



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 736**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01916742 .8**

(86) Fecha de presentación : **28.03.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1282697**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

(54)

Título: **Una construcción capaz de liberarse en forma circular cerrada a partir de una secuencia nucleotídica de mayor longitud permitiendo la expresión específica de lugar y/o la expresión regulada por el desarrollo de secuencias genéticas seleccionadas.**

(30)

Prioridad: **28.03.2000 AU PQ6516**
27.10.2000 AU PR1081

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73)

Titular/es: **Queensland University of Technology**
Gardens Point Campus, 2 George Street
Brisbane, Queensland 4000, AU

(72)

Inventor/es: **Dale, James, Langham;**
Dugdale, Benjamin;
Hafner, Greg, John;
Hermann, Scott, Richard;
Becker, Douglas, Kenneth;
Chowpongpan, Srimek y
Harding, Robert, Maxwell

(74)

Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

DESCRIPCIÓN

Una construcción capaz de liberarse en forma circular cerrada a partir de una secuencia nucleotídica de mayor longitud permitiendo la expresión específica de lugar y/o la expresión regulada por el desarrollo de secuencias genéticas seleccionadas.

Campo de la invención

La presente invención está relacionada en general con construcciones y en particular con las construcciones genéticas que comprenden secuencias de polinucleótidos que pueden liberarse en forma circular cerrada covalentemente, a partir de una secuencia de nucleótidos de mayor longitud, tal como el genoma de una célula eucariota, aunque no se limita a éste. Preferiblemente, una vez se ha liberado una secuencia de polinucleótidos se reconstituye en una forma en la que su expresión es posible. En un modo de realización, la secuencia polinucleotídica reconstituida comprende una secuencia codificante que contiene un nucleótido extraño completo o parte de este, como una secuencia intrónica u otras señales de corte y empalme insertadas en este, aunque no se limita a estos. La expresión y en particular la transcripción de la secuencia codificante comprende la eliminación de la secuencia extraña. De acuerdo con este modo de realización, la secuencia codificante puede codificar un péptido, polipéptido o proteína, una molécula de ácido nucleico complementario o no complementario o una ribozima. En otro modo de realización, la secuencia del polinucleótido reconstituido comprenderá la secuencia polinucleotídica extraña situada entre el promotor y la secuencia codificante. En este modo de realización, la presencia de la secuencia extraña no afecta negativamente a la expresión de la secuencia codificante de manera substancial. En otro modo de realización, la secuencia reconstituida forma un promotor-RNA u otra secuencia genética reguladora que comprende la secuencia extraña, lo que no afecta a la función del promotor. La liberación y la circularización se produce normalmente en respuesta a un estímulo tal como un estímulo mediado por proteínas. Más particularmente, la proteína es de procedencia viral o procariota o eucariota o regulada durante el desarrollo y/o en tejidos específicos. La construcción de la presente invención es particularmente útil para conferir resistencia genética contra organismos patógenos o para inducir la apoptosis u otros mecanismos para producir la muerte celular, que son útiles para el tratamiento del cáncer o para provocar la esterilidad de plantas de ambos sexos, por ejemplo. Por lo tanto, las construcciones permiten la expresión específica de secuencias genéticas seleccionadas en un lugar y/o la expresión regulada durante el desarrollo.

Antecedentes de la invención

La creciente sofisticación de la ingeniería genética está facilitando enormemente la investigación y el desarrollo en múltiples campos tecnológicos, tales como las industrias médica, hortícola y agrícola. El aprovechamiento de los mecanismos genéticos naturales, como por ejemplo en microorganismos patógenos, para inducir el cambio beneficioso del fenotipo celular en las células vegetales es de particular importancia. Este hecho es obvio particularmente en el campo de la horticultura, en lo referente a los mecanismos para inducir resistencia a variedad de patógenos en las plantas.

