ctactataat accccaaccc	16800
	aactcatatt caatactact ctaggtaccc tgcagggatc caacaatggc tccaacatt	16860
	tctgaggatg tcaatggtgt tctttttgag tcagatgctg caaccctga tttggctctt	16920
	tccacaccac ctgtgcaaaa agctgacaac agacccaagc aacttgtgtg gaggaacatt	16980
	ttgcttttctg cttacttgca cctcgcagct ctctacggag gctatttgtt tctcttcagt	17040
25	gcaaaaatggc agaccgacat tttcgcttac attctttatg tcatctctgg actggggata	17100



actgctgggg cacatagact ctgggctcac aagtcataca aagccaagtg gccactcaga 17160
 gttatactgg tcatcttcaa cacggttgcc tttcaagacg ~~ctgetatgga ttgggctcgt 17220~~
 gaccatagaa tgcatacacia gtacagcgag accgacgcgg acccacacaa tgcaacgaga 17280
 ggtttcttct tctctcacat tggctggctt cttgttagga aacatcctga tctgaaagaa 17340
 aaaggaagg gactcgacat gagtgatctc cttgctgac caatactccg ttttcagaag 17400
 5 aagtactatc tgatcctcat gcctctggcc tgttttgtga tgccaaccgt tatcccggtt 17460
 tacttttggg gagaaacttg gacaaatgct tcttctgtgg cagccatggt ccgttatgct 17520
 ttcacctga atgttacctg gttggtgaac tctgccgcac acaagtgggg agacaaacct 17580
 tatgacaagt ccatcaagcc ttccgaaaac ctttcagttg cgatgtttgc tttgggagaa 17640
 ggatttcaca attaccatca cacttttccg tgggactaca agacagcaga gcttggaaac 17700
 aacaagttga acttcacaac aacgttcatc aatttctttg cgaaaatcgg ttgggcctat 17760
 10 gatttgaaga ctgtgagtga tgacattgtc aagaacaggg tcaagagaac tggcagatga 17820
 agccatcatc tctggggctg gggatgatgag aatcagagca aagaagagat agatgcagcc 17880
 attaggatca accctaaaga cgattgagta gttagcttaa tcacctagag ctcggtcacc 17940
 tcgagtatca aatctattt agaaatacac aatattttgt tgcaggcttg ctggagaatc 18000
 gatctgctat cataaaaatt acaaaaaaat tttatttgcc tcaattattt taggattggt 18060
 attaaggacg cttaaattat ttgtcgggtc actacgcac attgtgattg agaagatcag 18120
 cgatacgaat tattcgtagt actatcgata atttatttga aaattcataa gaaaagcaaa 18180
 15 cgttacatga attgatgaaa caatacaaag acagataaag ccacgcacat ttaggatatt 18240
 ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc tgacaggagc atgtcttcaa 18300
 ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat atgcaggagc ggatcattca 18360
 ttgtttgttt ggttgccttt gccaacatgg gagtccaagg ttggcgcgcc gaccagctt 18420
 tc 18422

 20 <210> 63
 <211> 14233
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Plásmido pDAB7326

 <400> 63
 ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
 ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
 25 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta 180

	ttgaaatggc actgttattt caaccatatac tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag	240
	aagtaaataa tagacgccgt tgtaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa	300
	tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg	360
	taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcatgatag	420
5	ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgttagtga	480
	caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaca attgcctttg	540
	gggagacggg aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgic gaggaggcaa tgtaaccgcc	600
	tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact	660
	tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga	720
	atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca	780
	atatgcgcca catatgcaac ctatgttcaa aatgaagaa tgtacagata caagatccta	840
10	tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa	900
	agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga	960
	ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa gytggaaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	1020
	tatcaciaag gaatcttata cccactact tatectttta tatttttccg tgtcattttt	1080
	gcccttgagt tttctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	1140
	tggtgtaagc tattttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt	1200
	gtaggtacca gatctggatc ccaaaccatg tctccggaga ggagaccagt tgagattagg	1260
15	ccagctacag cagctgatat ggccgcgggt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg	1320
	tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag	1380
	aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgtgt ggctggattt	1440
	gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttag gagtactggt	1500
	tacgtgtcac ataggcatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt	1560
	aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat	1620
20	ccatctgtta ggttgcatga ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgacgt	1680
	ggatacaagc atggtggatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca	1740
	gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag	1800
	agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa	1860
	atagttgcbg tgggcaaggc tctctttcag aaagacagcc ggccaaagga acccaagggtg	1920
	aggtgggcta tggctctcag ttccttggtg aagcgttgg tctaaggtgc agaggtgta	1980
	gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
25	aaagtatgta ttcataccta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100

	gtctttattg	tcgccgatg	taatcggcgt	cacaaaataa	tccccggtga	ctttctttta	2160
	atccaggatg	aaataatatg	ttattataat	ttttgcgatt	tggtcggtta	taggaattga	2220
	agtgtgcttg	aggtcggtcg	ccaccactcc	catttcataa	ttttacatgt	atttgaaaaa	2280
	taaaaattta	tggatttcaa	tttaaacacg	tatacttgta	agaatgata	tcttgaaaga	2340
	aatatagttt	aaatatttat	tgataaaata	acaagtcagg	tattatagtc	caagcaaaaa	2400
5	cataaattta	ttgatgcaag	tttaattca	gaaatatttc	aataactgat	tatatcagct	2460
	ggtacattgc	cgtagatgaa	agactgagtg	cgatattatg	gtgtaataca	taggaattcg	2520
	tttaaacgat	ctgcgtctaa	ttttcggctc	aacttgcaca	ggaaagacgt	cgaccgcggt	2580
	agctcttgcc	cagcagactg	ggcttccagt	cctttcgttc	gatcgggtcc	aatgtttgtcc	2640
	tcagctgtga	accggaagcg	gacgaccaac	agtggaagaa	ctgaaaggaa	cgagccgtct	2700
	ataccttgat	gatcggcctc	tggatgaagg	tatcatcgca	gccaaagcaag	ctcatgaaag	2760
10	gctgatgggg	gaggtgtata	attatgaggc	ccacggcggg	cttattcttt	agggaggatc	2820
	tatctcgttg	ctcaagtgca	tggcgcaaag	cagttattgg	agtgcggatt	ttcgtttggca	2880
	tattattcgc	cacgagttag	cagacgaaga	gaccttcgat	aacgtggcca	aggccagagt	2940
	taagcagatg	ttacgccctg	ctgcaggcct	ttctattatc	caatagtggg	ttgatctttg	3000
	gaaagagcct	cggctgaggc	ccatactgaa	agagatcgat	ggatatcgat	atgccatggt	3060
	gtttgctagc	cagaaccaga	tcacatccga	tatgctattg	cagcttgacg	cagatatgga	3120
	ggataagtgg	attcatggga	tcgctcagga	gtagctcatc	catgcacgcc	gacaagaaca	3180
15	gaaattccgt	cgagttaacg	cagccgctta	cgacggattc	gaaggtcatc	cattcggaat	3240
	gtattagttt	gcaccagctc	cgcgtcacac	ctgtcttcat	ttgaataaga	tgttagcaat	3300
	tgtttttagc	tttgtcttgt	tgtggcaggg	cggcaagtgc	ttcagacatc	attctgtttt	3360
	caaattttat	gctggagaac	agcttcttaa	ttcctttgga	aataatagac	tgcgtcttaa	3420
	aattcagatg	tctggatata	gatatgattg	taaaataacc	tatttaagtg	tcattttagaa	3480
	cataagtttt	atgaatgttc	ttccattttc	gtcatcgaac	gaataagagt	aaatacacct	3540
20	tttttaacat	tacaataaag	ttcttatacg	ttgtttatac	accgggaatc	attttcatta	3600
	ttttcgcgca	aaagtcacgg	atattcgtga	aagcgacata	aactgcgaaa	tttgcggggg	3660
	gtgtcttgag	tttgccctga	ggctagcgca	tgacacataga	cacacacatc	atctcattga	3720
	tgcttggtaa	taattgtcat	tagattgttt	ttatgcatag	atgcactcga	aatcagccaa	3780
	ttttagacaa	gtatcaaacg	gatgtgactt	cagtacatta	aaaacgtccg	caatgtgtta	3840
	ttaagttgtc	taagcgtcaa	tttgatttac	aattgaatat	atcctgcccc	agccagccaa	3900
25	cagctcgatt	tacaattgaa	tatatacctgc	cggccggccc	acgcgtgtcg	aggaattctg	3960

	atctggcccc catttggacg tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa	4020
	taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa	4080
	atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt	4140
	ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga	4200
	tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatacctg ccgccgctgc cgctttgcac	4260
5	ccggtggagc ttgcatggtg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc	4320
	attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt	4380
	gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgcgagaga agcagtcgat	4440
	ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc	4500
	aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggctg ccatttttgg	4560
	ggtgagggcg ttcgcggccg aggggcgag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc	4620
	gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcgg cgtagcgggt cacgcgcaca	4680
10	gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga	4740
	caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg	4800
	tggacagccc ctcaaagtgc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgccccctca	4860
	gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaaggt caataccgca	4920
	gggcacttat cccaggtt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt	4980
	tttcgccgat ttgagggct ggccagctcc acgtcggcg ccgaaatcga gcctgcccct	5040
15	catctgtcaa cgccgcgccg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcatc	5100
	tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctcg	5160
	cacacggctt cgacggcggt tctggcgctg ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag	5220
	cgccgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggctg acggatcttt tccgctgcat	5280
	aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat	5340
	atacaggatt ttgccaaggg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc	5400
20	cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt	5460
	attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccg	5520
	gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaaccagg aagggcagcc	5580
	cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg	5640
	cgccggcat gagcctgctg gcctacctgc tggccgctcg ccagggctac aaaatcacgg	5700
	gcgtcgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggcccgc	5760
	tgggcccctt gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cacggcgcgg ttcggtgatg	5820
25	ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca	5880

	tgatgggctg	ggtccgcccg	agggcagagc	catgactttt	ttagccgcta	aaacggcccg	5940
	ggggtgctcg	tgattgccaa	gcacgtcccc	atgcgctcca	tcaagaagag	cgacttcgcg	6000
	gagctggtat	tcgtgcaggg	caagattcgg	aataccaagt	acgagaagga	cggccagacg	6060
	gtctacggga	ccgacttcat	tgccgataag	gtggattatc	tggacaccaa	ggcaccaggc	6120
	gggtcaaadc	aggaataagg	gcacattgcc	ccggcgtgag	tcggggcaat	cccgcaagga	6180
5	gggtgaatga	atcggacggt	tgaccggaag	gcatacaggc	aagaactgat	cgacgcgggg	6240
	ttttccgccc	aggatgccga	aaccatcgca	agccgcaccg	tcattgcgtgc	gccccgcgaa	6300
	accttccagt	ccgtcggctc	gatgggtccag	caagctacgg	ccaagatcga	gcgcgacacg	6360
	gtgcaactgg	ctccccctgc	cctgcccgcg	ccatcggccg	ccgtggagcg	ttcgcgtcgt	6420
	ctcgaacagg	aggcggcagg	tttggcgaag	tcgatgacca	tcgacacgcg	aggaactatg	6480
	acgaccaaga	agcgaaaaac	cgccggcgag	gacctggcaa	aacaggctag	cgaggccaag	6540
10	caggccgcgt	tgctgaaaca	cacgaagcag	cagatcaagg	aaatgcagct	ttccttgttc	6600
	gatattgcgc	cgtggccgga	cacgatgcga	gcatgacca	acgacacggc	ccgctctgcc	6660
	ctgttcacca	cgcgcaaca	gaaaatcccc	cgcgagggcg	tgcaaaaca	ggcatttttc	6720
	cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatcacctac	accggcgtcg	agctgcgggc	cgacgatgac	6780
	gaactggtgt	ggcagcaggt	gttggagtac	gcgaagcgca	cccctatcgg	cgagccgatc	6840
	accttcacgt	tctacgagct	ttgccaggac	ctgggctggt	cgatcaatgg	ccggtattac	6900
	acgaaggccg	aggaatgcct	gtcgcgccta	caggcgcacg	cgatgggctt	cacgtccgac	6960
15	cgcgttgggc	acctggaatc	ggtgtcgtcg	ctgcaccgct	tccgcgtcct	ggaccgtggc	7020
	aagaaaacgt	cccgttgcca	ggtcctgatc	gacgaggaaa	tcgtcgtgct	gtttgctggc	7080
	gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tgctgccgac	ggccccagcg	7140
	atgttcgact	atctcagctc	gcaccgggag	ccgtacccgc	tcaagctgga	aaccttccgc	7200
	ctcatgtgcg	gatcggattc	caccgcgctg	aagaagtggc	gagagcaggt	cggcgaagcc	7260
	tgcaagaggt	tgcaaggcag	cggcctgggtg	gaacacgcct	gggtcaatga	tgacctggtg	7320
20	cattgcaaac	gctagggcct	tgtggggctca	gttccggctg	ggggttcagc	agccagcgtc	7380
	ttactggcat	ttcaggaaca	agcgggcact	gctcgcgca	cttgcttcgc	tcagtatcgc	7440
	tcgggacgca	cggcgcgctc	tacgaactgc	cgataaacag	aggattaaaa	ttgacaattg	7500
	tgattaaggc	tcagattcga	cggcttgag	cggccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
	gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tgctcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
	aaaagcccat	ggaggcgctc	gctgaacggg	tgcaagatgc	cggtggcattc	ggcgcctaca	7680
25	tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcggctc	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740

	acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcgcgg	7800
	gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgacgctc cgacagattc	7860
	caacgggaat ctggtggatg cgcatttca tctcggcgc acttaattt tgcctattct	7920
	ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggcgg ggctcggcg acggtaggcg	7980
	ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatct ctgccctct gctaggtagc ccgatacgat	8040
5	tgatggcggc cctgggggct atttgcgaa ctgcggcgt ggcgctgtt gtgttgacac	8100
	caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcggggcg gtttccatgg	8160
	cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc acctttaccg	8220
	cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg tttgatccgc	8280
	caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag	8340
	cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt	8400
10	ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc	8460
	gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggtt	8520
	aattcaggag ttaaacaatca tgaggggaag ggtgatcgc gaagtatcga ctcaactatc	8580
	agaggtagtt ggcgtcatcg agcgcctatc cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
	cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt	8700
	gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgacctt tggaaacttc	8760
	ggcttcccct ggagagagcg agattctccg cgtgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
15	cgacatcatt ccgtggcgtt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg	8880
	caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt	8940
	gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt	9000
	tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
	ctcggcggc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
	gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
20	gcgcctgccc gcccagtatc agcccgtcat acttgaaget aggcaggctt atcttggaca	9240
	agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg	9300
	cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt	9360
	cgcgccgccc cttactcaa gcgtagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa	9420
	ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttgatcca ttccattcc gcgctcaaga	9480
	tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat	9540
	gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct	9600
25	caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca cacaaaagt taggcccga	9660

tagtttgaaa ttgaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaatcgct cttagccgta 9720
 caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt 9780
 atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata 9840
 aatatatagt tttatataat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata 9900
 tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat 9960
 5 ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg 10020
 cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatataatc 10080
 tttttcgaat ttgaagtga atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt 10140
 aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat 10200
 caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc 10260
 tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
 10 atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa 10380
 aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
 gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggcc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgc aatattcctgg aaattttgca 10560
 aatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 15 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 gaaatatacg aaggaacaaa tttttttaa aaaatagca atgacttggg acaaaagaaa 10800
 gtgatataat tttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttataaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgcc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcggccgctt tcctgcatga catcgtctcg cagagccaag cgcagctta attaaactag 11100
 20 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctctat 11160
 ttaaaggggt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg ctccgcaca cgatattcct acaatttat 11280
 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa atttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaacat tttcatattg aatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttctattct tttcatata aatgtttaat atacaatata acaaaattct 11460
 25 ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaaata tatttatcaa atatttttca 11520

	accacgtaaa	tctcataata	ataagttggt	tcaaaagtaa	taaaatttaa	ctccataatt	11580
	tttttattcg	actgatctta	aagcaacacc	cagtgacaca	actagccatt	tttttctttg	11640
	aataaaaaaa	tccaattatc	attgtatfff	ttttatacaa	tgaaaatttc	accaaacaat	11700
	gatttgtggt	atctctgaag	caagtcatgt	tatgcaaaat	tctataattc	ccattttgaca	11760
	ctacggaagt	aactgaagat	ctgctttttac	atgcgagaca	catctttctaa	agtaattttta	11820
5	ataatagtta	ctatattcaa	gatttcatat	atcaaatact	caatattact	tctaaaaaat	11880
	taattagata	taattaaat	attacttttt	taattttaag	ttaattggt	gaattttgtga	11940
	ctattgattt	attattctac	tatgtttaaa	ttgttttata	gatagtttaa	agtaaataata	12000
	agtaatgtag	tagagtgtta	gagtgttacc	ctaaaccata	aactataaga	tttatggtgg	12060
	actaattttc	atatatttct	tattgctttt	accttttctt	ggtatgtaag	tccgtaactg	12120
	gaattactgt	gggttgccat	gacactctgt	ggtcttttgg	ttcatgcatg	gatctttgcg	12180
10	aagaaaaaga	caaagaaca	agaaaaaga	caaacagag	agacaaaacg	caatcacaca	12240
	accaactcaa	attagtact	ggctgatcaa	gategccg	tccatgtatg	tctaaatgcc	12300
	atgcaaagca	acacgtgcl	aacatgcacl	ttaaatygt	cacccatctc	aacccacaca	12360
	caaacacatt	gccttttct	tcatcatcac	cacaaccacc	tgtatatatt	cattctcttc	12420
	cgccacctca	attctttcac	ttcaacacac	gtcaacctgc	atatgctgtg	catcccatgc	12480
	ccaaatctcc	atgcatgttc	caaccacctt	ctctcttata	taataacctat	aaataacctet	12540
	aatatcactc	actcttttca	tcatccatcc	atccagagta	ctactactct	actactataa	12600
15	tacccaace	caactcatat	tcaatactac	tctaggtacc	ctgcagggat	ccaacaatgg	12660
	ctcccaacat	tctgaggat	gtcaatggtg	ttctttttga	gtcagatg	gcaacccctg	12720
	atttggctct	ttccacacca	cctgtycaaa	aagctgacaa	cagacceag	caacttgtgt	12780
	ggaggaacat	tttgcctttc	gcttacttgc	acctgcagc	tctctacgga	ggctatittgt	12840
	ttctcttcag	tgaaaatgg	cagaccgaca	ttttcgctta	cattctttat	gtcatctctg	12900
	gactggggat	aactgctggg	gcacatagac	tctgggctca	caagtcatac	aaagccaagt	12960
	ggccactcag	agttatactg	gtcatcttca	acacggttgc	ctttcaagac	gtgctatgg	13020
20	attgggctcg	tgaccataga	atgcatcaca	agtacagcga	gaccgacg	gaccacaca	13080
	atgcaacgag	aggtttcttc	ttctctcaca	ttggctggct	tcttgttagg	aaacatctg	13140
	atctgaaaga	aaaagggag	ggactcgaca	tgagtgatct	ccttgcctgat	ccaatactcc	13200
	gttttcagaa	gaagtactat	ctgactctca	tgctctggc	ctgttttgtg	atgccaaccg	13260
	ttatcccgg	ttacttttgg	ggagaaactt	ggacaaatgc	ttctctctg	gcagccatgt	13320
	tccgttatgc	ttcatctctg	aatgttacct	ggttggtgaa	ctctgccgca	cacaagtggg	13380
25	gagacaaacc	ctatgacaag	tccatcaagc	cttccgaaaa	cctttcagtt	gcgatgittg	13440