Se ha producido un progreso considerable en el desarrollo de la resistencia a virus en cosechas, por ejemplo, a partir de la transformación con transgenes derivados de los virus escogidos. El uso de transgenes con más éxito se ha logrado con virus RNA de plantas. Sin embargo, las estrategias que se han utilizado con éxito en virus RNA de las plantas no han sido tan efectivas para los virus DNA de cadena simple (ssDNA) de las mismas, a pesar de los intentos para controlarlos mediante técnicas de resistencia transgénica. Los virus DNA de plantas y particularmente los virus DNA de cadena simple (ssDNA) de plantas son responsables de pérdidas significativas en una gran variedad de cosechas de frutas, verduras, granos y fibras en las zonas tropicales y subtropicales. Existen dos grupos de virus ssDNA que infectan plantas, los *Geminiviridae* y el grupo nanovirus, descrito recientemente. Los miembros de la *Geminiviridae* poseen viriones geminados y un genoma ssDNA circular monopartido o bipartido. Cada molécula tiene una longitud de 2,7 kb aproximadamente. Los begomovirus y los mastrevirus son los más importantes de los géneros de la *Geminiviridae*. Los begomovirus se transmiten a través de la mosca blanca y poseen genomas monopartidos o bipartidos. Miembros de este género incluyen algunos de los virus con un efecto más devastador en la agricultura moderna en el aspecto económico, como el virus de la hoja (amarilla) de cuchara del tomate (causado por diferentes virus que se extienden a través de las regiones tropicales y subtropicales), virus del mosaico africano de la yuca o mandioca (África), virus del mosaico dorado de la judía (América del Sur y Centro América), el virus del mosaico amarillo de la judía (India) y virus del enrollamiento del algodón (Asia del Sur y Sudeste). El impacto de muchos de los begomovirus ha aumentado drásticamente en los últimos años como resultado de la masiva introducción del "biotipo B" agresivo del vector de la mosca blanca, *Bemisia tabaci*. Los mastrevirus han producido un impacto menor sobre la agricultura, aunque son responsables de pérdidas significativas en algunos cultivos. Estos virus se transmiten mediante el saltamontes y tienen genomas monopartidos. Miembros de este género incluyen los virus del estriado foliar del maíz (África), enanismo del trigo (Europa) y enanismo amarillo del tabaco (Australia).

Los nanovirus poseen viriones isométricos y genomas ssDNA circulares, pero estos genomas son multicomponente y están formados por al menos seis componentes genómicos integrales diferentes, cada uno ellos de 1 kb aproximadamente. Estos virus se transmiten mediante áfidos (pulgones) excepto un virus clasificado como nanovirus provisionalmente, el virus de la putrefacción foliar del coco, que se transmite mediante el búfalo salta árboles y se ha descrito solamente en Vanuatu. El nanovirus más importante desde el punto de vista económico es el virus del cogollo racimoso del banano (VCRB), que casi destruyó la industria bananera australiana en la década de los años 20 y causó pérdidas notables en el Pacífico del Sur, Asia y África. Los virus del estancamiento subterráneo del trébol (Australia),

del amarillamiento necrótico del haba (Mediterráneo) y de la putrefacción foliar del coco (Vanuatu) causan pérdidas significativas en las cosechas.

La organización genómica de los begomovirus, los mastrevirus y los nanovirus presentan diferencias significativas, que incluyen la cantidad y tamaño de los componentes genómicos y de los genes, el procesamiento de los transcritos, la orientación de los genes y similares. Sin embargo, existen similitudes notables que sugieren que estos virus desarrollan estrategias de replicación y de infección muy parecidas. Todos estos geminivirus y nanovirus codifican (i) una proteína Rep que posee una actividad de corte y de unión y dirige la replicación por círculo rodante del genoma viral; (ii) una proteína vírica de la cubierta; (iii) una proteína que participa en la unión a proteínas similares al retinoblastoma de la célula huésped, que da lugar a que la célula se dirija hacia la fase S; (iv) una proteína asociada al movimiento célula-célula y (v) una proteína de movimiento nuclear. Además, los virus poseen regiones intergénicas (IR) similares en función. Por ejemplo, el IR de los begomovirus, el LIR de los mastrevirus y el CR-SL del nanovirus del cogollo racimoso del banano contienen todos ellos (i) una estructura tallo/bucle, cuya secuencia bucle de nueve nucleótidos se encuentra altamente conservada en todos los geminivirus y nanovirus y es el sitio de corte y ligación mediante la proteína Rep; y (ii) un dominio en esta región que reconoce la proteína Rep. El SIR de los mastrevirus y el CR-M del nanovirus del cogollo racimoso del banano son el lugar de unión de un cebador endógeno responsable del cebado en la conversión de viriones de ssDNA a dsDNA, activos para la transcripción.

El éxito en el desarrollo de resistencia transgénica a virus RNA en cosechas y la demanda creciente de resistencia a virus ssDNA ha dado lugar a la investigación de un amplio abanico de estrategias a cerca de virus ssDNA enfocadas a varios genes virales que incluyen el gen de la proteína de la cubierta, el gen de la proteína asociada al movimiento y el gen de la proteína Rep. Además, se han investigado estrategias que utilizan DNA defectivos interferentes y un gen suicida. La mayor parte del trabajo en este área se realizó con begomovirus, más que con los mastrevirus o los nanovirus.

En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores han aprovechado los mecanismos de replicación de los virus ssDNA con la finalidad de conferir resistencia genética a las plantas. Sin embargo, la presente invención tiene una gran variedad de aplicaciones en la modulación de actividades genéticas, como la expresión de secuencias polinucleotídicas para alterar un fenotipo en particular en respuesta a un estímulo.

En Atkinson RG, Bielecki LRF, Gleave AP, Janssen B-J, Morris BAM (1998) Post transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a gemini virus-based episomal vector. *The Plant Journal* 15(5): 593-604 se presenta un vector episomal que contiene los siguientes elementos derivados del geminivirus del enanismo amarillo del tabaco: dos copias de un LIR que flanquean un SIR y dos marcos abiertos de lectura de sentidos complementarios, C1 y C2 que producen la Rep. La expresión de la proteína Rep está bajo el control transcripcional de su promotor nativo en la LIR, también divulga que las plantas de Petunia híbrida transgénica que contienen un gen de la chalcona sintasa A dirigido por el promotor CaMV 35S y clonado en el vector episomal, muestra la liberación y la replicación episomal de los elementos virales del vector y del gen de la chalcona sintasa A.

Needham PD Atkinson RG, Morris BAM, Gardener RC, Gleave AP (1998) GUS expression patterns from tobacco yellow dwarf virus-based episomal vector. *Plant Cell Reports* 17: 631-639 presenta un vector binario que contiene los siguientes elementos derivados del virus del enanismo amarillo del tabaco: dos copias de un LIR que flanquean un SIR y dos marcos abiertos de lectura de sentidos complementarios (C1 y C2) que contienen un intrón, que cuando se procesa producen una proteína (Rep), que es la única proteína viral necesaria para la replicación viral. Este vector no incluye marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas del movimiento putativo (V1) y de la cubierta (V2). Además, se revela que las plantas de tabaco transformadas con este vector que también contienen un gen indicador, demuestran la liberación y replicación episomal de los elementos virales del vector y la expresión del gen indicador.

Resumen de la invención

A lo largo de estas especificaciones, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra “comprende”, o variantes como “comprenden” o “que comprende”, significan que implican la inclusión de un elemento o conjunto o grupo de elementos o conjuntos citados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o conjunto o grupo de elementos o conjuntos citados.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se indican a través de un número de identificación de secuencias (NÚM. ID. SEC.). Los NÚM. ID. SEC.: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400> 1, <400> 2, etc. Tras las reivindicaciones se proporciona un listado de secuencias.

Un aspecto de la presente invención proporciona una construcción que comprende un elemento genético flanqueado de manera operativa por secuencias de nucleótidos reconocibles mediante una proteína de origen viral facilitadora de la replicación, cuando se integra en el genoma de una célula eucariota, cuya proteína de origen viral facilitadora de la replicación facilita la escisión y circularización del elemento genético y las secuencias de nucleótidos flanqueantes en su totalidad o parcialmente; y en el que dichas secuencias de nucleótido reconocibles por medio de dicha proteína de origen viral facilitadora de la replicación son adyacentes o están insertadas en una o varias secuencias extrañas, que incluyen secuencias intrón o partes de estas u otras señales de corte y empalme, en que el elemento genético y otras secuencias nucleotídicas en forma no circular, comprende dos secuencias nucleotídicas modulares que, en la circula-