	ctttgggaga aggatctcac aattaccatc acacttttcc gtgggactac aagacagcag	13500
	agcttggaag caacaagttg aacttcacaa caacgttcat caatttcttt gcgaaaatcg	13560
	gttggccta tgattgaag actgtgagtg atgacattgt caagaacagg gtcaagagaa	13620
	ctggcgatgg aagccatcat ctctggggct ggggtgatga gaatcagagc aaagaagaga	13680
	tagatgcagc cattaggatc aaccctaaag acgattgagt agttagctta atcacctaga	13740
5	gctcggtcac ctcgagtatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg ttgcaggctt	13800
	gctggagaat cgatctgcta tcataaaaat tacaacaaaaa ttttatttgc ctcaattatt	13860
	ttaggattgg tattaaggac gcttaaatta tttgtcgggt cactacgcat cattgtgatt	13920
	gagaagatca gcgatacga atattcgtag tactatcgat aatttatttg aaaattcata	13980
	agaaaagcaa acgttacatg aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa gccacgcaca	14040
	tttaggatat tggccgagat tactgaatat tgagtaagat cacggaattt ctgacaggag	14100
10	catgtcttca attcagccca aatggcagtt gaaatactca aaccgcccc tatgcaggag	14160
	cggatcattc attgtttgtt tggttgcctt tgccaacatg ggagtccaag gttggcgcgc	14220
	cgaccagct ttc	14233
	<210> 64	
	<211> 14575	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Plásmido pDAB7328	
	>400> 64	
	ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt	60
	ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaagaa aaaatgatg ttattgtatt gatctttcat	120
	gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaa atattaactg tcgcatttta	180
	ttgaaatggc actgttattt caaccatatt tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag	240
	aagtaaataa tagacgccgt tgttaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa	300
20	tttgagcgtc agacctaattc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggg	360
	taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcggaaaaac ctccccgagt ggcatgatag	420
	ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct tatttgactt aagggtgccc tcgtagtga	480
	caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaaaa attgcctttg	540
	gggagacggg aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgct gaggaggcaa tgtaaccgcc	600
	tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact	660
25	tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga	720

	atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aaccagatca	780
	atatgctgca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta	840
	tactgccaga atacgaagaa gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcaagaaa	900
	agaatcttga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga	960
	ttgtgaaaga gacatagagg acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct	1020
5	tatcaciaag gaatcttata cccactact taccctttta ttttttccg tgtcattttt	1080
	gcccttgagt tttcctatat aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt	1140
	tggtgtaagc tttttcttt gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt	1200
	gtaggtacca gatctggatc ccaaacctag tctccggaga ggagaccagt tgagattagg	1260
	ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg	1320
	tctacagtga actttaggac agagccacaa acaccacaag agtggattga tgatctagag	1380
	aggttgcaag atagataccc ttggttggtt gctgaggttg aggggtgttg ggctggatt	1440
10	gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac gcttacgatt ggacagttga gagtactggt	1500
	tacgtgtcac ataggatca aaggttgggc ctaggatcta cattgtacac acatttgctt	1560
	aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct gtggttgctg ttataggcct tccaaacgat	1620
	ccatctgtta ggttgcata ggctttggga tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct	1680
	ggatacaagc atggtggatg gcatgatggt ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca	1740
	gctcctcaa ggccagttag gccagttacc caaatctgag tagttagctt aatcacctag	1800
15	agctcgatcg gcggcaatag cttcttagcg ccatcccggg ttgatcctat ctgtgttgaa	1860
	atagttgctg tgggcaaggc tctctttcag aaagacaggc ggccaaagga acccaagggtg	1920
	aggtgggcta tggctctcag ttccttggg aagcgcttg tctaagggtc agaggtgtta	1980
	gcgggatgaa gcaaaagtgt ccgattgtaa caagatatgt tgatcctacg taaggatatt	2040
	aaagtatgta tcatcacta atataatcag tgtattccaa tatgtactac gatttccaat	2100
	gtctttattg tcgccgatg taatcggcgt cacaaaataa tccccggtga cttctttta	2160
	atccaggatg aaataatatg ttattataat ttttgcgatt tgggtccgta taggaattga	2220
20	agtgtgcttg aggtcggctg ccaccactcc catttcataa ttttacctgt atttgaaaaa	2280
	taaaaattta tggatttcaa tttaaacacg tatacttgta aagaatgata tcttgaaaga	2340
	aatatagttt aaatatttat tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa	2400
	cataaattta ttgatgcaag tttaaattca gaaatattc aataactgat tatatcagct	2460
	ggtacattgc cgtagatgaa agactgagtg cgatattatg gtgtaataca taggaattcg	2520
	tttaaacgat ctgctgctaa ttttcggtcc aacttgaca ggaaagacgt cgaccgcggt	2580
25	agctcttgcc cagcagactg ggcttccagt cctttcgtc gatcgggtcc aatgttgtcc	2640

	tcagctgtga accggaagcg gacgaccaac agtggaaaga ctgaaaggaa cgagccgtct	2700
	ataccttgat gatcggcctc tggatgaagg tatcatcgca gccaaagcaag ctcatgaaag	2760
	gctgatgggg gaggtgtata attatgaggc ccacggcggg cttattcttt agggaggatc	2820
	tatctcgttg ctcaagtgca tggcgcaaag cagttattgg agtgcggtatt ttcgttggca	2880
	tattattcgc cacgagttag cagacgaaga gaccttcatg aacgtggcca aggccagagt	2940
5	taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagtgg ttgatctttg	3000
	gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt	3060
	gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga	3120
	ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca	3180
	gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggctatc cattcggaat	3240
	gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgttagcaat	3300
10	tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt	3360
	caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa	3420
	aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa	3480
	cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaaac gaataagagt aaatacacct	3540
	tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta	3600
	ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga	3660
	gtgtcttgag tttgcctcga ggctagcgca tgcacataga cacacacatc atctcattga	3720
15	tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa	3780
	ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta	3840
	ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgcccc agccagccaa	3900
	cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg	3960
	atctggcccc catttgacg tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa	4020
	taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgctg ttttatcaaa	4080
20	atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt	4140
	ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga	4200
	tttccccgac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgcccgtgc cgctttgcac	4260
	ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc	4320
	attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt	4380
	gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcy ttgagagaga agcagtcgat	4440
25	ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc	4500

	aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggctg ccatttttgg	4560
	ggtgaggccg ttcgcggccg aggggcgcag cccctggggg gatgggaggc ccgcgttagc	4620
	gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac ccccttcgg cgtgcgcggt cacgcgcaca	4680
	gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga	4740
	caggtagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg	4800
5	tggacagccc ctcaaatgtc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc tgcccctcaa	4860
	gtgtcaagga tcgcgcccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca	4920
	gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtgggaa actcgcgtaa aatcaggcgt	4980
	tttcgccgat ttgcgaggct ggccagctcc acgtcgcgg ccgaaatcga gcctgcccct	5040
	catctgtcaa cgccgcgccc ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcatc	5100
	tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctcg	5160
	cacacggcct cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag	5220
10	cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggctg acggatcttt tccgctgcat	5280
	aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcggata tccatccttt ttcgcacgat	5340
	atacaggatt ttgcaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc	5400
	cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt	5460
	attcgcacct ggcggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggttgcccg gctaccgccg	5520
	gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaccagg aagggcagcc	5580
15	cacatataca ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg	5640
	cggccggcat gagcctgtcg gcctacctgc tggccgtcgg ccagggctac aaaatcacgg	5700
	gcgtctgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcct caatggcgac ctgggcccgc	5760
	tggcggcct gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cacggcgcgg ttcggtgatg	5820
	ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca	5880
	tgatggcgt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg	5940
	ggggtgcgcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg	6000
20	gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg	6060
	gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc	6120
	gggtcaaadc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga	6180
	gggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg	6240
	ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc gccccgcgaa	6300
	accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgcgacagc	6360
25	gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggcccg ccgtggagcg ttcgcgtcgt	6420

	ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg	6480
	acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag	6540
	caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct ttccttgttc	6600
	gatattgcmc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc ccgctctgcc	6660
	ctgttcacca cgcgcaaca gaaaatccc cgcgaggcmc tgcaaaaca ggtcattttc	6720
5	cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc cgacgatgac	6780
	gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgc cccctatcgg cgagccgatc	6840
	accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg ccggtattac	6900
	acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt cacgtccgac	6960
	cgcgttgggc acctggaatc ggtgctgctg ctgcaccgct tccgcgtcct ggaccgtggc	7020
	aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgctcgtgct gtttgctggc	7080
10	gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgctcggac ggcccgcagc	7140
	atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga aaccttcgc	7200
	ctcatgtgcm gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt cggcgaagcc	7260
	tgcaagagat tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga tgacctggtg	7320
	cattgcaaac gctagggcct tgtggggctc gttccggctg ggggttcagc agccagcgt	7380
	ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc tcagtatcgc	7440
15	tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaana ttgacaattg	7500
	tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc cgcgagatcc	7560
	gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag cagcaggaga	7620
	aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc ggcgcctaca	7680
	tcgacggcga gatcattggg ctgctggtct tcaaacagga ggacggcccc aaggacgctc	7740
	acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga ggggtcggcg	7800
	gtatgctgct gcgggcggtg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc cgacagattc	7860
20	caacgggaat ctggtgatg cgcatttca tctcggcgc acttaattt tcgctattct	7920
	ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggcgg ggtcgcggcg acggtaggcg	7980
	ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc ccgatacgat	8040
	tgatggcggc cctgggggct atttgcgga ctgcggcgt ggcgctgtg gtgttgacac	8100
	caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcggcct ggcggggcg gttccatgg	8160
	cgttcggaa cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc acctttaccg	8220
25	cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt tttgatccgc	8280

	caatccccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc ctgatcggag	8340
	cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct acagttgttt	8400
	ccttactggg ctttctcagc ccccgagcgc ttagtgggaa tttgtacccc ttatcgaacc	8460
	gggagcacag gatgacgcct aacaattcat tcaagccgac accgcttcgc ggcgcggctt	8520
	aattcaggag ttaaacaatca tgaggggaagc ggtgatcgcc gaagtatcga ctcaactatc	8580
5	agaggtagtt ggcgtcatcg agcgcctatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
	cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt	8700
	gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	8760
	ggcttccccct ggagagagcg agatttctcg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
	cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg	8880
	caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt	8940
10	gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt	9000
	tgatccggtt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
	ctcggccccc gactgggctg gcgatgagcg aaatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
	gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
	gcgcctgccg gccagtatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca	9240
	agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg	9300
	cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt	9360
15	cgcggcgcgg cttactcaa gcgttagaga gctggggaag actatgcgcg atctgttgaa	9420
	ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttcccattcc gcgctcaaga	9480
	tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat	9540
	gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct	9600
	caaattacaa cggatatatat cctgccagtc agcatcatca caccaaaagt taggccgaa	9660
	tagtttgaaa ttagaaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct cttagccgta	9720
20	caatattact caccgatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt	9780
	atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata	9840
	aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata	9900
	tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaataatga agtgctccat	9960
	ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg	10020
	cgtaaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatatatc	10080
	tttttcgaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattatct	10140
25	aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat	10200

caacgaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatundatcaatcc 10260
tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac 10320
atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaaag taagattaaa ataataattca tctaacaaaa 10380
aaaaaaccag aaaatgctga aaacccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg 10440
gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggcc atttgcacc ctaatcataa 10500
5 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
aatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca atgacttggca acaaaagaaa 10800
gtgatataat ttttgttcct aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
10 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgcc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
ttgtacaaaa aagcaggctc cgcggccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
gcggccgctt tctgcatga catcgtcctg cagagccaag cgcattgctta attaaactag 11100
tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggttt ttacctctat 11160
ttaaaggggt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc acttacttg ttactttaat 11220
ttctcataat ctttggttga aattatcacg ctccgcaca cgatatccct acaaatttat 11280
15 tatttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
agtctaacat tttcatattg aatatataa ttactttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata acaaattct 11460
ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaaata tatttatcaa atatttttca 11520
accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgcacaca actagccatt ttttctttg 11640
20 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt ttttatacaa tgaaaatttc accaaacaat 11700
gatttggtggt atttctgaag caagtcatgt tatgcaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
ctacggaagt aactgaagat ctgctttttac atgcbgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaatact caatattact tctaaaaaat 11880
taattagata taattaaaat attacttttt taattttaag ttttaattggt gaatttggtga 11940
ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagtttaa agtaaatata 12000
25 agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatggtgg 12060

actaattttc atatatttct tattgctttt accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcattgcatg ~~gatcttgcgc 12180~~

aagaaaaaga caaagaaca agaaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgcgcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300
atgcaaagca acacgtgctt aacatgcact ttaaattggct caccatctc aaccacaca 12360

5 caaacacatt gccttttct tcatcatcac cacaaccacc tgtatatatt cattctcttc 12420
cgccacctca atttcttcac ttcaacacac gtcaacctgc atatgctgtg catcccatgc 12480
ccaaatctcc atgcatgttc caaccacctt ctctcttata taatacctat aaatacctct 12540
aatatcactc acttcttca tcatccatcc atccagagta ctactactct actactataa 12600
taccccaacc caactcatat tcaatactac tctaggtacc ctgcagggat ccaacaatgt 12660
ctgctccaac cgctgacatc agggctaggg ctccagaggc taagaagggt cacatcgctg 12720
ataccgctat caacaggcac aattggtaca agcacgtgaa ctggctcaac gtcttctca 12780

10 tcatcggaat cccactctac ggatgcatcc aagctttctg ggttccactt caactcaaga 12840
ccgctatctg ggctgtgatc tactacttct tcaccggact tggaatcacc gctggatacc 12900
acaggctttg ggctcactgc tcatactctg ctactcttcc acttaggatc tggcttgctg 12960
ctggtggagg aggagctgtt gagggatcta tcagatggtg ggctagggat cacagggctc 13020
atcataggta caccgatacc gacaaggacc catactctgt taggaagga cttctctact 13080
ctcaccttgg atggatggtg atgaagcaga acccaaagag gatcggaagg accgacatct 13140

15 ctgatctcaa cgaggacca gttgttgtt ggcaacacag gaactactc aaggttgtgt 13200
tcaccatggg acttgctgtt ccaatgctt ttgctggact tggatggga gattggctt 13260
gaggattcgt gtacgtgga atccttagga tcttcttctg tcaacaagct accttctg 13320
tgaactctct tgctcactgg cttggagatc aaccattcga tgataggaac tctcttaggg 13380
atcacgtgat caccgctctt gttaccctt gagagggata ccacaactc caccacgagt 13440
tcccatctga ctacaggaac gctatcgagt ggcaccagta cgatcctacc aagtggctca 13500
tctgggcttg gaagcaactt ggattggctt acgatctcaa gaagttcagg gctaacgaga 13560

20 tcgagaaggg aagggttcaa caacttcaga agaagcttga taggaagagg gctactcttg 13620
attggggaac cccacttgat caacttcag tgatggaatg ggatgactac gttgagcaag 13680
ctaagaacgg aaggggactt gttgctatcg ctggagttgt tcacgatgtt accgacttca 13740
tcaaggatca cccaggagga aaggctatga tctcttctg aatcgaaag gatgctaccg 13800
ctatgttcaa cggaggagt tactaccact ctaacgcagc tcacaactt cttagcacca 13860
tgagggtggg agtgatcagg ggaggatgc aggttgagat ctggaagagg gctcagaagg 13920

25 agaacgttga gtacgttagg gatggatctg gacaaaggt gatcagggtt ggagagcaac 13980

caaccaagat cccagagcca atcccaaccg ctgatgctgc ttgagtagtt agcttaatca 14040
cctaggtcac cagtatgaac taaaatgcat gtaggtgtaa gagctcggtc acctcgagta 14100
tcaaaatcta tttagaaata cacaatattt tgttgcaggc ttgctggaga atcgatctgc 14160
tatcataaaa attacaaaaa aattttattt gcctcaatta ttttaggatt ggtattaagg 14220
acgcttaa at ttttgcgg gtcactacgc atcattgtga ttgagaagat cagcgatagc 14280
5 aatattcgt agtactatcg ataatttatt tgaaaattca taagaaaagc aaacgttaca 14340
tgaattgatg aaacaatata aagacagata aagccacgca catttaggat attggccgag 14400
attactgaat attgagtaag atcacggaat ttctgacagg agcatgtctt caattcagcc 14460
caaatggcag ttgaaatact caaaccgccc catatgcagg agcggatcat tcattgtttg 14520
tttggttgcc tttgccaaca tgggagtcca aggttggcgc gccgaccag ctttc 14575