rización, forman una secuencia genética que muestra una propiedad o capacidad para mostrar una propiedad ausente en las dos secuencias de nucleótidos modulares previamente a la circularización o previamente a la circularización y expresión.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona una construcción, que comprende un elemento genético flanqueado por secuencias de reconocimiento de la proteína Rep, que facilita la generación de una secuencia nucleotídica circular que comprende dicho elemento genético en presencia de una proteína Rep, en la que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep están adyacentes o insertadas en una o varias secuencias de reconocimiento, dicho elemento genético que comprende una secuencia polinucleotídica unida de manera operativa a secuencias reguladoras
10 necesarias para que se produzca la expresión de dicha secuencia polinucleotídica cuyo dicho elemento genético se encuentra en una molécula circular, en la que el elemento genético en forma linial comprende en orden 5' a 3':

una secuencia polinucleotídica; y

15 secuencias reguladoras que permiten la expresión de dicha secuencia polinucleotídica cuando está en forma circular, como tras la circularización el elemento genético comprende la secuencia reguladora separada de la secuencia polinucleotídica mediante una secuencia de reconocimiento de la proteína Rep o parte de esta, en que tras la expresión dicha secuencia polinucleotídica codifica un producto de expresión.

20 Otro aspecto de la presente invención proporciona una construcción que comprende en orden 5' a 3' las secuencias de nucleótidos primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta en que:

la primera y sexta secuencias nucleotídicas pueden ser iguales o diferentes y cada una comprende una secuencia de reconocimiento de proteína Rep susceptible de ser reconocida por una o varias proteínas Rep como material genético
25 flanqueado por dicha primera y sexta secuencias que incluyen dicha primera y sexta secuencias en su totalidad o parcialmente cuando dicha construcción se encuentra integrada en una secuencia nucleotídica de mayor longitud como una secuencia genómica, es susceptible de ser escindida y circularizada en que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep están adyacentes o se encuentran insertadas en una o varias secuencias extrañas que incluyen secuencias intrónicas o partes de estas u otras señales de corte y empalme;

30 la segunda secuencia nucleotídica comprende una porción 3' de la secuencia polinucleotídica;

la tercera secuencia nucleotídica es una secuencia de terminación de la transcripción o derivada funcional u homólogo de éste unido de manera operable a dicha segunda secuencia;

35 la cuarta secuencia nucleotídica es una secuencia promotor unida operablemente a la quinta secuencia nucleotídica; y

40 la quinta secuencia nucleotídica es una porción 5' de una secuencia polinucleotídica en que las porciones 5' y 3' de dicha secuencia polinucleotídica representan una secuencia codificante completa de dicha secuencia polinucleotídica;

en la que en presencia de una o varias proteínas Rep, cuando la construcción se encuentra integrada en una secuencia nucleotídica de mayor longitud como una secuencia genómica, se genera una secuencia genética circularizada separada de dicha secuencia nucleotídica de mayor longitud que comprende en orden dicha secuencia promotora unida de manera operativa a una secuencia polinucleotídica que comprende toda la secuencia extraña o parte de esta u
45 otra señal de corte y empalme que comprende toda o parte de dicha primera y/o sexta secuencias nucleotídicas y una secuencia de terminación de la transcripción.

Todavía otro aspecto de la presente invención está dirigido hacia un elemento genético para su uso en la generación
50 de una construcción, dicho elemento genético que comprende en dirección 5' a 3', una porción 3' de una secuencia polinucleotídica unida de manera operativa a un terminador de la transcripción, un promotor unido de manera operativa a una porción 5' de una secuencia polinucleotídica en que en la circularización, la porción 5' de la secuencia polinucleotídica se une de manera operativa a dicha porción 3' de la secuencia polinucleotídica separada mediante una secuencia extraña completa o parte de esta, o una secuencia intrón o otra señal de corte y empalme.

55 Todavía otro aspecto de la presente invención proporciona una construcción que comprende la secuencia nucleotídica como se establece en NÚM. ID. SEC: 31 a NÚM. ID. SEC: 36 o una secuencia nucleotídica con un 60% de similitud a cada una de los NÚM. ID. SEC: 31 a NÚM. ID. SEC: 36 o una secuencia nucleotídica que puede hibridar una o varias NÚM. ID. SEC: 31 a NÚM. ID. SEC: 36 o una forma complementaria de estas en condiciones poco
60 estrictas a 42°C.