<210> 65
10 <211> 14602
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plásmido pDAB7330

<400> 65
ttgtacaaag tggttgcggc cgcttaatta aatttaaatt caattaatgc aatcttgatt 60
ttcaacaacg aaggtaatgg cgtaaaagaa aaaatgtatg ttattgtatt gatctttcat 120
15 gatgttgaag cgtgccataa tatgatgatg tataattaaa atattaactg tcgcatttta 180
ttgaaatggc actgttattt caaccatatt tttgattctg ttacatgaca cgactgcaag 240
aagtaaataa tagacgccgt tgtaaagaa ttgctatcat atgtgcctaa ctagagggaa 300
tttgagcgtc agacctaatc aaatattaca aaatatctca ctctgtcgcc agcaatggtg 360
taatcagcgc agacaaatgg cgtaaagatc gcgaaaaaac ctccccgagt ggcattgatg 420
ctgcctctgt attgctgatt tagtcagcct ttttgactt aagggtgccc tcgttagtga 480
caaattgctt tcaaggagac agccatgccc cacactttgt tgaaaaacaa attgcctttg 540
20 gggagacggt aaagccagtt gctcttcaat aaggaatgtc gaggaggcaa tgtaaccgcc 600
tctggtagta cacttctcta atccaaaaat caatttgtat tcaagatacc gcaaaaaact 660
tatggtttaa accctgcagg actagtccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga 720
atccaatggt tacgggaaaa actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca 780
atatgaggca catatgcaac ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta 840
tactgccaga atacgaagaa gaatagtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa 900
25 agaattctga agacgtaagc actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcggatga 960

	ttgtgaaaga	gacatagagg	acacatgtaa	ggtggaaaat	gtaagggcgg	aaagtaacct	1020
	tatcaciaag	gaatcttatac	ccccactact	tatcctttta	tatttttccg	tgctattttt	1080
	gcccttgagt	tttctatat	aaggaaccaa	gttcggcatt	tgigaaaaca	agaaaaaatt	1140
	tggtgtaagc	tattttcttt	gaagtactga	ggatacaact	tcagagaaat	ttgtaagttt	1200
	gtaggtacca	gatctggatc	ccaaaccatg	tctccggaga	ggagaccagt	tgagattagg	1260
5	ccagctacag	cagctgatata	ggccgcgggt	tgtgatatac	ttaaccatta	cattgagacg	1320
	tctacagtga	actttaggac	agagccacaa	acaccacaag	agtggattga	tgatctagag	1380
	aggttgcaag	atagataccc	ttggttggtt	gctgaggttg	aggggtgttg	ggctggtatt	1440
	gcttacgctg	ggccctggaa	ggctaggaac	gcttacgatt	ggacagttga	gagtactggt	1500
	tacgtgtcac	ataggcatca	aaggttgggc	ctaggatcta	cattgtacac	acatttgctt	1560
	aagtctatgg	aggcgcaagg	ttttaagtct	gtggttgctg	ttataggcct	tccaaacgat	1620
10	ccatctgta	ggttgcatga	ggctttggga	tacacagccc	gggttacatt	gcgvcagct	1680
	ggatacaagc	atggtggatg	gcatgatggt	ggtttttggc	aaagggattt	tgagttgcca	1740
	gctcctcaa	ggccagttag	gccagttacc	caaatctgag	tagttagctt	aatcacctag	1800
	agctcgatcg	gcggcaatag	cttcttagcg	ccatcccggg	ttgatcctat	ctgtgttgaa	1860
	atagttgagg	tgggcaaggc	tctctttcag	aaagacaggc	ggccaaagga	acccaaggtg	1920
	aggtgggcta	tggctctcag	ttccttggtg	aagcgcttgg	tctaaggtgc	agaggtgtta	1980
	gcgggatgaa	gcaaaagtgt	ccgattgtaa	caagatatgt	tgatcctacg	taaggatatt	2040
15	aaagtatgta	ttcatcacta	atataatcag	tgtattccaa	tatgtactac	gattttccaat	2100
	gtctttattg	tcgccgatg	taatcggcgt	cacaaaataa	tccccggtga	ctttctttta	2160
	atccaggatg	aaataatata	ttattataat	ttttgcgatt	tggtccgtta	taggaattga	2220
	agtgtgcttg	aggtcggctg	ccaccactcc	catttcataa	ttttacatgt	atttgaaaaa	2280
	taaaaattta	tggtattcaa	tttaaacacg	tatacttgta	aagaatgata	tcttgaaaga	2340
	aatatagttt	aatatattat	tgataaaata	acaagtcagg	tattatagtc	caagcaaaaa	2400
20	cataaattta	ttgatgcaag	tttaaattca	gaaatatttc	aataactgat	tatatcagct	2460
	ggtacattgc	cgtagatgaa	agactgagtg	cgatattatg	gtgtaataca	taggaattcg	2520
	tttaaacgat	ctgctgctaa	ttttcggctc	aacttgacaa	ggaaagacgt	cgaccgcggt	2580
	agctcttgcc	cagcagactg	ggcttccagt	cctttcgctc	gatcgggtcc	aatgttgctc	2640
	tcagctgtga	accggaagcg	gacgaccaac	agtggaagaa	ctgaaaggaa	cgagccgtct	2700
	ataccttgat	gatcggcctc	tggtgaaggg	tatcatcgca	gccaagcaag	ctcatgaaag	2760
	gctgatgggg	gaggtgtata	attatgaggc	ccacggcggg	cttattcttt	agggaggatc	2820
25	tatctcgttg	ctcaagtgca	tggcgcaaaag	cagttatttg	agtgcggatt	ttcgttggca	2880

tattattcgc cacgagttag cagacgaaga gaccttcatg aacgtggcca aggccagagt 2940
 taagcagatg ttacgccctg ctgcaggcct ttctattatc caatagttgg ~~ttgatctttg~~ 3000
 gaaagagcct cggctgaggc ccatactgaa agagatcgat ggatatcgat atgccatggt 3060
 gtttgctagc cagaaccaga tcacatccga tatgctattg cagcttgacg cagatatgga 3120
 ggataagttg attcatggga tcgctcagga gtagctcatc catgcacgcc gacaagaaca 3180
 5 gaaattccgt cgagttaacg cagccgctta cgacggattc gaaggtcac cattcggaat 3240
 gtattagttt gcaccagctc cgcgtcacac ctgtcttcat ttgaataaga tgttagcaat 3300
 tgtttttagc tttgtcttgt tgtggcaggg cggcaagtgc ttcagacatc attctgtttt 3360
 caaattttat gctggagaac agcttcttaa ttcctttgga aataatagac tgcgtcttaa 3420
 aattcagatg tctggatata gatatgattg taaaataacc tatttaagtg tcatttagaa 3480
 cataagtttt atgaatgttc ttccattttc gtcacgaaac gaataagagt aaatacacct 3540
 10 tttttaacat tacaataaag ttcttatacg ttgtttatac accgggaatc atttccatta 3600
 ttttcgcgca aaagtcacgg atattcgtga aagcgacata aactgcgaaa tttgcgggga 3660
 gttctttgag tttgcctcga ggctagcga tgcacataga cacacacatc atctcattga 3720
 tgcttggtaa taattgtcat tagattgttt ttatgcatag atgcactcga aatcagccaa 3780
 ttttagacaa gtatcaaacg gatgtgactt cagtacatta aaaacgtccg caatgtgtta 3840
 ttaagttgtc taagcgtcaa tttgatttac aattgaatat atcctgccc agccagccaa 3900
 15 cagctcgatt tacaattgaa tatatcctgc cggccggccc acgctgtctg aggaattctg 3960
 atctggcccc catttgagc tgaatgtaga cacgtcgaaa taaagatttc cgaattagaa 4020
 taatttgttt attgctttcg cctataaata cgacggatcg taatttgtcg ttttatcaaa 4080
 atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt 4140
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga 4200
 tttcccggac atgaagccat ttacaattga atatatcctg ccgccgctgc cgctttgcac 4260
 ccggtggagc ttgcatgttg gtttctacgc agaactgagc cggttaggca gataatttcc 4320
 20 attgagaact gagccatgtg caccttcccc ccaacacggt gagcgacggg gcaacggagt 4380
 gatccacatg ggacttttaa acatcatccg tcggatggcg ttgagagaga agcagtcgat 4440
 ccgtgagatc agccgacgca ccgggcaggc gcgcaacacg atcgcaaagt atttgaacgc 4500
 aggtacaatc gagccgacgt tcacgcggaa cgaccaagca agcttggtcg ccatttttgg 4560
 ggtgaggccg ttcgcggccg aggggagcag cccctggggg gatgggaggg ccgcttagc 4620
 gggccgggag ggttcgagaa gggggggcac cccccttcg cgtgcgcggt cacgcgcaca 4680
 25 gggcgagcc ctggttaaaa acaaggttta taaatattgg tttaaaagca ggttaaaaga 4740

caggttagcg gtggccgaaa aacgggcgga aacccttgca aatgctggat tttctgcctg 4800
 tggacagccc ctcaaatgtc aataggtgcg cccctcatct gtcagcactc ~~tgccccctcaa~~ 4800
 gtgtcaagga tcgcgccccct catctgtcag tagtcgcgcc cctcaagtgt caataccgca 4920
 gggcacttat ccccaggctt gtccacatca tctgtggaa actcgcgtaa aatcaggcgt 4980
 tttcgccgat ttgagaggct ggccagctcc acgtcgccgg ccgaaatcga gcctgccccct 5040
 5 catctgtcaa cgccgcgccg ggtgagtcgg cccctcaagt gtcaacgtcc gccccctatc 5100
 tgtcagtgag ggccaagttt tccgcgaggt atccacaacg ccggcggccg cgggtgtctcg 5160
 cacacggctt cgacggcggt tctggcgcggt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 5220
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggtcg acggatcttt tccgctgcat 5280
 aaccctgctt cggggtcatt atagcgattt tttcgggtata tccatctttt ttcgcacgat 5340
 atacaggatt ttgccaaagg gttcgtgtag actttccttg gtgtatccaa cggcgtcagc 5400
 10 cgggcaggat aggtgaagta ggcccacccg cgagcgggtg ttccttcttc actgtccctt 5460
 attcgcacct ggcgggtgctc aacgggaatc ctgctctgcg aggctggccg gctaccgccc 5520
 gcgtaacaga tgagggcaag cggatggctg atgaaaccaa gccaaccagg aagggcagcc 5580
 cacctatcaa ggtgtactgc cttccagacg aacgaagagc gattgaggaa aaggcggcgg 5640
 cggccggcat gagcctgctg gcctacctgc tggccgctcg ccagggctac aaaatcacgg 5700
 gcgctgtgga ctatgagcac gtccgcgagc tggcccgcac caatggcgac ctgggcccgc 5760
 tgggcccgtt gctgaaactc tggctcaccg acgacccgcg cacggcgcggt ttcggtgatg 5820
 15 ccacgatcct cgccctgctg gcgaagatcg aagagaagca ggacgagctt ggcaaggcca 5880
 tgatgggctt ggtccgcccg agggcagagc catgactttt ttagccgcta aaacggcccg 5940
 ggggtgctcg tgattgcaa gcacgtcccc atgcgctcca tcaagaagag cgacttcgcg 6000
 gagctggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga cggccagacg 6060
 gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa ggcaccaggc 6120
 gggcaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat cccgcaagga 6180
 20 gggatgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat cgacgcgggg 6240
 ttttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgct gcccccgcgaa 6300
 accttccagt ccgctggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga gcgagacagc 6360
 gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacgcccgg ccgtggagcg ttcgctgctg 6420
 ctcgaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg aggaactatg 6480
 acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag cgaggccaag 6540
 caggccgctg tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgagcgt ttccttgctc 6600
 25 gatattgctc cgtggccgga cacgatgca gcgatgcaa acgacacggc ccgctctgcc 6660

	ctgttcacca	cgcgcaacaa	gaaaatcccc	cgcgagggcgc	tgcaaaacaa	ggtcattttc	6720
	cacgtcaaca	aggacgtgaa	gatacactac	accggcgtcg	agctgcgggc	cgacgatgac	6780
	gaactggtgt	ggcagcaggt	gttggagtac	gcgaagcgc	cccctatcgg	cgagccgatc	6840
	accttcacgt	tctacgagct	ttgccaggac	ctgggctggt	cgatcaatgg	ccggtattac	6900
5	acgaaggccg	aggaatgcct	gtcgcgccta	caggcgacgg	cgatgggctt	cacgtccgac	6960
	cgcgttgggc	acctggaatc	ggtgtcgtg	ctgcaccgct	tccgcgtcct	ggaccgtggc	7020
	aagaaaacgt	cccgttgcca	ggtcctgatc	gacgaggaaa	tcgtcgtgct	gtttgctggc	7080
	gaccactaca	cgaaattcat	atgggagaag	taccgcaagc	tytcgccgac	ggccccgacg	7140
	atgttcgact	atctcagctc	gcaccgggag	ccgtaccgcg	tcaagctgga	aacctccgc	7200
	ctcatgtgcg	gatcggattc	cacccgcgtg	aagaagtggc	gcgagcaggt	cggcgaagcc	7260
	tgcaagaggt	tgcgaggcag	cggcctggty	gaacacgcct	gggtcaatga	tgacctggtg	7320
10	cattgcaaac	gctagggcct	tgtgggtca	gttccggctg	ggggttcagc	agccagcgtc	7380
	ttactggcat	ttcaggaaca	agcgggcact	gtctgacgca	cttgcttcgc	tcagtatcgc	7440
	tcgggacgca	cggcgcgctc	tacgaactgc	cgataaacag	aggattaaaa	ttgacaattg	7500
	tgattaaggc	tcagattcga	cggcttgag	cggccgacgt	gcaggatttc	cgcgagatcc	7560
	gattgtcggc	cctgaagaaa	gctccagaga	tgttcgggtc	cgtttacgag	cacgaggaga	7620
	aaaagcccat	ggaggcgctt	gctgaacggt	tgcgagatgc	cgtggcattc	ggcgcctaca	7680
15	tcgacggcga	gatcattggg	ctgtcgtct	tcaaacagga	ggacggcccc	aaggacgctc	7740
	acaaggcgca	tctgtccggc	gttttcgtgg	agcccgaaca	gcgaggccga	ggggtcgccg	7800
	gtatgctgct	gccccgcttg	ccggcgggtt	tattgctcgt	gatgatcgtc	cgacagattc	7860
	caacgggaat	ctggtggatg	cgcatcttca	tctcggcgc	acttaatat	tcgctattct	7920
	ggagcttggt	gtttatttcg	gtctaccgcc	tyccgggcyg	ggtcgcggcg	acggtagggc	7980
	ctgtgcagcc	gctgatggtc	gtgttcatct	ctgcgcctct	gctaggtagc	ccgatacgat	8040
	tgatggcggg	cctgggggct	atctgcggaa	ctgcgggctg	ggcgctggtg	gtgttgacac	8100
20	caaacgcagc	gctagatcct	gtcggcgtcg	cagcgggctt	ggcggggcg	gtttccatgg	8160
	cgttcggaac	cgtgctgacc	cgcaagtggc	aacctcccgt	gcctctgctc	acctttaccg	8220
	cctggcaact	ggcggccgga	ggacttctgc	tcgttccagt	agctttagtg	tttgatccgc	8280
	caatcccgat	gcctacagga	accaatgttc	tcggcctggc	gtggctcggc	ctgatcggag	8340
	cgggtttaac	ctacttcctt	tggttccggg	ggatctcgcg	actcgaacct	acagttgttt	8400
	ccttactggg	ctttctcagc	ccccgagcgc	ttagtgggaa	tttgtacccc	ttatcgaacc	8460
25	gggagcacag	gatgacgcct	aacaattcat	tcaagccgac	accgcttcgc	ggcgcggctt	8520

	aattcaggag ttaaacaatca tgaggggaagc ggtgatcgcc gaagtatcga ctcaactatc	8580
	agaggtagtt ggcgtcatcg agcgccatct cgaaccgacg ttgctggccg tacatttgta	8640
	cggctccgca gtggatggcg gcctgaagcc acacagtgat attgatttgc tggttacggt	8700
	gaccgtaagg cttgatgaaa caacgcggcg agctttgatc aacgaccttt tggaaacttc	8760
	ggcttccccct ggagagagcg agattctccg cgctgtagaa gtcaccattg ttgtgcacga	8820
5	cgacatcatt ccgtggcggt atccagctaa gcgcgaactg caatttgag aatggcagcg	8880
	caatgacatt cttgcaggta tcttcgagcc agccacgatc gacattgatc tggctatctt	8940
	gctgacaaaa gcaagagaac atagcgttgc cttggtaggt ccagcggcgg aggaactctt	9000
	tgatccgggt cctgaacagg atctatttga ggcgctaaat gaaaccttaa cgctatggaa	9060
	ctcgcggccc gactgggctg gcgatgagcg aatgtagtg cttacgttgt cccgcatttg	9120
	gtacagcgca gtaaccggca aaatcgcgcc gaaggatgtc gctgccgact gggcaatgga	9180
10	gcgcctgccg gccagatc agcccgtcat acttgaagct aggcaggctt atcttggaca	9240
	agaagatcgc ttggcctcgc gcgcagatca gttggaagaa tttgttact acgtgaaagg	9300
	cgagatcacc aaggtagtcg gcaaataatg tctaacaatt cgttcaagcc gacgccgctt	9360
	cgcgccgccc cttaaactca gcgttagaga gctgggggaag actatgcgcg atctgttgaa	9420
	ggtggttcta agcctcgtct tgcgatggca tttcgatcca ttcccattcc gcgctcaaga	9480
	tggcttcccc tcggcagttc atcagggcta aatcaatcta gccgacttgt ccggtgaaat	9540
	gggctgcact ccaacagaaa caatcaaaca aacatacaca gcgacttatt cacacgagct	9600
15	caaattacaa cggtatatat cctgccagtc agcatcatca cacaaaagt taggcccga	9660
	tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcget cttagccgta	9720
	caatattact caccggatcc taaccgggtg gatcatgggc cgcgattaaa aatctcaatt	9780
	atatttggtc taatttagtt tggattgag taaaacaaat tcgaaccaa ccaaaatata	9840
	aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gactttttat agaattttct ttaaaaaata	9900
	tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg ttaaatatga agtgctccat	9960
20	ttttattaac tttaaataat tggttgracg atcactttct tatcaagtgt tactaaaatg	10020
	cgccaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaacc tatcaaaatt cttatataatc	10080
	tttttcgaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta aatagaacat atcattattt	10140
	aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg ttaactttga aagtgtacat	10200
	caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc atgtgttatt aagaaaattc	10260
	tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa aaattaattt ttactaacac	10320
	atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa ataatttca tctaacaaaa	10380
25	aaaaaaccag aaaatgctga aaaccggca aaaccgaacc aatccaaacc gatatagttg	10440

gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcgggtcc atttgcaccc ctaatcataa 10500
 tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc aatatcctgg aaattttgca 10560
 aatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa gcagctcgat gtggtggtaa 10620
 tatgtaattt acttgattct aaaaaatat cccaagtatt aataatttct gctaggaaga 10680
 aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaatgaa ccataaagtg attgaagctc 10740
 5 gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca atgacttggg acaaaaagaaa 10800
 gtgatataat ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa gaatggcagt tttcctttgc 10860
 atgtaactat tatgctccct tcgttacaaa aattttggac tactattggg aacttcttct 10920
 gaaaatagtg gccaccgctt aattaaggcg cgccatgccc gggcaagcgg ccgcacaagt 10980
 ttgtacaaaa aagcaggctc cgcgcccgca ctaggtttaa actctagaag ctaggaattc 11040
 gcgcccgctt tcctgcatga catcgctctg cagagccaag cgcattgctta attaaactag 11100
 10 tctcccagta tcattatagt gaaagttttg gctctctcgc cgggtggtttt ttacctctat 11160
 ttaaaggggt tttccaccta aaaattctgg tatcattctc actttacttg ttactttaat 11220
 ttctcataat ctttggttga aattatcacg ctccgcaca cgatatccct acaaatat 11280
 tttttgtaa acattttcaa accgcataaa attttatgaa gtcccgtcta tctttaatgt 11340
 agtctaacat tttcatattg aatatataa tttacttaat tttagcgttg gtagaaagca 11400
 taatgattta ttcttattct tcttcatata aatgtttaat atacaatata acaaatctt 11460
 15 ttaccttaag aaggatttcc cattttatat tttaaaata tttttatcaa atatttttca 11520
 accacgtaaa tctcataata ataagttggt tcaaaagtaa taaaatttaa ctccataatt 11580
 tttttattcg actgatctta aagcaacacc cagtgcacaca actagccatt ttttctttg 11640
 aataaaaaaa tccaattatc attgtatttt ttttatacaa tgaaaatttc accaacaat 11700
 gatttgtggt atttctgaag caagtcattg tatgcaaaaat tctataattc ccatttgaca 11760
 ctacggaagt aactgaagat ctgcttttac atgcgagaca catcttctaa agtaatttta 11820
 ataatagtta ctatattcaa gatttcatat atcaaaact caatattact tctaaaaaat 11880
 20 taattagata taattaaaat attacttttt taattttaag ttttaattgtt gaatttgtga 11940
 ctattgattt attattctac tatgtttaaa ttgttttata gatagtttaa agtaaatata 12000
 agtaatgtag tagagtgtta gagtgttacc ctaaaccata aactataaga tttatggtgg 12060
 actaattttc atatatttct tattgctttt accttttctt ggtatgtaag tccgtaactg 12120
 gaattactgt gggttgccat gacactctgt ggtcttttgg ttcattgcatg gatcttgccg 12180
 aagaaaaaga caaagaacaa agaaaaaaga caaacagag agacaaaacg caatcacaca 12240
 25 accaactcaa attagtcact ggctgatcaa gatcgcggcg tccatgtatg tctaaatgcc 12300

	atgcaaagca	acacgtgctt	aacatgcact	ttaaattggct	cacccatctc	acacacaca	12360
	caaacacatt	gcctttttct	tcatcatcac	cacaaccacc	tgtatatatt	cattctcttc	12420
	cgccacctca	atctcttcac	ttcaacacac	gtcaacctgc	atatgcgtgt	catcccatgc	12480
	ccaaatctcc	atgcatgttc	caaccacctt	ctctcttata	taatacctat	aaatacctct	12540
	aatatcactc	acttctttca	tcatccatcc	atccagagta	ctactactet	actactataa	12600
5	taccccaacc	caactcatat	tcaatactac	tctaggtacc	ctgcagggat	ccaacaatgg	12660
	ccagcagttc	ttcaagtgtg	ccagaacttg	ccgcagcttt	ccctgatggg	acaacggact	12720
	tcaaaccat	gaggaacacc	aaaggctatg	atgtctccaa	acctcacatc	tctgaaacac	12780
	cgatgacttt	gaagaactgg	cacaaacatg	tgaactggct	caacaccaca	ttcattctct	12840
	ttgttccact	ggctggggtg	atctcaacct	attgggttcc	tcttcaatgg	aaaactgcag	12900
	tgtgggcagt	tgtgtactac	ttcaacactg	gacttgggat	cactgctggc	taccatagat	12960
	tgtgggcaca	ttctcttac	aaggccagct	tgccctctca	aatctacett	gccgcagttg	13020
10	gtgctggagc	cgttgaaggt	tccataagat	ggtggagcaa	cggacacaga	gcacatcaca	13080
	gatacacaga	cacagagaaa	gatccttact	cagtgaggaa	gggattgctc	tacagccaca	13140
	tgggttggat	gctcttgaag	cagaatccaa	agaagcaagg	gaggacggac	attactgatc	13200
	tgaatgagga	cccagttgtg	gtctggcaac	ataggaactt	tctcaagtgt	gtgatcttca	13260
	tggctttggt	ctttcccacc	cttgttgctg	gcctgggatg	gggagactac	tggggagggt	13320
	tcatctatgg	agggatcttg	agagtgttct	ttgttcagca	agccaccttc	tgtgtcaact	13380
	cacttgcaca	ttggcttggg	gatcaaccgt	ttgatgacag	aaactctcca	cgtgaccatg	13440
15	tcataactgc	tcttgtcacg	ctgggtgaag	gctatcacia	ctttcacat	gagtttccgt	13500
	cagactatag	aaatgcgatt	gagtggatc	agtatgaccc	cacgaagtgg	agcatttggg	13560
	tttgggaagca	acttggactt	gctcacaatc	tcaagcagtt	cagacagaat	gagatagaga	13620
	aggggaagggt	tcaacagttg	cagaagaaac	tggatcagaa	gagagcgaaa	cttgattggg	13680
	gaataccggt	ggaacaactc	cctgttgtgt	cttgggatga	ctttgttgaa	cagtcaaaga	13740
	atggcaaggc	atggattgct	gttgtggtg	tcattcacga	tgttgggtgac	ttcatcaagg	13800
20	atcatcctgg	tggacgtgct	ctcatcaact	ctgcgattgg	caaagatgcc	acagcgatct	13860
	tcaatggagg	tgtctacaat	cattcaaagt	ccgcacacaa	ccttctctcc	accatgaggg	13920
	ttggtgtcct	ccgtggaggg	tgcgaagtgg	agatatggaa	acgtgctcaa	agtgagaaca	13980
	aagatgtctc	tactgtgggt	gatagttctg	gcaaccgtat	tgtgagagct	ggtggacaag	14040
	ctaccaaagt	ggttcagcca	gtccctgggt	ctcaagcagc	ttgatgagta	gtagcttaa	14100
	tcacctagag	ctcggtcacc	tcgagtatca	aaatctatct	agaaatacac	aatattttgt	14160
25	tgcaggcttg	ctggagaatc	gatctgctat	cataaaaatt	acaaaaaat	tttatttgcc	14220

tcaattatTTt taggattggt attaaggacg cttaaattat ttgtcgggTc actacgcacTc 14280
 attgtgattg agaagatcag cgatacgaaa tattcgtagt actatcgata atttatttga 14340
 aaattcataa gaaaagcaaa cgttacatga attgatgaaa caatacaaaag acagataaaag 14400
 ccacgcacat ttaggatatt ggccgagatt actgaatatt gagtaagatc acggaatttc 14460
 tgacaggagc atgtcttcaa ttcagcccaa atggcagttg aaatactcaa accgccccat 14520
 5 atgcaggagc ggatcattca ttgtttgttt ggttgccttt gccaacatgg gagtccaagg 14580
 ttggcgcgcc gaccagctt tc 14602

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

<220>
 <223> Plásmido pDAB7331

10 <400> 66
 taaatttaaa ttcaattaat gcaatcttga ttttcaacaa cgaaggtaat ggcgtaaaaag 60
 aaaaaatgta tgttattgta ttgatctttc atgatgttga agcgtgccat aatatgatga 120
 tgtataatta aatatatac tgtcgcattt tattgaaatg gcactgttat ttcaaccata 180
 tctttgattc tgttacatga cacgactgca agaagtaaat aatagacgcc gttgttaaag 240
 aattgctatc atatgtgcct aactagaggg aatttgagcg tcagacctaa tcaaatatta 300
 caaaatatct cactctgtcg ccagcaatgg tgtaatcagc gcagacaaat ggcgtaaaga 360
 15 tcgcygaaaa acctccccga gtggcatgat agctgcctct gtattgctga tttagtcagc 420
 cttatttgac ttaagggTgc cctcgttagt gacaaattgc tttcaaggag acagccatgc 480
 cccacacttt gttgaaaaac aaattgcctt tggggagacg gtaaagccag ttgctcttca 540
 ataaggaatg tcgaggaggc aatgtaaccg cctctggtag tacacttctc taatccaaaa 600
 atcaatttgt attcaagata ccgcaaaaaa cttatggttt aaaccctgca ggactagtcc 660
 agaaggtaat tatccaagat gtagcatcaa gaatccaatg tttacgggaa aaactatgga 720
 20 agtattatgt aagctcagca agaagcagat caatatgcgg cacatatgca acctatgttc 780
 aaaaatgaag aatgtacaga tacaagatcc tatactgcca gaatacgaag aagaatacgt 840
 agaaattgaa aaagaagaac caggcgaaga aaagaatctt gaagacgtaa gcactgacga 900
 caacaatgaa aagaagaaga taaggTcggT gattgtgaaa gagacataga ggacacatgt 960
 aaggTggaaa atgtaagggc ggaaagtaac cttatcacia aggaatctta tccccacta 1020
 cttatccttt tatatttttc cgtgtcattt ttgcccttga gttttcctat ataaggaacc 1080
 25 aagttcggca tttgtgaaaa caagaaaaaa tttggtgtaa gctattttct ttgaagtact 1140

	gaggatacaa cttcagagaa atttgtaagt ttgtaggtag cagatctgga tcccaaacca	1200
	tgctcccga gaggagacca gttgagatta gcccagctac agcagctgat atggccgcgg	1260
	tttgtgatat cgtaaacat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg acagagccac	1320
	aaacaccaca agagtggatt gatgatctag agaggttgca agatagatac ctttggttg	1380
5	ttgctgaggt tgaggggtgt gtggctggtt ttgcttacgc tgggccctgg aaggctagga	1440
	acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttacgtgtc acatagggcat caaaggttg	1500
	gcctaggatc tacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcgcaa ggttttaagt	1560
	ctgtggttgc tgttataggc cttccaaacg atccatctgt taggttgcac gaggctttgg	1620
	gatacacagc ccggggtaca ttgcgcgcag ctggatacaa gcatggtgga tggcatgatg	1680
	ttggtttttg gcaaagggat tttgagttgc cagctcctcc aaggccagtt aggccagtta	1740
	cccaaactcg agtagttagc ttaatcacct agagctcgat cggcggcaat agcttcttag	1800
10	cgccatcccg ggttgatcct atctgtgttg aatagttgc ggtgggcaag gctctcttc	1860
	agaaagacag gcggccaaag gaaccaaggt tgaggtgggc tatggctctc agttccttgt	1920
	ggaagcgctt ggtctaaggt gcagaggtgt tagcgggatg aagcaaaagt gtccgattgt	1980
	aacaagatat gttgatccta cgtaaggata ttaaagtatg tattcatcac taatataatc	2040
	agtgtattcc aatatgtact acgatttcca atgtctttat tgtcgcgta tgtaatcggc	2100
	gtcacaaaat aatccccggt gactttcttt taatccagga tgaataata tgttattata	2160
	atttttgcga tttggtccgt tataggaatt gaagtgtgct tgaggtcggc cgccaccact	2220
15	cccatttcat aattttacat gtatttgaaa aataaaaatt tatggtattc aatttaaaca	2280
	cgtatactty taaagaatga tatcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa	2340
	taacaagtca ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt	2400
	cagaaatatt tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag	2460
	tgcgatatta tgggtgtaata cataggaatt cgtttaaacg atctgctctt aattttcggc	2520
	ccaacttgca caggaaagac gtcgaccggt gtagctcttg cccagcagac tgggcttcca	2580
20	gtccttttgc tcgatcgggt ccaatggtgt cctcagctgt gaaccggaag cggacgacca	2640
	acagtggaag aactgaaagg aacgagccgt ctataccttg atgatcggc tctggtgaag	2700
	ggtatcatcg cagccaagca agctcatgaa aggtgatggt gggaggtgta taattatgag	2760
	gcccacggcg ggcttattct ttaggaggga tctatctcgt tgctcaagtg catggcgcaa	2820
	agcagttatt ggagtgcgga ttttcgttgg catattattc gccacgagtt agcagacgaa	2880
	gagaccttca tgaacgtggc caaggccaga gttaagcaga tgttacgccc tgctgcaggc	2940
	ctttctatta tccaatagtt ggttgatctt tggaaagagc ctcggctgag gcccatactg	3000
25	aaagagatcg atggatatcg atatgccatg ttgtttgcta gccagaacca gatcacatcc	3060



gatatgctat tgcagcttga cgcagatatg gaggataagt tgattcatgg gattcctcag 3120
 gagtagctca tccatgcacg ccgacaagaa cagaaattcc gtcgagttaa cgcagccgct 3180
 tacgacggat tcgaaggcca tccattcgga atgtattagt ttgcaccagc tccgcgctcac 3240
 acctgtcttc atttgaataa gatgttagca attgttttta gctttgtctt gttgtggcag 3300
 ggccgcaagt gcttcagaca tcattctggt ttcaaatttt atgctggaga acagcttctt 3360
 5 aattcctttg gaaataatag actgcgcttt aaaattcaga tgtctggata tagatatgat 3420
 tgtaaaataa cctatttaag tgtcatttag aacataagtt ttatgaatgt tcttccattt 3480
 tcgtcatcga acgaataaga gtaaatacac cttttttaac attacaaata agttcttata 3540
 cgttgtttat acaccgggaa tcatttccat tattttcgcg caaaagtcac ggatattcgt 3600
 gaaagcgaca taaactgcga aatttgccgg gagtgccttg agtttgccctc gaggctagcg 3660
 catgcacata gacacacaca tcattctcatt gatgcttgggt aataattgtc attagattgt 3720
 10 ttttatgcat agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa cggatgtgac 3780
 ttcagtacat taaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgattt 3840
 acaattgaat atatctgcc ccagccagcc aacagctcga tttacaattg aatatacctt 3900
 gccggccggc ccacgcgtgt cgaggaattc tgatctggcc cccatttggga cgtgaatgta 3960
 gacacgctga aataaagatt tccgaattag aataatttgt ttattgcttt cgcctataaa 4020
 tacgacggat cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt tcattttata ataacgctgc 4080
 ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt ttctccatat 4140
 15 tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt 4200
 gaatatatcc tgccgccgct gccgctttgc acccgggtgga gcttgcattg ttggttctac 4260
 gcgaaactga gccggtttag cagataatth ccattgagaa ctgagccatg tgcaccttcc 4320
 cccaacacg gtgagcgacg gggcaacgga gtgatccaca tgggactttt aaacatcatc 4380
 cgtcggatgg cgttgcgaga gaagcagtcg atccgtgaga tcagccgacg caccgggcag 4440
 gcgcgcaaca cgatcgcaaa gtatttgaac gcaggtaaca tcgagccgac gttcacgcgg 4500
 20 aacgaccaag caagcttggc tgccattttt ggggtgaggc cgttcgcggc cgagggggcg 4560
 agccccctgg gggatgggag gcccgcgcta gcgggccggg agggttcgag aagggggggc 4620
 acccccttc ggcgtgcgcg gtcacgcgca cagggcgacg ccctggttaa aaacaaggtt 4680
 tataaatatt ggtttaaaag caggttaaaa gacaggttag cgggtggcca aaaacgggcg 4740
 gaaacccttg caaatgctgg attttctgcc tgtggacagc ccctcaatg tcaatagggtg 4800
 cgccccctcat ctgtcagcac tctgcccctc aagtgtcaag gatcgcgccc ctcatctgtc 4860
 25 agtagtcgcg cccctcaagt gtcaataccg cagggcactt atccccaggc ttgtccacat 4920