Otro aspecto de la presente invención incluso considera un método para la generación de una planta transgénica o progenie de esta resistente a un virus ssDNA, dicho método que comprende la introducción de una construcción
65 en el genoma de dicha planta que comprende en orden 5' a 3', una secuencia de reconocimiento de proteína Rep adyacente o en una secuencia intrón u otra señal de corte y empalme, una porción terminal 3' de una secuencia polinucleotídica, un terminador de la transcripción, una secuencia promotora unida de manera operativa a una porción terminal 5' de la secuencia polinucleotídica en que las porciones 5' y 3' de la secuencia polinucleotídica representan

la región codificante de un péptido, polipéptido o proteína que pueden inducir la muerte celular o latencia y la misma o diferente secuencia de reconocimiento de la proteína Rep; en que tras la infección de dichas células vegetales con el virus ssDNA que presenta una proteína Rep que puede reconocer la secuencias de reconocimiento de la proteína Rep flanqueante, la construcción se escinde y se circulariza, y reconstituye así dicha secuencia polinucleotídica en una forma que se expresa en un péptido, polipéptido o proteína que mata la célula vegetal o bien reduce la célula vegetal a un estado latente.

Otro aspecto de la presente invención incluso proporciona una construcción que comprende un elemento genético flanqueado por una secuencia de reconocimiento de la proteína Rep que facilita la generación de una secuencia nucleotídica circular que comprende dicho elemento genético en presencia de una proteína Rep o sus derivados funcionales u homólogos, en que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep son adyacentes o están insertadas en una o varias secuencias extrañas que incluyen secuencias intrón o partes de estas u otra señal de corte y empalme, dicho elemento genético que comprende una porción 3' y una porción 5' de un promotor separado por la longitud de una secuencia nucleotídica para evitar de manera substancial el funcionamiento de dicho promotor, dicho elemento genético en forma lineal comprende en orden 5' a 3':

una porción 3' de dicho promotor,

opcionalmente una secuencia polinucleotídica unida de manera operativa a dicha porción 3' de dicho promotor; y

una porción 5' de dicho promotor,

de modo que en la circularización el elemento genético comprende las porciones 5' y 3' de la secuencia promotora separada por una secuencia de reconocimiento de proteína Rep completa o parte de ésta y/o secuencias intrón u otra señal de corte y empalme, pero que no inactiva al promotor, dicha molécula circular comprende opcionalmente además el promotor unido de manera operativa a la secuencia polinucleotídica.

El promotor puede ser un promotor de DNA o de RNA.

Descripción breve de las figuras

La figura 1 es una representación en diagrama de pTBN.

La figura 2 es una representación en diagrama de pTBN6.

La figura 3 es una representación en diagrama de pTBN1.

La figura 4 es una representación en diagrama de pRTBN6.

La figura 5 es una representación en diagrama de pRTBN1.

La figura 6 es una representación en diagrama de pRTBN 1/6.

La figura 7 es una representación esquemática del plásmido p35S-2301.

La figura 8 es una representación esquemática del plásmido pTEST1.

La figura 9 es una representación esquemática del plásmido pTEST2.

La figura 10 es una representación esquemática del plásmido pTEST3.

La figura 11 es una representación esquemática del plásmido pTEST4.

La figura 12 es una representación esquemática del plásmido pBI-TYDV1.1mer.

La figura 13 es una representación esquemática del plásmido p35S-Rep.

La figura 14 es una representación gráfica de los resultados de un ensayo de muerte celular que utiliza vectores de expresión. Las barras de error muestran unos intervalos de confianza del 95%.

La figura 15 es una representación gráfica de los resultados de los ensayos de muerte celular por recircularización que utiliza vectores de expresión. Las barras de error muestran un 95% de intervalos de confianza.

La figura 16 es una representación gráfica de los resultados de muerte celular por recircularización inducida que utiliza vectores de expresión. Las barras de error muestran un 95% de intervalos de confianza.

La figura 17 es una representación esquemática de los plásmidos (A) p35S-BTR-LIR y (B) p35S-BUTR-LIR.

ES 2 296 736 T3

La figura 18 es una representación esquemática del plásmidos (A) p35S-BTR y (B) p35S-BUTR.

La figura 19 es una representación esquemática del plásmidos (A) pBTR.test1 y (B) pBUTRtest1.