catctgtggg aaactcgcgt aaaatcaggc gtttctgccc atttgagagg ctggccagct 4980
 ccacgtcgcc ggccgaaatc gagcctgccc ctcatctgtc aacgcccggc ~~cggttgagtc~~ 5040
 ggccccctcaa gtgtcaacgt ccgccccctca tctgtcagtg agggccaagt tttccgcgag 5100
 gtatccacaa cgccggcggc cgcggtgtct cgcacacggc ttcgacggcg tttctggcgc 5160
 gtttgcaggg ccatagacgg ccgcccagccc agcggcgagg gcaaccagcc cggtgagcgt 5220
 5 cggaagggt cgacggatct tttccgctgc ataaccctgc ttcgggggtca ttatagcgt 5280
 ttttctggta tatccatcct ttttctgcag atatacagga ttttgccaaa gggttcgtgt 5340
 agactttcct tgggtgatcc aacggcgtca gccgggagc ataggtgaag taggcccacc 5400
 cgcgagcggg tgttccttct tcaactgtccc ttattcgac ctggcgggtgc tcaacgggaa 5460
 tcctgctctg cgaggctggc cggctaccgc cggcgtaaca gatgagggca agcggatggc 5520
 tgatgaaacc aagccaacca ggaagggcag cccacctatc aaggtgtact gccttccaga 5580
 cgaacgaaga gcgattgagg aaaagggcggc ggcgccggc atgagcctgt cggcctacct 5640
 10 gctggccgct ggccagggct acaaaatcac gggcgtcgtg gactatgagc acgtccgcga 5700
 gctggcccgc atcaatggcg acctggggcg cctggggcggc ctgctgaaac tctggctcac 5760
 cgacgacctg cgcacggcgc ggttcgggtga tgccacgac ctccgcccctgc tggcgaagat 5820
 cgaagagaag caggacgagc ttggcaaggt catgatgggc gtggtccgcc cgagggcaga 5880
 gccatgactt ttttagccgc taaaacggcc ggggggtgcg cgtgattgcc aagcacgtcc 5940
 ccatgctctc catcaagaag agcgaacttc cggagctggt attcgtgcag ggcaagattc 6000
 15 ggaataccaa gtacgagaag gacggccaga cggcttacgg gaccgacttc attgccgata 6060
 aggtggatta tctggacacc aaggcaccag gcgggtcaaa tcaggaataa gggcacattg 6120
 ccccgccgct agtcggggca atcccgaag gagggtgaat gaatcggacg tttgaccgga 6180
 aggcatacag gcaagaactg atcgacgcgg ggttttccgc cgaggatgcc gaaaccatcg 6240
 caagccgcac cgtcatgctg gcgccccgcg aaaccttcca gtccgtcggc tcgatggctc 6300
 agcaagctac ggccaagatc gagcgcgaca gcgtgcaact ggctccccct gccctgcccg 6360
 cgccatcggc cgccgtggag cgttcgcgct gtctcgaaca ggaggcggca ggtttggcga 6420
 20 agtcgatgac catcgacacg cgaggaacta tgacgaccaa gaagcgaaaa accgccggcg 6480
 aggacctggc aaaacaggtc agcgaggcca agcaggccgc gttgctgaaa cacacgaagc 6540
 agcagatcaa ggaaatgcag ctttcttctg tcgatattgc gccgtggccg gacacgatgc 6600
 gagcgtgcc aaacgacacg gcccgctctg ccctgttccac cacgcgcaac aagaaaatcc 6660
 cgcgcgaggc gctgcaaaac aaggtcattt tccacgtcaa caaggacgtg aagatcacct 6720
 acaccggcgt cgagctgagg gccgacgatg acgaactggt gtggcagcag gtggtggagt 6780
 25 acgcgaagcg caccctatc ggcgagccga tcaccttccac gttctacgag ctttgccagg 6840

	acctgggctg gtcgatcaat ggccgggtatt acacgaaggc cgaggaatgc ctgtcgcgcc	6900
	tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg accgcgttgg gcacctggaa tcggtgtcgc	6960
	tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg gcaagaaaac gtcccgttgc caggctctga	7020
	tcgacgagga aatcgtcgtg ctgtttgctg gcgaccacta cacgaaattc atatgggaga	7080
5	agtaccgcaa gctgtcggcg acggcccgcg ggatgttcga ctatttcagc tcgcaccggg	7140
	agccgtaccc gctcaagctg gaaaccttc gcctcatgtg cggatcggat tccaccgcg	7200
	tgaagaagtg gcgcgagcag gtcggcgaag cctgcgaaga gttgcgaggc agcggcctgg	7260
	tggaacacgc ctgggtcaat gatgacctgg tgcattgcaa acgctagggc cttgtgggg	7320
	cagttccggc tgggggttca gcagccagcg ctttactggc atttcaggaa caagcgggca	7380
	ctgctcgacg cacttgcttc gctcagtatc gctcgggacg cacggcgcgc tctacgaact	7440
	gccgataaac agaggattaa aattgacaat tgtgattaag gctcagattc gacggccttg	7500
10	agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat ccgattgtcg gccctgaaga aagctccaga	7560
	gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga gaaaaagccc atggaggcgt tcgctgaacg	7620
	gttgcgagat gccgtggcat tcggcgccta catcgacggc gagatcattg ggctgtcgg	7680
	cttcaaacag gaggacggcc ccaaggacgc tcacaaggcg catctgtccg gcgttttcgt	7740
	ggagcccga aagcagggcc gaggggtcgc cggatgctg ctgcgggcgt tgccggcggg	7800
	tttattgctc gtgatgatcg tccgacagat tccaacggga atctggtgga tgcgcatctt	7860
15	catcctcggc gcacttaata tttcgctatt ctggagcttg ttgtttattt cggctaccg	7920
	cctgccgggc ggggtcgcgg cgacggtagg cgctgtgcag ccgctgatgg tcgtgttcat	7980
	ctctgccgct ctgctaggta gcccgatacg attgatggcg gtcttggggg ctatttgcgg	8040
	aactgcgggc gtggcgcctgt tgggtgtgac accaaacgca gcgctagatc ctgtcggcgt	8100
	cgcagcgggc ctggcggggg cggtttccat ggcgttcgga accgtgctga cccgcaagt	8160
	gcaacctccc gtgcctctgc tcacctttac cgctggcaa ctggcggccg gaggacttct	8220
	gctcgttcca gtagctttag tgtttgatcc gccaatcccg atgcctacag gaaccaatgt	8280
20	tctcggcctg gcgtggctcg gcctgatcgg agcgggttta acctacttcc tttggttccg	8340
	ggggatctcg cgactcgaac ctacagttgt ttccttactg ggctttctca gccccgagc	8400
	gcttagtggg aatttgtacc ctttatcgaa ccgggagcac aggatgacgc ctaacaattc	8460
	attcaagccg acaccgcttc gcggcgcggc ttaattcagg agttaaacad catgagggaa	8520
	gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag ttggcgtcat cgagcgcct	8580
	ctcgaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg cagtggatgg cggcctgaag	8640
25	ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa ggcttgatga aacaacgcgg	8700

cgagctttga tcaacgacct tttggaact tggcttccc ctggagagag cgagattctc 8760

cgcgctgtag aagtcacat tgttgtgac gacgacatca ttccgtggcg ~~ttatccagct~~ 8820

aagcggaac tgcaatttg agaatggcag cgcaatgaca ttcttgagg tatcttcgag 8880

ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa aagcaagaga acatagcgtt 8940

gccttggtag gtccagcggc ggaggaactc ttgatccgg ttctgaaca ggatctattt 9000

5 gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgccgc ccgactgggc tggcgatgag 9060

cgaaatgtag tgcttacgtt gtcccgcatt tggtagcagc cagtaaccgg caaaatcgcg 9120

ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gacgcctgc cggcccagta tcagcccgtc 9180

atacttgaag ctaggcaggc ttatcttgg caagaagatc gcttggcctc gcgcgagat 9240

cagttggaag aatttgttca ctacgtgaaa ggcgagatca ccaaggtagt cggcaaataa 9300

tgtctaaca ttcgttcaag ccgacgccgc ttcgcccgc ggcttaactc aagcgttaga 9360

gagctgggga agactatgcg cgatctgttg aaggtggtc taagcctcgt cttgcatgg 9420

10 catttcgatc cattcccatt ccgctctca gatggcttcc cctcggcagt tcacagggc 9480

taaatcaatc tagccgactt gtccggtgaa atgggctgca ctccaacaga aacaatcaaa 9540

caaacataca cagcgactta ttcacacgag ctcaaattac aacggtatat atcctgccag 9600

tcagcatcat cacacaaaa gttaggcccg aatagtttga aattagaag ctcgcaattg 9660

aggtctacag gccaaattcg ctcttagccg tacaatatta ctaccggat cctaaccggt 9720

gtgatcatgg gccgcgatta aaaatctcaa ttatatttg tctaatttag tttggtattg 9780

15 agtaaaaca attcgaacca aacaaaaata taaatatata gttttatat atatgccttt 9840

aagacttttt atagaatttt ctttaaaaa tatctagaaa tatttgcgac tcttctggca 9900

tgtaaatattt cgtaaatat gaagtgtcc atttttatta actttaaata attggttga 9960

cgatcacttt cttatcaagt gttactaaaa tgcgtcaatc tcttgttct tccatattca 10020

tatgtcaaaa cctatcaaaa ttcttatata tctttttcga atttgaagtg aaatttcgat 10080

aatttaaaat taaatagaac atatcattat ttaggtatca tattgatttt tatacttaat 10140

tactaaattt ggttaacttt gaaagtgtac atcaacgaaa aattagtcaa acgactaaaa 10200

20 taaataaata tcatgtgtta ttaagaaaat tctctataa gaatatttta atagatcata 10260

tgtttgtaaa aaaaattaat ttttactaac acatatattt acttatcaaa aatttgacaa 10320

agtaagatta aaataatatt catctaaca aaaaaaac agaaaatgct gaaaaccg 10380

caaaaccgaa ccaatccaaa ccgatatagt tggtttggtt tgattttgat ataaaccgaa 10440

ccaactcggc ccatgtgac ccctaatcat aatagcttta atattcaag atattattaa 10500

gttaacgttg tcaatctct ggaaatttg caaatgaat caagcctata tggctgtaat 10560

25 atgaatttaa aagcagctcg atgtggtggt aatagtaat ttacttgatt ctaaaaaat 10620

atcccaagta ttaataatTT ctgctaggaa gaaggTTagc tacgattTtac agcaaagcca 10680

gaatacaatg aaccataaag tgattgaagc tcgaaatata cgaaggaaca aatattTTta 10740

aaaaaatacg caatgactTg gaacaaaaga aagtgatata tttttTgTtc ttaaacaagc 10800

atcccctcta aagaatggca gttttcTttt gcatgtaact attatgctcc cttcgTtaca 10860

5 aaaattTtTgg actactattg ggaactTctt ctgaaaatag tggccaccgc ttaat 10915

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

<220>
<223> Promotor v2 PVPhas

<400> 67

10 ctccccagtat cattatagTg aaagTttTgg ctctctcgcc gTgTgTttTt tacctctatt 60

taaaggggTt tTccacTtaa aaattctggt atcattctca cTttactTgt tactTTaatt 120

tctcataatc tTtggtTgaa attatcacgc tTccgcacac gatatcccta caaattTatt 180

attTgtTaaa cattTtcaaa ccgcataaaa tTttatgaag tcccgtctat cTttaatgta 240

gtctaacatt tTcatattga aatatataat tTactTtaatt ttagcgtTg tagaaagcat 300

aatgattTat tcttattctt cTtcatataa atgtTtaata tacaatataa acaaattctt 360

taccttaaga aggattTccc attTtatatt tTaaaaatat attTatcaaa tattTttcaa 420

15 ccacgTaaat ctcataataa taagTtgTtt caaaagTaat aaaattTaac tccataattt 480

tTttattcga ctgatctTaa agcaacacc agtgacacaa ctagccattt tTttctTtga 540

ataaaaaaat ccaattatca tTgtattTtt tTtatacaat gaaaattTca ccaacaatg 600

attTgtgTta tTtctgaagc aagTcatgTt atgcaaaatt ctataattcc cattTgacac 660

tacggaagta actgaagatc tgctTttaca tgcgagacac atctTctaaa gtaattTtaa 720

taatagTtac tatattcaag attTcatata tcaaatactc aatattactt cTaaaaaatt 780

aattagatat aattaaaata tTactTttTt aattTtaagt tTaatTgtTg aattTgtgac 840

20 tattgattTta ttattctact atgtTtaaat tgTtttatag atagTttaaa gTaaatataa 900

gTaatgtagt agagTgTtag agTgTtacc taaaccataa actataagat tTatgTgTga 960

ctaattTtca tatattTctt attgctTttta cTttTctTg gTatgTaaTt ccgTaaactg 1020

aattactgTg gTttgccatg aactctgTg gTctTttgTt tcatgcatgTg atctTgTgca 1080

agaaaaagac aaagaacaaa gaaaaaagac aaaacagaga gacaaaacgc aatcacacaa 1140

ccaactcaaa ttagTcactg gctgatcaag atcgccgct ccatgTatgt cTaaatgcca 1200

25 tgcaaagcaa cacgtgctta acatgcactt taaatggctc acccatctca acccacacac 1260

	aaacacattg ccttttctt catcatcacc acaaccacct gtatatattc attctttcc	1320
	gccacctcaa tttcttcact tcaacacacg tcaacctgca tatgcgtgtc atcccatgcc	1380
	caaatctcca tgcattgtcc aaccacctc tctcttatat aatacctata aatacctcta	1440
	atatcact	1448
5	<210> 68 <211> 85 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> PvPhas 5' UTR	
	<400> 68 cacttctttc atcatccatc catccagagt actactactc tactactata ataccccaac	60
	ccaactcata ttcaatacta ctcta	85
10	<210> 69 <211> 129 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> PvPhas 3' UTR v1	
	<400> 69 agtatgaact aaaatgcatg taggtgtaag agctcatgga gagcatggaa tattgtatcc	60
	gaccatgtaa cagtataata actgagctcc atctcactc ttctatgaat aaacaaagga	120
15	tgttatgat	129
	<210> 70 <211> 1088 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> PvPhas 3' MAR v2	
20	<400> 70 atattaacac tctatctatg caccttattg ttctatgata aatttctctt tattattata	60
	aatcatctga atcgtgacgg cttatggaat gcttcaaata gtacaaaaac aatgtgtac	120
	tataagactt tctaaacaat tctaacttta gcattgtgaa cgagacataa gtgttaagaa	180
	gacataacaa ttataatgga agaagtttgt ctccatttat atattatata ttaccactt	240
	atgtattata ttaggatggt aaggagacat aacaattata aagagagaag tttgtatcca	300
	tttatatatt atatactacc catttatata ttatacttat ccacttattt aatgtcttta	360
	taaggtttga tccatgatat ttctaattt ttagtgtgata tgtatatgaa aaggactat	420
25	ttgaactctc ttactctgta taaaggttgg atcatcctta aagtgggtct atttaatttt	480

	attgcttctt acagataaaa aaaaaattat gagttggttt gataaaatat tgaaggattt	540
	aaaataataa taaataataa ataacatata atatatgtat ataaatttat tataatataa	600
	catttatcta taaaaaagta aatattgtca taaatctata caatcgttta gccttgctgg	660
	aacgaatctc aattatttaa acgagagtaa acatatttga ctttttggtt atttaacaaa	720
	ttattattta acactatag aaattttttt tttttatcag caaagaataa aattaaatta	780
5	agaaggacaa tgggtgccca atccttatac aaccaacttc cacaagaaag tcaagtcaga	840
	gacaacaaaa aaacaagcaa aggaaatttt ttaatttgag ttgtcttggt tgctgcataa	900
	tttatgcagt aaaacactac acataaccct tttagcagta gagcaatggt tgaccgtgtg	960
	cttagcttct tttattttat tttttatca gcaaagaata aataaaataa aatgagacac	1020
	ttcagggatg tttcaaccct tatacaaaaac cccaaaaaca agtttcctag caccctacca	1080
	acgaattc	1088
10	<210> 71	
	<211> 457	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> AtuORF 3' UTR v1	
	<400> 71	
	tatcaaaatc tatttagaaa tacacaatat tttgttgag gcttgctgga gaatcgatct	60
15	gctatcataa aaattacaaa aaaattttat ttgcctcaat ttttttagga ttggtattaa	120
	ggacgcttaa attatttgtc gggtcactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata	180
	cgaaatattc gtagtactat cgataattta tttgaaaatt cataagaaaa gcaaacgta	240
	catgaattga tgaacaata caaagacaga taaagccacg cacatttagg atattggccg	300
	agattactga atattgagta agatcacgga atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag	360
	cccaaatggc agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca ggagcggatc attcattggt	420
	tgtttggttg cctttgccaa catgggagtc caaggtt	457
20	<210> 72	
	<211> 68	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Residuos 1-68 de AnD9DS de Terminal-N	
	<400> 72	
25	Met Ser Ala Pro Thr Ala Asp Ile Arg Ala Arg Ala Pro Glu Ala Lys	
	1 5 10 15	

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

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

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

Trp Ala Val Ile
65

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

10 <220>
<223> Residuos 281-455 de AnD9DS de Terminal-C

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 74
 <211> 14103
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

<220>
 <223> **Plásmido pDAB110110**

<400> 74

gtacaaaaaa gcaggcttct agacctaggt ggagtcacatca cgcagactat ctcagcatgt 60
 gcgtagcacg cggccgcctc ccagtatcat tatagtgaaa gttttggctc tctcgcgggt 120
 ggtttttttac ctctatttaa aggggttttc cacctaaaaa ttctggtatc attctcactt 180
 10 tacttgttac ttttaatttct cataatcttt ggttgaaatt atcacgcttc cgcacacgat 240
 atccctacaa atttattatt tgttaaacad tttcaaaccg cataaaattt tatgaagtcc 300
 cgtctatctt taatgtagtc taacattttc atattgaaat atataattta ctttaatttta 360
 gcgttggttag aaagcataat gatttattct tattcttctt catataaatg tttaatatac 420
 aatataaaca aattctttac cttaagaagg atttcccatt ttatatttta aaaatatatt 480
 tatcaaatat tttcaacca cgtaaactc ataataataa gttggttcaa aagtaataaa 540
 15 atttaactcc ataatttttt tattcgactg atcttaaagc aacaccagat gacacaacta 600
 gccatttttt tctttgaata aaaaaatcca attatcattg tatttttttt atacaatgaa 660
 aatttcacca aacaatgatt tgtggtattt ctgaagcaag tcatgttatg caaaattcta 720
 taattcccat ttgacactac ggaagtaact gaagatctgc ttttcatgac gagacacatc 780
 ttctaaagta attttaataa tagttactat attcaagatt tcatatatca aatactcaat 840
 attacttcta aaaaattaat tagatataat taaaatatta cttttttaat ttttaagtta 900
 attggtgaat ttgtgactat tgatttatta ttctactatg tttaaattgt tttatagata 960
 20 gtttaaagta aatataagta atgtagtaga gtggttagagt gttaccctaa accataaact 1020
 ataagattta tgggtgacta attttcatat atttcttatt gcttttacct tttcttggtta 1080
 tgtaagtccg taactggaat tactgtgggt tgccatgaca ctctgtggtc ttttggttca 1140
 tgcattggatc ttgcaaga aaaagacaaa gaacaaagaa aaaagacaaa acagagagac 1200
 aaaacgcaat cacacaacca actcaaatta gtcactggct gatcaagatc gccgcgtcca 1260
 tgtatgtcta aatgccatgc aaagcaacac gtgcttaaca tgcactttaa atggctcacc 1320
 25 catctcaacc cacacacaaa cacattgcct ttttcttcat catcaccaca accacctgta 1380

	tatattcatt ctcttccgcc acctcaatth cttcacttca acacacgtca acctgcatat	1440
	gcgtgtcadc ccattgcccac atctccatgc atgttccaac cacctttctct cttataataat	1500
	acctataaat acctctaata tcaactcaatt ctttcatcat ccattccatcc agagtactac	1560
	tactctacta ctataatacc ccaacccaac tcatattcaa tactactcta ggatccaaca	1620
	atggctgcac ttgatagcat ccttgaggac aaagcaacta gctccaagtc aaccacata	1680
5	cagtaccaag aggtcacgtt taggaactgg tacaagaaaa tcaactggct caacacgacc	1740
	cttgtttgccc tcattcctgc tcttgggttg tacttgacga gaaccacacc tctcaccaga	1800
	cctaccctca tttggctctgt tctctactat ttctgtacag cgtttggcat cactgggtggc	1860
	taccacagac tttggctcca taggtcttac agtgcgaggt tgccattgag actcttctctg	1920
	gctttcactg gagctgggtgc gatccaaggt tctgcaagat ggtggctcagc caatcatagg	1980
	gcacatcacc gttggacgga caccatgaag gaccctact ctgtgatgag aggactgctg	2040
10	ttctcccaca taggttggat ggttctcaac tctgatccaa aggtcaaagg cagaacagat	2100
	gtttctgadc ttgactctga tcccgtcgtt gtgtggcaac acaaacacta tggcaagtgt	2160
	ttgctctttg ccgcttggat ctttccgatg atagtggctg ggctgggttg gggagattgg	2220
	tggggtgagc ttgtctatgc tggcatcata cgtgcctgct ttgttcagca agccactttc	2280
	tgtgtcaact cattggcaca ttggataggt gaacaaccgt ttgatgacag acgtactcca	2340
	agggatcatg ttctgactgc gttggtcaca atgggagaag gataccaca cttccacat	2400
	gagtttccga gtgactacag aaatgccatc atttggatc agtatgacc tacaagtgg	2460
15	ctcatctatc tcttcagctt gggctccctc ccattggcct actctctcaa gaccttccgt	2520
	tccaatgaga ttgagaaagg aaggcttcag caacagcaaa aggtctctga caagaaaaga	2580
	agtggctctg attggggact tctctcttc cagcttccag tgatctcatg ggatgacttt	2640
	caagctcgtt gcaaagaaag tggagagatg cttgttgctg ttgctggagt gatccatgat	2700
	gtctcccagt tcattgaaga tcatcctggt gggaggagcc tcattagaag tgctgttggg	2760
	aaagatggga ctggcatggt caatggtgga gtgtatgaac attcaaacgc cgcacacaac	2820
20	ttgctgagca caatgagagt tggagtcttg agaggtggac aagaagtgga ggtttggaag	2880
	aaacagaggg tggatgttct tgggaagtca gacattcttc gtcaagtgc aagggtggag	2940
	cgtctgggtg aaggagctgt tgcagcgtga tgagtagtta gcttaatcac cttagactcg	3000
	gtcaccagta tgaactaaaa tgcattgtag tgtaagagct catggagagc atggaatatt	3060
	gtatccgacc atgtaacagt ataataactg agctccatct cacttcttct atgaataaac	3120
	aaaggatggt atgatattt aacctctat ctatgcacct tattgttcta tgataaattt	3180
	cctcttatta ttataaatca tctgaatcgt gacggcttat ggaatgcttc aaatagtaca	3240
25	aaaacaaatg tgtactataa gactttctaa acaattctaa ctttagcatt gtgaacgaga	3300

	cataagtgtt aagaagacat aacaattata atggaagaag tttgtctcca tttatatatt	3360
	atatattacc cacttatgta ttatattagg atgttaagga gacataacaa ttataaagag	3420
	agaagtttgt atccatttat atattatata ctaccattt atatattata cttatccact	3480
	tatttaatgt ctttataagg tttgatccat gatatttcta atatttttagt tgatattgat	3540
	atgaaaagggt actatttgaa ctctcttact ctgtataaag gttggatcat ccttaaagtg	3600
5	ggtctattta attttattgc ttcttacaga taaaaaaaa attatgagtt ggtttgataa	3660
	aatattgaag gatttaaaat aataataaat aataaataac atataatata tgtatataaa	3720
	tttattataa tataacattt atctataaaa aagtaaataat tgcataaat ctatacaatc	3780
	gtttagcctt gctggaacga atctcaatta tttaaacgag agtaaacata tttgactttt	3840
	tggttattta acaaattatt atttaacact atatgaaatt tttttttttt atcagcaaag	3900
	aataaaaatta aattaagaag gacaatggtg tcccaatcct tataacaacca acttccacaa	3960
10	gaaagtcaag tcagagacaa caaaaaaaca agcaaaggaa attttttaat ttgagttgct	4020
	ttgtttgctg cataatttat gcagtaaaac actacacata acccttttag cagtagagca	4080
	atggttgacc gtgtgcttag cttcttttat tttatttttt tatcagcaaa gaataaataa	4140
	aataaaatga gacacttcag ggatgtttca acccttatac aaaaccccaa aaacaagttt	4200
	cctagcacc taccaacgaa ttcgcggccg ctttaattaag atgagtgata ctcaggactc	4260
	aggactcact ctgctgatca ctagtgctag cctcgaggtc gaccagcttt cttgtacaaa	4320
15	gtggttgccg ccgcttaatt aaatttaaat tcaattaatg caatcttgat tttcaacaac	4380
	gaaggtaatg gcgtaaaaga aaaaatgtat gttattgtat tgatctttca tgatgttgaa	4440
	gcgtgccata atatgatgat gtataattaa aatattaact gtcgcatttt attgaaatgg	4500
	cactgttatt tcaaccatat ctttgattct gttacatgac acgactgcaa gaagtaataa	4560
	atagacgccg ttgttaaaga attgctatca tatgtgccta actagagggga atttgagcgt	4620
	cagacctaata caaatattac aaaatatctc actctgtcgc cagcaatggt gtaatcagcg	4680
	cagacaaatg gcgtaaagat gcggaaaaa cctccccgag tggcatgata gctgcctctg	4740
20	tattgctgat ttagtcagcc ttatttgact taagggtgcc ctcgtttagt acaaatgct	4800
	ttcaaggaga cagccatgcc ccacactttg ttgaaaaaca aattgccttt ggggagacgg	4860
	taaagccagt tgctcttcaa taaggaatgt cgaggaggca atgtaaccgc ctctggtagt	4920
	acacttctct aatccaaaaa tcaatttgta ttcaagatac cgcaaaaaac ttatggttta	4980
	aaccctgcag gactagtcca gaaggtaatt atccaagatg tagcatcaag aatccaatgt	5040
	ttacgggaaa aactatggaa gtattatgta agctcagcaa gaagcagatc aatatgcggc	5100
25	acatatgcaa cctatgttca aaaatgaaga atgtacagat acaagatcct atactgccag	5160

aatacgaaga agaatacgtg gaaattgaaa agaagaacc aggcgaagaa aagaatcttg 5220
 aagacgtaag cactgacgac aacaatgaaa agaagaagat aaggtcggg ~~atttctgaaag~~ 5280
 agacatagag gacacatgta aggtggaaaa tgtaaggcg gaaagtaacc ttatcacaaa 5340
 ggaatcttat cccccactac ttatcctttt atatctttcc gtgtcatttt tgccttgag 5400
 ttttcctata taaggaacca agttcggcat ttgtgaaaac aagaaaaaat ttggtgtaag 5460
 5 ctatcttctt tgaagtactg aggatacaac ttcagagaaa tttgtaagt ttaggtacc 5520
 agatctggat cccaaccat gtctccggag aggagaccag ttgagattag gccagctaca 5580
 gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gttaccatt acattgagac gtctacagtg 5640
 aacttttagga cagagccaca aacaccaca gagtggattg atgatctaga gaggttcaa 5700
 gatagatacc ctggttggt tgctgagggt gagggtggtg tggctggtat tgcttacgct 5760
 gggccctgga aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt ttacgtgtca 5820
 cataggcac aaaggttggg ctaggatct acattgtaca cacatttctg taagtctatg 5880
 10 gaggcgcaag gttttaagtc tgtggttct gttataggcc ttccaaacga tccatctgtt 5940
 aggttgcag aggtcttggg atacacagcc cggggtacat tgcgcgagc tggatacaag 6000
 catggtggat ggcagatgt tggtttttg caaagggtt ttgagttgcc agctctcca 6060
 aggccagtta ggccagttac ccaaatctga gtagttagct taatcaccta gagctcgatc 6120
 ggcggcaata gcttcttagc gccatcccgg gttgatccta tctgtgttga aatagttgag 6180
 gtgggcaagg ctctctttca gaaagacagg cggccaaagg aaccaagggt gaggtgggct 6240
 15 atggctctca gttccttctg gaagcgttg gtctaagggtg cagaggtggt agcgggatga 6300
 agcaaaagtg tccgattgta acaagatag ttgatcctac gtaaggatat taaagtatgt 6360
 attcatcact aatataatca gtgtattcca atatgtacta cgatttccaa tgtctttatt 6420
 gtcgccgtat gtaatcggcg tcacaaaata atccccggtg actttctttt aatccaggat 6480
 gaaataatat gttattataa tttttgcat ttggtccgtt ataggaattg aagtgtgctt 6540
 gaggtcggtc gccaccactc ccatttcata attttcatg ttttgaaaa ataaaaattt 6600
 atggtattca atttaaaccac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag aaatatagtt 6660
 20 taaatattta ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt 6720
 attgatgcaa gtttaaattc agaaatattt caataactga ttatatcagc tggtagattg 6780
 ccgtagatga aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac ataggaattc gtttaaaccga 6840
 tctgctgcta attttcggtc caacttgac aggaaagacg tcgaccggtg tagctcttgc 6900
 ccagcagact gggcttccag tcttttcgct cgatcgggtc caatgttctc ctcagctgtg 6960
 aaccggaagc ggacgaccaa cagtggaaga actgaaagga acgagccgtc tataccttga 7020
 25 tgatcggcct ctggtgaagg gtatcatcgc agccaagcaa gctcatgaaa ggctgatggg 7080

	ggaggtgat	aattatgagg	cccacggcgg	gcttattctt	tagggaggat	ctatctcgtt	7140
	gctcaagtgc	atggcgcaa	gcagttattg	gagtgcggat	tttcgttggc	atattattcg	7200
	ccacgagtta	gcagacgaag	agaccttcat	gaacgtggcc	aaggccagag	ttaagcagat	7260
	gttacgccct	gctgcaggcc	tttctattat	ccaatagttg	gttgatcttt	ggaaagagcc	7320
	tcggctgagg	cccatactga	aagagatcga	tggatatcga	tatgccatgt	tgtttgctag	7380
5	ccagaaccag	atcacatccg	atatgctatt	gcagcttgac	gcagatatgg	aggataagtt	7440
	gattcatggg	atcgtcagg	agtagctcat	ccatgcacgc	cgacaagaac	agaaattccg	7500
	tcgagttaac	gcagccgctt	acgacggatt	cgaaggctcat	ccattcggaa	tgtattagtt	7560
	tgcaccagct	ccgcgtcaca	cctgtcttca	tttgaataag	atgttagcaa	ttgttttag	7620
	ctttgtcttg	ttgtggcagg	gcggaagtg	cttcagacat	cattctgttt	tcaaatttta	7680
	tgctggagaa	cagcttctta	attccttgg	aaataataga	ctgcgtctta	aaattcagat	7740
10	gtctggatat	agatatgatt	gtaaaataac	ctatttaagt	gtcatttaga	acataagttt	7800
	tatgaatgtt	cttccatttt	cgatcagaa	cgaataagag	taaatacacc	tttttaaca	7860
	ttacaaataa	gttcttatac	gttgtttata	caccgggaat	catttccatt	attttcgctc	7920
	aaaagtcacg	gatattcgtg	aaagcgacat	aaactgcgaa	atgtgcgggg	agtgtcttga	7980
	gtttgcctcg	aggctagcgc	atgcacatag	acacacacat	catctcattg	atgcttggtg	8040
	ataattgtca	ttagattggt	tttatgcata	gatgcactcg	aatcagcca	attttagaca	8100
15	agtatcaaac	ggatgtgact	tcagtacatt	aaaaacgtcc	gcaatgtggt	attaagttgt	8160
	ctaagcgtca	atgtgattta	caattgaata	tatcctgccc	cagccagcca	acagctcgat	8220
	ttacaattga	atatatcctg	ccggccggcc	cacgcgtgtc	gaggaattct	gatctggccc	8280
	ccatttgagc	gtgaatgtag	acacgtcga	ataaagattt	ccgaattaga	ataatttggt	8340
	tattgctttc	gcctataaat	acgacggatc	gtaattgtc	gttttatcaa	aatgtacttt	8400
	cattttataa	taacgctgcg	gacatctaca	ttttgaatt	gaaaaaaaaat	tggttaattac	8460
	tctttctttt	tctccatatt	gaccatcata	ctcattgctg	atccatgtag	atttcccgga	8520
20	catgaagcca	tttacaattg	aatatatacct	gccgccgctg	ccgctttgca	cccgggtggag	8580
	cttgcattgt	ggtttctacg	cagaactgag	ccggttaggc	agataatttc	cattgagaac	8640
	tgagccatgt	gcaccttccc	cccaacacgg	tgagcgacgg	ggcaacggag	tgatccacat	8700
	gggactttta	aacatcatcc	gtcggatggc	gttgcgagag	aagcagtcga	tccgtgagat	8760
	cagccgacgc	accgggcagg	cgcgcaacac	gatcgcaaag	tatttgaacg	caggtacaat	8820
	cgagccgacg	ttcacgcgga	acgaccaagc	aagcttggct	gccatttttg	gggtgaggcc	8880
25	gttcgcggcc	gagggcgca	gcccctgggg	ggatgggagg	cccgcgttag	cgggccggga	8940

	gggttcgaga	agggggggca	cccccttcg	gcgtgcgcgg	tcacgcgcac	agggcgcagc	9000
	cctggttaaa	aacaaggttt	ataaatattg	gtttaaagc	aggttaaaag	acaggttagc	9060
	ggtggccgaa	aaacgggcgg	aaacccttgc	aaatgctgga	ttttctgcct	gtggacagcc	9120
	cctcaaagt	caataggtgc	gcccctcatc	tgtcagcact	ctgcccctca	agtgtcaagg	9180
	atcgcgcccc	tcatctgtca	gtagtcgcgc	ccctcaagtg	tcaataccgc	agggcactta	9240
5	tccccaggct	tgtccacatc	atctgtggga	aactcgcgta	aaatcaggcg	ttttcgccga	9300
	tttgcgaggc	tggccagctc	cacgtcgccg	gccgaaatcg	agcctgcccc	tcatctgtca	9360
	acgccgcgcc	gggtgagtcg	gcccccaag	tgtcaacgtc	cgccccctcat	ctgtcagtga	9420
	gggccaagtt	ttccgcgagg	tatccacaac	gccggcggcc	gcggtgtctc	gcacacggct	9480
	tcgacggcgt	ttctggcgcg	tttgaggggc	catagacggc	cgccagccca	gcggcgaggg	9540
	caaccagccc	ggtgagcgtc	ggaaagggtc	gacggatctt	ttccgctgca	taaccctgct	9600
	tcggggtc	tatagcgatt	ttttcggtat	atccatcctt	tttcgcacga	tatacaggat	9660
10	tttgccaaag	ggttcgtgta	gactttcctt	ggtgtatcca	acggcgtcag	ccgggcagga	9720
	taggtgaagt	aggcccaccc	gcgagcgggt	gttccttctt	cactgtccct	tattcgcacc	9780
	tggcggtgct	caacgggaat	cctgctctgc	gaggctggcc	ggctaccgcc	ggcgtaacag	9840
	atgagggcaa	gcggatggct	gatgaaacca	agccaaccag	gaagggcagc	ccacctatca	9900
	aggtgtactg	ccttccagac	gaacgaagag	cgattgagga	aaaggcggcg	gcggccggca	9960
	tgagcctgtc	ggcctacctg	ctggccgctg	gccagggcta	caaaatcacg	ggcgtcgtgg	10020
15	actatgagca	cgcccgcgag	ctggcccgca	tcaatggcga	cctgggccgc	ctgggcggcc	10080
	tgctgaaact	ctggctcacc	gacgaccgcg	gcacggcgcg	gttcggtgat	gccacgatcc	10140
	tcgccctgct	ggcgaagatc	gaagagaagc	aggacgagct	tggcaaggtc	atgatggcg	10200
	tggctccgcc	gagggcagag	ccatgacttt	tttagccgct	aaaacggccg	gggggtgcgc	10260
	gtgattgcca	agcacgtccc	catgcgctcc	atcaagaaga	gcgacttcgc	ggagctggta	10320
	ttcgtgcagg	gcaagattcg	gaataccaag	tacgagaagg	acggccagac	ggtctacggg	10380
	accgacttca	ttgccgataa	ggtggattat	ctggacacca	aggcaccagg	cgggtcaaat	10440
20	caggaataag	ggcacattgc	cccggcgtga	gtcggggcaa	tcccgaagg	agggatgaatg	10500
	aatcggacgt	ttgaccggaa	ggcatacagg	caagaactga	tcgacgcggg	gttttccgcc	10560
	gagyatgccg	aaaccatcgc	aagccgcacc	gtcatgcgtg	cgccccgcga	aaccttccag	10620
	tccgtcggct	cgatggtcca	gcaagctacg	gccaagatcg	agcgcgacag	cgtgcaactg	10680
	gtccccctg	ccctgcccgc	gccatcggcc	gccgtggagc	gttcgcgctg	tctcgaacag	10740
	gagggcggcag	gtttggcgaa	gtcgatgacc	atcgacacgc	gaggaactat	gacgaccaag	10800
25	aagcgaaaaa	ccgccggcga	ggacctggca	aaacagggtca	gcgaggccaa	gcaggccgcg	10860



ttgctgaaac acacgaagca gcagatcaag gaaatgcagc tttccttgtt cctggtcacc 10980
 ccgtggcccg acacgatgcg agcgatgcca aacgacacgg cccgctctgc cctggtcacc 10980
 acgcgcaaca agaaaatccc gcgcgagggc ctgcaaaaca aggtcatttt ccacgtcaac 11040
 aaggacgtga agatcaccta caccggcgtc gagctgctgg cgcacgatga cgaactggtg 11100
 tggcagcagg tgttggagta cgcgaagcgc acccctatcg gcgagccgat caccttcacg 11160
 5 ttctacgagc tttgccagga cctgggctgg tcgatcaatg gccggtatta cacgaaggcc 11220
 gaggaatgcc tgctcgcgct acaggcgacg gcgatgggct tcacgtccga ccgcgttggg 11280
 cacctggaat cgggtgctgct gctgcaccgc ttccgcgtcc tggaccgtgg caagaaaacg 11340
 tcccgttggc aggtcctgat cgacgaggaa atcgtcgtgc tgtttgctgg cgaccactac 11400
 acgaaattca tatgggagaa gtaccgcaag ctgtcgcgca cggcccgcgc gatgttcgac 11460
 tatttcagct cgcaccggga gccgtacccg ctcaagctgg aaaccttccg cctcatgtgc 11520
 10 ggatcggatt ccaccgcgt gaagaagtgg cgcgagcagg tcggcgaagc ctgcaagag 11580
 ttgcgaggca gcggcctggt ggaacacgcc tgggtcaatg atgacctggt gcattgcaaa 11640
 cgctagggcc ttgtggggtc agttccggct gggggttcag cagccagcgc tttactggca 11700
 tttcaggaac aagcgggcac tgctcgacgc acttgcttcg ctcagtatcg ctcgggacgc 11760
 acggcgcgct ctacgaactg ccgataaaca gaggattaaa attgacaatt gtgattaagg 11820
 ctgagattcg acggccttga gcggccgcgc tgcaggattt ccgcgagatc cgattgtcgg 11880
 15 ccctgaagaa agctccagag atgttcgggt ccgtttacga gcacgaggag aaaaagccca 11940
 tggaggcgtt cgctgaacgg ttgcgagatg ccgtggcatt cggcgcctac atcgacggcg 12000
 agatcattgg gctgtcggtc ttcaaacagg aggacggccc caaggacgct cacaaggcgc 12060
 atctgtccgg cgttttcgtg gagcccgaac agcgaggccg aggggtcggc ggtatgctgc 12120
 tgccggcgtt gccggcgggt ttattgctcg tgatgatcgt ccgacagatt ccaacgggaa 12180
 tctggtggat gcgcatttc atcctcggcg cacttaatat ttcgctattc tggagcttgt 12240
 tgtttatttc ggtctaccgc ctgccggcg gggtcgcggc gacggtaggc gctgtgcagc 12300
 20 cgctgatggt cgtgttcac tctgccgctc tgctaggtag cccgatacga ttgatggcgg 12360
 tcctgggggc tatttgcgga actgcgggcg tggcgtggt ggtgttgaca ccaaacgcag 12420
 cgctagatcc tgctggcgtc gcagcgggccc tggcgggggc ggtttccatg gcgttcggaa 12480
 ccgtgctgac ccgcaagtgg caacctcccg tgcctctgct cacctttacc gcctggcaac 12540
 tggcggccgg aggacttctg ctcgttccag tagctttagt gttgatccg ccaatcccga 12600
 tgcttacagg aaccaatggt ctcggcctgg cgtggctcgg cctgatcggg gcgggtttaa 12660
 25 cctacttctt ttggttccgg gggatctcgc gactcgaacc tacagttggt tccttactgg 12720

gctttctcag cccccgagcg cttagtggga atttgtaccc cttatcgaac cgggagcaca 12780
 ggatgacgcc taacaattca ttcaagccga caccgcttcg cggcggggct taattcagga 12840
 gttaaacatc atgaggggaag cggtgatcgc cgaagtatcg actcaactat cagaggtagt 12900
 tggcgtcatc gagcgccatc tcgaaccgac gttgctggcc gtacatttgt acggctccgc 12960
 agtggatggc ggcctgaagc cacacagtga tattgatttg ctggttacgg tgaccgtaag 13020
 5 gcttgatgaa acaacgcggc gagctttgat caacgacctt ttgaaactt cggcttcccc 13080
 tggagagagc gagattctcc gcgctgtaga agtcaccatt gttgtgcacg acgacatcat 13140
 tccgtggcgt tatccagcta agcgcgaact gcaatttga gaatggcagc gcaatgacat 13200
 tcttgaggt atcttcgagc cagccacgat cgacattgat ctggctatct tgctgacaaa 13260
 agcaagagaa catagcgttg ccttggtagg tccagcggcg gaggaactct ttgatccggt 13320
 tcctgaacag gatctatttg aggcgctaaa tgaacctta acgctatgga actcgccgcc 13380
 cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt gcttacgttg tcccgcattt ggtacagcgc 13440
 10 agtaaccggc aaaatcgcgc cgaaggatgt cgctgccgac tgggcaatgg agcgcctgcc 13500
 ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc taggcaggct tatcttggac aagaagatcg 13560
 cttggcctcg cgcgcagatc agttggaaga atttgtcac tacgtgaaag gcgagatcac 13620
 caaggtagtc ggcaataat gtctaacaat tcgttcaagc cgacgccgct tcgcggcgcg 13680
 gcttaactca agcgttagag agctggggaa gactatgcgc gatctgttga aggtggttct 13740
 aagcctcgtc ttgcgatggc atttcgatcc attcccattc cgcgctcaag atggcttccc 13800
 15 ctcggcagtt catcagggct aatcaatct agccgacttg tccggtgaaa tgggctgcac 13860
 tccaacagaa acaatcaaac aaacatacac agcgacttat tcacacgagc tcaaattaca 13920
 acggtatata tcctgccagt cagcatcatc acacaaaag ttaggcccga atagtttgaa 13980
 attagaaagc tcgcaattga ggtctacagg ccaaattcgc tcttagccgt acaatattac 14040
 tcaccggatc ctaaccggtt taattaaggc gcgccatgcc cgggcaagcg gccgcacaag 14100
 ttt 14103

 20 <210> 75
 <211> 13812
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

 <220>
 <223> **Plásmido** pDAB110112

 <400> 75
 cttgtacaaa gtggttgcgg ccgcttaatt aaatttaaat tcaattaatg caatcttgat 60
 tttcaacaac gaaggtaatg gcgtaaaaga aaaaatgtat gttattgtat tgatctttca 120
 25 tgatgttgaa gcgtgccata atatgatgat gtataattaa aatattaact gtcgcatttt 180

	attgaaatgg cactgttatt tcaaccatat ctttgattct gttacatgac acgactgcaa	240
	gaagtaaata atagacgccg ttgttaaaga attgctatca tatgtgccta actagagggga	300
	atgtgagcgt cagacctaat caaatattac aaaatatctc actctgtcgc cagcaatggt	360
	gtaatcagcg cagacaaatg gcgtaaagat cgcggaaaaa cctccccgag tggcatgata	420
	gctgcctctg tattgctgat ttagtcagcc ttatttgact taagggtgcc ctcgtagtg	480
5	acaaattgct ttcaaggaga cagccatgcc ccacacttg ttgaaaaaca aattgccttt	540
	ggggagacgg taaagccagt tgctcttcaa taaggaatgt cgaggaggca atgtaaccgc	600
	ctctggtagt acacttctct aatccaaaaa tcaatttgta ttcaagatac cgcaaaaaac	660
	ttatggttta aaccctgcag gactagtcca gaaggaat atccaagatg tagcatcaag	720
	aatccaatgt ttacgggaaa aactatggaa gtattatgta agctcagcaa gaagcagatc	780
	aatatgcggc acatatgcaa cctatgttca aaaatgaaga atgtacagat acaagatcct	840
10	atactgccag aatacgaaga agaatacgtg gaaattgaaa aagaagaacc aggcgaagaa	900
	aagaatcttg aagacgtaag cactgacgac aacaatgaaa agaagaagat aaggtcggtg	960
	attgtgaaag agacatagag gacacatgta aggtggaaaa tgtaagggcg gaaagtaacc	1020
	ttatcacaaa ggaatcttat cccccactac ttatcctttt atatttttcc gtgtcatttt	1080
	tgcccttgag ttttctata taaggaacca agttcggcat ttgtgaaaac aagaaaaaat	1140
	ttggtgtaag ctattttctt tgaagtactg aggatacaac ttcagagaaa tttgtaagtt	1200
	tgtaggtacc agatctggat cccaaacat gtctccggag aggagaccag ttgagattag	1260
15	gccagctaca gcagctgata tggccgcggt ttgtgatatc gttaaccatt acattgagac	1320
	gtctacagtg aacttttagga cagagccaca aacaccacaa gagtggattg atgatctaga	1380
	gaggttgcaa gatagatacc cttggttggg tgctgaggtt gaggggtgtg tggctggtat	1440
	tgcttacgct gggccctgga aggctaggaa cgcttacgat tggacagttg agagtactgt	1500
	ttacgtgtca cataggcac aaaggttggg cctaggatct acattgtaca cacatttgct	1560
	taagtctatg gaggcgcaag gttttaagtc tgtggttgct gttataggcc ttccaaacga	1620
20	tccatctggt aggttgcatg aggccttggg atacacagcc cggggtacat tgcgcgagc	1680
	tggatacaag catggtggat ggcatgatgt tggtttttgg caaagggatt ttgagttgcc	1740
	agctcctcca aggccagtta ggccagttac ccaaactga gtagttagct taatcaccta	1800
	gagctcgatc ggcggcaata gcttcttagc gccatcccgg gttgatccta tctgtgttga	1860
	aatagttgcg gtgggcaagg ctctcttca gaaagacagg cggccaaagg aacccaaggt	1920
	gaggtgggct atggctctca gttccttggt gaagcgcttg gtctaaggtg cagaggtggt	1980
25	agcgggatga agcaaaagtg tccgattgta acaagatatg ttgatcctac gtaaggatat	2040

	taaagtatgt attcatcact aatataatca gtgtattcca atatgtacta cgatttccaa	2100
	tgtcttttatt gtcgccgtat gtaatcggcg tcacaaaata atccccgggtg acttttctttt	2160
	aatccaggat gaaataatat gttattataa tttttgcgat ttgggtccgtt ataggaattg	2220
	aagtgtgctt gaggtcggtc gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa	2280
	ataaaaattt atgggtattca atttaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag	2340
5	aaatatagtt taaatattta ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa	2400
	acataaattt attgatgcaa gtttaaatc agaaatattt caataactga ttatatcagc	2460
	tggtacattg ccgtagatga aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac ataggaattc	2520
	gtttaaacga tctgcgtcta attttcggtc caacttgac aggaaagacg tcgaccgagg	2580
	tagctcttgc ccagcagact gggcttccag tcctttcgct cgatcgggtc caatgttgtc	2640
	ctcagcttg aaccggaagc ggacgaccaa cagtggaaga actgaaagga acgagccgtc	2700
	tataccttga tgatcggcct ctggtgaagg gtatcatcgc agccaagcaa gctcatgaaa	2760
10	ggctgatggg ggaggtgat aattatgagg cccacggcgg gcttattctt tagggaggat	2820
	ctatctcgtt gctcaagtgc atggcgcaaa gcagttattg gagtgcggat tttcgttggc	2880
	atattattcg ccacgagtta gcagacgaag agacctcat gaacgtggcc aaggccagag	2940
	ttaagcagat gttacgccct gctgcaggcc tttctattat ccaatagttg gttgatcttt	3000
	ggaaagagcc tcggctgagg ccatactga aagagatcga tggatatcga tatgccatgt	3060
	tgtttgctag ccagaaccag atcacatccg atatgctatt gcagcttgac gcagatatgg	3120
15	aggataagtt gattcatggg atcgcctcagg agtagctcat ccatgcacgc cgacaagaac	3180
	agaaattccg tcgagttaac gcagccgctt acgacggatt cgaaggctcat ccattcggaa	3240
	tgtattagtt tgcaccagct ccgcgtcaca cctgtcttca tttgaataag atgtagcaa	3300
	ttgttttttag ctttgtcttg ttgtggcagg gcggaagtg cttcagacat cattctgttt	3360
	tcaaatttta tgctggagaa cagcttctta attcctttgg aaataataga ctgcgtctta	3420
	aaattcagat gtctggatat agatatgatt gtaaaataac ctatttaagt gtcatttaga	3480
20	acataagttt tatgaatggt cttccatttt cgatcatcga cgaataagag taaatacacc	3540
	ttttttaaca ttacaataa gttcttatac gttgtttata caccgggaat catttccatt	3600
	attttcgctc aaaagtcacg gatattcgtg aaagcgacat aaactgcgaa atttgcgggg	3660
	agtgtcttga gtttgcctcg aggctagcgc atgcacatag acacacacat catctcattg	3720
	atgcttggta ataattgtca ttagattggt tttatgcata gatgcactcg aatcagcca	3780
	attttagaca agtatcaaac ggatgtgact tcagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt	3840
	attaagttgt ctaagcgtca atttgattta caattgaata tatcctgccc cagccagcca	3900
25	acagctcgat ttacaattga atatatcctg ccggccggcc cacgcgtgtc gaggaattct	3960

	gatctggccc ccatttgac gtgaatgtag acacgtcgaa ataaagattt ccgaattaga	4020
	ataatttggt tattgctttc gcctataaat acgacggatc gtaatttgtc gttttatcaa	4080
	aatgtacttt cattttataa taacgctgcg gacatctaca tttttgaatt gaaaaaaaaat	4140
	tggttaattac tctttctttt tctccatatt gaccatcata ctcatgctg atccatgtag	4200
	atttcccgga catgaagcca tttacaattg aatatacct gccgccgctg ccgctttgca	4260
5	cccgggtggag cttgcatggt ggtttctacg cagaactgag ccggttaggc agataatttc	4320
	cattgagaac tgagccatgt gcaccttccc cccaacacgg tgagcgacgg ggcaacggag	4380
	tgatccacat gggactttta aacatcatcc gtcggatggc gttgcgagag aagcagtcga	4440
	tccgtgagat cagccgacgc accgggcagg cgcgcaacac gatcgaaaag tatttgaacg	4500
	caggtacaat cgagccgacg ttcacgcgga acgaccaagc aagcttggct gccatttttg	4560
	gggtgaggcc gttcgcggcc gaggggcgca gcccctgggg ggatgggagg cccgcgtag	4620
10	cgygccggga gggttcgaga agggggggca cccccctcg gcgtgcgcg tcacgcgcac	4680
	agggcgcagc cctggttaaa aacaaggttt ataaatattg gtttaaaagc aggttaaaag	4740
	acaggttagc ggtggccgaa aaacgggcgg aaacccttgc aaatgctgga ttttctgcct	4800
	gtggacagcc cctcaaatgt caataggtgc gcccctcatc tgtcagcact ctgcccctca	4860
	agtgtcaagg atcgcgcccc tcatctgtca gtagtcgcgc ccctcaagtg tcaataccgc	4920
	agggcactta tccccaggct tgtccacatc atctgtggga aactcgcgta aaatcaggcg	4980
15	ttttcgccga tttgcgaggc tggccagctc cacgtcgccg gccgaaatcg agcctgcccc	5040
	tcatctgtca acgccgcgcc gggtagtcg gcccctcaag tgtcaacgtc cggcccctcat	5100
	ctgtcagtga gggccaagtt ttccgcgagg tatccacaac gccggcgcc gcggtgtctc	5160
	gcacacggct tcgacggcgt ttctggcgcg tttgcagggc catagacggc cgccagccca	5220
	gcggcgaggg caaccagccc ggtgagcgtc ggaaagggc gacggatctt ttccgctgca	5280
	taacctgct tcggggctcat tatagcatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga	5340
20	tatacaggat tttgccaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag	5400
	ccgggcagga taggtgaagt agggccaccc gcgagcgggt gttccttctt cactgtccct	5460
	tattcgacc tggcgggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggctggcc ggctaccgcc	5520
	ggcgtaacag atgagggcaa gcggatggct gatgaaacca agccaaccag gaagggcagc	5580
	ccacctatca aggtgtactg cttccagac gaacgaagag cgattgagga aaagggcgcg	5640
	gcggccgca tgagcctgtc ggccctactg ctggccgctg gccagggcta caaaatcacg	5700
	ggcgtcgtgg actatgagca cgtccgcgag ctggcccgca tcaatggcga cctgggccgc	5760
25	ctgggcggcc tgctgaaact ctggctcacc gacgacccgc gcacggcgcg gttcgggtgat	5820

gccacgatcc tgcacctgct ggcgaagatc gaagagaagc aggacgagct tggcgaaggtc 5880
 atgatgggcg tggctccgcc gagggcagag ccatgacttt tttagccgct aaaacggccc 5940
 gggggtgctc gtgattgcca agcacgtccc catgctctcc atcaagaaga gcgacttcgc 6000
 ggagctggta ttcgtgcagg gcaagattcg gaataccaag tacgagaagg acggccagac 6060
 ggtctacggg accgacttca ttgccgataa ggtggattat ctggacacca aggaccagg 6120
 5 cgggtcaaat caggaataag ggcacattgc cccggcgtga gtcggggcaa tcccgaagg 6180
 aggggtgaatg aatcggacgt ttgaccggaa ggcatacagg caagaactga tcgacgcggg 6240
 gttttccgcc gaggatgccg aaaccatcgc aagccgcacc gtcctgctgc cgccccgcga 6300
 aaccttccag tccgtcggct cgatggtcca gcaagctacg gcccaagatcg agcgcgacag 6360
 cgtgcaactg gctccccctg ccctgcccgc gccatcggcc gccgtggagc gttcgcgctc 6420
 tctcgaacag gaggcggcag gtttggcgaa gtcgatgacc atcgacacgc gaggaactat 6480
 gacgaccaag aagcgaaaaa ccgccggcga ggacctggca aaacaggtca gcgaggccaa 6540
 10 gcaggccgcg ttgctgaaac acacgaagca gcagatcaag gaaatgcagc tttccttggt 6600
 cgatattgct ccgtggccgg acacgatgct agcgatgcca aacgacacgg cccgctctgc 6660
 cctgttcacc acgcgcaaca agaaaatccc gcgagggcg ctgcaaaaaca aggtcatttt 6720
 ccacgtcaac aaggacgtga agatcaccta caccggcgtc gagctgcggg ccgacgatga 6780
 cgaactgggtg tggcagcagg tgttggagta cgcgaagcgc acccctatcg gcgagccgat 6840
 caccttcacg ttctacgagc tttgccagga cctgggctgg tcgatcaatg gccggtatta 6900
 15 cacgaaggcc gaggaatgcc tgtcgcgcct acaggcgacg gcgatgggct tcacgtccga 6960
 ccgcggtggg cacctggaat cgggtgctgct gctgcaccgc ttccgcgtcc tggaccgtgg 7020
 caagaaaacg tcccgttgcc aggtcctgat cgacgaggaa atcgctcgtc tgtttgctgg 7080
 cgaccactac acgaaattca tatgggagaa gtaccgcaag ctgtcgcgca cggcccgcag 7140
 gatgttcgac tatttcagct cgcaccggga gccgtaccg ctcaagctgg aaaccttccg 7200
 cctcatgtgc ggatcggatt ccacccgcgt gaagaagtgg cgcgagcagg tcggcgaagc 7260
 ctgcgaagag ttgcgaggca gcggcctggt ggaacacgcc tgggtcaatg atgacctggt 7320
 20 gcattgcaaa cgctagggcc ttgtggggtc agttccggct gggggttcag cagccagcgc 7380
 tttactggca tttcaggaac aagcgggcac tgctcgacgc acttgcttcg ctcagtatcg 7440
 ctcgggacgc acggcgcgct ctacgaactg ccgataaaca gaggattaaa attgacaatt 7500
 gtgattaagg ctcagattcg acggcttggg gcggccgacg tgcaggattt ccgagagatc 7560
 cgattgtcgg ccctgaagaa agctccagag atgttcgggt ccgtttacga gcacgaggag 7620
 aaaaagccca tggaggcggt cgctgaacgg ttgcgagatg ccgtggcatt cggcgcctac 7680
 25 atcgacggcg agatcattgg gctgtcggtc ttcaaacagg aggacggccc caaggacgct 7740

	cacaagggcgc atctgtccgg cgttttcgtg gagcccgaac agcgaggccg aggggtcgc	7800
	ggatgctgc tgcgggcgtt gccggcgggt ttattgctcg tgatgategt cegacagatt	7860
	ccaacgggaa tctggtggat gcgcatcttc atcctcggcg cacttaatat ttcgctattc	7920
	tggagcttgt tgtttatttc ggtctaccgc ctgccggcg gggctcggcg gacggtaggc	7980
	gctgtgcagc cgctgatggt cgtgttcac tctgccgctc tgctaggtag cccgatacga	8040
5	ttgatggcgg tcctgggggc tatttgcgga actgcggcg tggcgtggt ggtggtgaca	8100
	ccaaacgcag cgctagatcc tgctggcgtc gcagcgggcc tggcggggc ggtttccatg	8160
	gcgttcggaa ccgtgctgac ccgcaagtgg caacctccc tgccctgct cacctttacc	8220
	gcctggcaac tggcggccgg aggacttctg ctcgttccag tagctttagt gttgatccg	8280
	ccaatcccga tgcctacagg aaccaatggt ctcggcctgg cgtggctcgg cctgatcgga	8340
	gcgggtttaa cctacttct ttggttccgg gggatctcgc gactcgaacc tacagttggt	8400
10	tccttactgg gctttctcag cccccgagcg cttagtggga atttgtacc cttatcgaac	8460
	cgggagcaca ggatgacgcc taacaattca ttcaagccga caccgcttcg cggcgcggct	8520
	taattcagga gttaaaccatc atgagggaa cggtgatcgc cgaagtatcg actcaactat	8580
	cagaggtagt tggcgtcatc gagcgcacatc tcgaaccgac gttgctggcc gtacatttgt	8640
	acggctccgc agtggatggc ggcctgaagc cacacagtga tattgatttg ctggttacgg	8700
	tgaccgtaag gcttgatgaa acaacgcggc gagctttgat caacgacctt ttggaaactt	8760
15	cggcttcccc tggagagagc gagattctcc gcgctgtaga agtcaccatt gttgtgcagc	8820
	acgacatcat tccgtggcgt tatccagcta agcgcgaact gcaatttga gaatggcagc	8880
	gcaatgacat tcttgcaggt atcttcgagc cagccacgat cgacattgat ctggctatct	8940
	tgctgaraaa agcaagagaa catagcgttg ccttggtagg tccagcggcg gaggaactct	9000
	ttgatccggt tcctgaacag gatctatttg aggcgctaaa tgaaacctta acgctatgga	9060
	actcgcggcc cgactgggct ggcgatgagc gaaatgtagt gcttacgttg tcccgcattt	9120
20	ggtacagcgc agtaaccggc aaaatcgcgc cgaaggatgt cgctgccgac tgggcaatgg	9180
	agcgcctgcc ggcccagtat cagcccgtca tacttgaagc taggcaggct tatcttggac	9240
	aagaagatcg cttggcctcg cgcgcagatc agttggaaga atttgttcac tacgtgaaa	9300
	gcgagatcac caaggtagtc ggcaataat gtctaacaat tcgttcaagc cgacgccgct	9360
	tcgcggcgcg gcttaactca agcgttagag agctggggaa gactatgcgc gatctgttga	9420
	aggtggttct aagcctcgtc ttgcgatggc atttcgatcc attcccattc cgcgctcaag	9480
	atggcttccc ctcggcagtt catcagggtc aaatcaatct agccgacttg tccggtgaaa	9540
25	tgggctgcac tccaacagaa acaatcaaac aaacatacac agcgacttat tcacacgagc	9600

	tcaaattaca	acggtatata	tcctgccagt	cagcatcatc	acaccaaag	ttaggcccg	9660
	atagtttgaa	attagaaagc	tcgcaattga	ggctacagc	ccaaattcgc	tcttagccgt	9720
	acaatattac	tcaccggatc	ctaaccggtt	taattaaggc	gcgccatgcc	cgggcaagcg	9780
	gccgcacaag	ttgtacaaa	aaagcaggct	tctagaccta	ggtaggagtc	tcacgcagac	9840
	tatctcagca	tgtgcgtagc	acgcggccgc	ctcccagtat	cattatagtg	aaagttttgg	9900
5	ctctctcgcc	ggtaggtttt	tacctctatt	taaaggggtt	ttccaccta	aaattctggt	9960
	atcattctca	ctttacttgt	tactttaatt	tctcataatc	tttggttgaa	attatcacgc	10020
	ttccgcacac	gatatcccta	caaatttatt	atgtgttaa	cattttcaa	ccgcataaaa	10080
	ttttatgaag	tcccgtctat	ctttaatgta	gtctaacatt	ttcatattga	aatatataat	10140
	ttacttaatt	ttagcgttgg	tagaaagcat	aatgatttat	tcttattctt	cttcatataa	10200
	atgtttaata	tacaatataa	acaaattctt	taccttaaga	aggatttccc	atttatatt	10260
10	ttaaaaat	atattcaaaa	tatttttcaa	ccacgtaaat	ctcataataa	taagttggtt	10320
	caaaagtaat	aaaatttaac	tccataattt	ttttattcga	ctgatcttaa	agcaacacc	10380
	agtgacacaa	ctagccattt	ttttcttga	ataaaaaaat	ccaattatca	ttgtattttt	10440
	tttatacaat	gaaaatttca	ccaacaatg	atgtgtgta	tttctgaagc	aagtcattgt	10500
	atgcaaaatt	ctataattcc	catttgacac	tacggaagta	actgaagatc	tgcttttaca	10560
	tgcgagacac	atcttctaaa	gtaattttaa	taatagttac	tatattcaag	atctcatata	10620
	tcaaaatact	aatattactt	ctaaaaaatt	aattagatat	aattaaaata	ttactttttt	10680
15	aattttaagt	ttaattggtg	aatttgtagc	tattgattta	ttattctact	atgtttaaat	10740
	tgttttatag	atagtttaaa	gtaaatataa	gtaatgtagt	agagtgttag	agtgttacc	10800
	taaaccataa	actataagat	ttatggtgga	ctaattttca	tatatttctt	attgctttta	10860
	ccttttcttg	gtatgtaagt	ccgtaactgg	aattactgtg	ggttgccatg	acactctgtg	10920
	gtcttttggt	tcatgcatgg	atcttgcgca	agaaaaagac	aaagaacaaa	gaaaaaagac	10980
	aaaacagaga	gacaaaacgc	aatcacacaa	ccaactcaaa	ttagtcaactg	gctgatcaag	11040
20	atcgccgcgt	ccatgtatgt	ctaaatgcc	tgcaaagcaa	cacgtgctta	acatgcactt	11100
	taaatggctc	accatctca	accacacac	aaacacattg	cctttttctt	catcatcacc	11160
	acaaccacct	gtatatattc	attctcttcc	gccacctcaa	tttcttcaact	tcaacacacg	11220
	tcaacctgca	tatgcgtgtc	atccatgcc	caaactctca	tgcatgttcc	aaccaccttc	11280
	tctcttatat	aatacctata	aatacctcta	atatcaactca	cttctttcat	catccatcca	11340
	tccagagtac	tactactcta	ctactataat	accccaacc	aactcatatt	caatactact	11400
	ctaggatcca	acaatggctc	ccaacatttc	tgaggatgtc	aatgggtgtc	tttttgagtc	11460
25	agatgcggca	accctgatt	tggctcttc	cacaccacct	gtgcaaaaag	ctgacaacag	11520

	acccaagcaa	cttgtgtgga	ggaacatttt	gcttttcgct	tacttgcacc	tcgcagctct	11580
	ctacggaggc	tatttgtttc	tcttcagtcg	aaaatggcag	accgacattt	tcgcttacat	11640
	tctttatgtc	atctctggac	tggggataac	tgctggggca	catagactct	gggctcacia	11700
	gtcatacaaa	gccaaagtgc	cactcagagt	tatactggtc	atcttcaaca	cggttgcctt	11760
5	tcaagacgct	gctatggatt	gggctcgtga	ccatagaatg	catcacaagt	acagcgagac	11820
	cgacgcggac	ccacacaatg	caacgagagg	tttcttcttc	tctcacattg	gctggcttct	11880
	tgtttagaaa	catcctgatc	tgaagaaaa	agggaaagga	ctcgacatga	gtgatctcct	11940
	tgctgatcca	atactccggt	ttcagaagaa	gtactatctg	atcctcatgc	ctctggcctg	12000
	ttttgtgatg	ccaaccgtta	tcccggttta	cttttgggga	gaaacttggg	caaatgcttt	12060
	cttcgtggca	gccatgttcc	gttatgcttt	catcctgaat	gttacctggg	tggtgaactc	12120
	tgccgcacac	aagtggggag	acaacccta	tgacaagtcc	atcaagcctt	ccgaaaacct	12180
10	ttcagttgcg	atgtttgctt	tgggagaagg	atctcacaat	taccatcaca	cttttccgty	12240
	ggactacaag	acagcagagc	ttggaaacaa	caagttgaac	ttcacaacaa	cgttcatcaa	12300
	tttctttgcy	aaaatcggtt	gggcctatga	tttgaagact	gtgagtgatg	acattgtcaa	12360
	gaacagggtc	aagagaactg	gcyatggaag	ccatcatctc	tggggctggg	gtgatgagaa	12420
	tcagagcaaa	gaagagatag	atgcagccat	taggatcaac	cctaaagacg	attgagtagt	12480
	tagcttaatc	acctagagct	cggtcaccag	tatgaactaa	aatgcatgta	ggtgtaagag	12540
15	ctcatggaga	gcatggaata	ttgtatccga	ccatgtaaca	gtataataac	tgagctccat	12600
	ctcacttctt	ctatgaataa	acaaggatg	ttatgatata	ttaaactctt	atctatgcac	12660
	cttattgttc	tatgataaat	ttcctcttat	tattataaat	catctgaatc	gtgacggctt	12720
	atggaatgct	tcaaatagta	caaaaacaaa	tgtgtactat	aagactttct	aaacaattct	12780
	aacttttagca	ttgtgaacga	gacataagtg	ttaagaagac	ataacaatta	taatggaaga	12840
	agtttgtctc	catttatata	ttatatatta	cccacttatg	tattatatta	ggatgttaag	12900
	gagacataac	aattataaag	agagaagttt	gtatccattt	atatattata	tactacccat	12960
20	ttatatatta	tacttatcca	cttatttaat	gtctttataa	ggtttgatcc	atgatatttc	13020
	taatatttta	gttgatatgt	atatgaaaag	gtactatttg	aactctctta	ctctgtataa	13080
	aggttggatc	atccttaaag	tgggtctatt	taattttatt	gcttcttaca	gataaaaaaa	13140
	aaattatgag	ttggtttgat	aaaatattga	aggatttaaa	ataataataa	ataataaata	13200
	acataataa	tatgtatata	aatttattat	aatataacat	ttatctataa	aaaagtaaat	13260
	attgtcataa	atctatacaa	tcgtttagcc	ttgctggaac	gaatctcaat	tatttaaacg	13320
25	agagtaaca	tatttgactt	ttgggttatt	taacaaatta	ttatttaaca	ctatatgaaa	13380

	ttttttttt	ttatcagcaa	agaataaaat	taaattaaga	aggacaatgg	tgccccaatc	13440
	cttatacaac	caacttccac	aagaaagtca	agtcagagac	aacaaaaaaaa	caagcaaagg	13500
	aaatttttta	atttgagttg	tcttgtttgc	tgcataattt	atgcagtaaa	acactacaca	13560
	taaccctttt	agcagtagag	caatggttga	ccgtgtgctt	agcttctttt	attttatttt	13620
	tttatcagca	aagaataaaat	aaaataaaat	gagacacttc	agggatgttt	caacccttat	13680
5	acaaaacccc	aaaaacaagt	ttcctagcac	cctaccaacg	aattcgcggc	cgcttaatta	13740
	agatgagtga	tactcaggac	tcaggactca	ctctgctgat	cactagtgtc	agcctcgagg	13800
	tcgaccagct	tt					13812
	<210>	76					
	<211>	1434					
	<212>	ADN					
	<213>	Magnaporthe grisea					
	<400>	76					
10	gaattcatgg	cttcgtcatc	ttcctccgtg	ccggagttgg	ctgccgcctt	ccctgatggc	60
	actaccgact	tcaagcccat	gaggaacacc	aagggctacg	acgtcagcaa	gccgcacatt	120
	tccgagacac	ctatgacact	caagaactgg	cataagcacg	tcaactggct	caacaccacc	180
	ttcatcttgt	ttgtgccctt	ggctggtctc	atatccactt	actgggtccc	tctgcagtgg	240
	aagacygctg	tatgggctgt	cgctacttac	ttcaacaccg	gcctgggaat	tactgccggt	300
	taccaccgac	tttgggctca	cagctcgtac	aaggcctcgc	ttccgctcaa	aatctacctt	360
15	gccgccgttg	gcgctggtgc	cgctcagggc	tccatcagat	ggtggtccaa	cggtcaccgc	420
	gcacaccacc	gatacaccga	taccgagaag	gaccctactt	cagtccgcaa	gggtctcctg	480
	tactcacaca	tgggatggat	gcttctgaag	cagaacccca	agaagcaggg	ccgcaccgac	540
	atcaccgacc	tgaacgagga	ccccgttgtc	gtttggcagc	accgcaactt	cctcaagtgt	600
	gttatcttca	tggccctcgt	cttccccaca	cttgtggctg	gccttggctg	gggtgactac	660
	tggggaggtt	tcatctacgg	aggtattctg	cggtcttctt	tcgtccagca	ggccaccttc	720
	tgcgtcaact	cgcttgccca	ctggctcggg	gaccagcctt	tcgacgatcg	caactcgccc	780
20	cgatgatcacg	tcatcacagc	cctggtcacc	cttggagagg	gataccacaa	cttccaccac	840
	gagttccctt	cggactaccg	caacgctatt	gagtgggtacc	agtatgacct	caccaagtgg	900
	tcaatctgga	tctggaagca	gcttggctct	gcccacaacc	tgaagcagtt	ccgccaaaac	960
	gagattgaga	agggacgcgt	ccagcagctg	cagaagaagc	tcgaccagaa	gcgcgcccaag	1020
	cttgattggg	gtattccctt	ggagcagctt	cccgttgta	gctgggatga	ctttgttgag	1080
	cagtccaaga	acggaaaggc	ttggattgca	gttgccgggtg	tcatccacga	tgttgggtgac	1140
25	ttcatcaagg	accaccctgg	tggcagagct	ctcatcaact	cggccattgg	caaggacgca	1200

accgcaatct tcaacggcgg tgtttacaac cactccaacg ccgctcaciaa cctgctctcg 1260
 actatgctg tgggtgtttt gcgtggcggc tgcgaggttg agatctggaa gcgcgcttag 1320
 tccgaaaaca aggacgtctc aaccgtcgtt gattcttcgg gtaaccgcat cgtccgcgcg 1380
 ggtgggcaag cgaccaaggt cgtccagcct gttccgggtg ctcaggccgc gtga 1434

5 <210> 77
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Leptosphaeria nodorum
 <400> 77

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

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

10

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

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

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

15

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

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

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

20

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

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

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

25

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

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

Pro Thr Lys Trp
210

5

<210> 78
<211> 216
<212> PRT
<213> Helicoverpa zea

<400> 78

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

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

10

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

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

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

15

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

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

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

20

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

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

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

25

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



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

Asn Asn Lys Leu Asn Phe Thr Thr
210 215