La figura 20 es una representación en diagrama del pGI.

La figura 21 es una representación en diagrama del pGI6.

La figura 22 es una representación en diagrama del pGI1.

La figura 23 es una representación en diagrama del pRGI6.

La figura 24 es una representación en diagrama del pRGI1.

La figura 25 es una representación en diagrama del pRGI 1/6.

La figura 26 es una representación esquemática de un modelo propuesto para la expresión de la albúmina sérica humana activada por Rep del plásmido pHSA1.

La figura 27 es una representación en diagrama de una construcción para su uso en la modulación sentido/antisentido de la expresión genética.

En este documento se proporciona un resumen de identificadores de secuencia.

Resumen de identificadores de secuencia

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
NÚM. ID. SEC.:1 a NÚM. ID. SEC.:18	Oligonucleótido sintético
NÚM. ID. SEC.: 19 a NÚM. ID. SEC.:44	Cebadores
SEQ. NÚM. ID. SEC.:45 a NÚM. ID. SEC.:52	Oligonucleótido sintético
NÚM. ID. SEC.:66	Barnasa pTBN
NÚM. ID. SEC.:67	Barnasa pRTBN6
NÚM. ID. SEC.:69	GFP pGI
NÚM. ID. SEC.:70	GFP pGI6
NÚM. ID. SEC.:71	GFP pGI1
NÚM. ID. SEC.:72	Cebador
NÚM. ID. SEC.:73	Cebador

Descripción detallada de los modos de realización preferidos

La presente invención se basa en parte sobre el reconocimiento de que una proteína facilitadora de la replicación de origen viral puede utilizarse para escindir y circularizar secuencias diana específicas a partir del genoma de una célula eucariota. El término “escinde” incluye en este caso la liberación y más particularmente la liberación durante la replicación de secuencias diana. Las proteínas facilitadoras de la replicación de origen viral inician el corte, la escisión y la circularización de los elementos genéticos flanqueados por secuencias particulares específicas para la proteína facilitadora de la replicación de origen viral y reconocidos por esta. La presente invención abarca a los derivados de las proteínas facilitadoras de origen viral y a homólogos procariotas y eucariotas de las mismas. Por lo tanto, la presente invención abarca a cualquier secuencia que pueda facilitar la escisión y ligación de secuencias polinucleótidas y se las denomina más adelante como “secuencias de reconocimiento” y pueden considerarse también en este documento como “secuencias extrañas”. Las secuencias de reconocimiento son adyacentes o están insertadas en secuencias extrañas, que incluyen secuencias intrón u otras señales de corte y empalme.

En un modo de realización, el proceso de circularización permite la formación de una secuencia genética particular a partir de dos componentes modulares separados mediante una secuencia extraña susceptible de escisión en la expresión. Previamente a la circularización, los componentes modulares se separan genéticamente y por lo tanto no están unidos de manera operativa. La unión operativa se muestra acertadamente, por ejemplo, en un modo de realización, mediante la capacidad de expresión de la secuencia genética que comprende los componentes modulares. El término “expresión” en este caso incluye la transcripción a una secuencia mRNA y opcionalmente la traducción de la secuencia mRNA a un producto traducido. La expresión, sin embargo, no es el único criterio para la constitución de una secuencia genética a partir de componentes modulares. En otro modo de realización, la secuencia genética que se produce tras la circularización puede poseer otras funciones útiles que no requieran de la expresión. Por ejemplo, la secuencia genética obtenida puede comprender una secuencia de reconocimiento de unión a proteína, de tal modo que se escojan proteínas citoplasmáticas o nucleares en particular. Alternativamente, la secuencia polinucleotídica reconstituida comprende una secuencia extraña entre los promotores y una secuencia codificante. En este caso anterior, el promotor es preferiblemente un promotor de RNA de los virus TMV, AMV o TEV, por ejemplo.

Alternativamente, el promotor es un promotor de DNA, en el que la inserción de la secuencia de reconocimiento no afecta a su actividad de manera substancialmente negativa.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona una construcción que comprende un elemento genético flanqueado de manera operativa por secuencias nucleotídicas reconocibles por una proteína facilitadora de la replicación de origen viral al integrarse en el genoma de una célula eucariota, cuya proteína facilitadora de la replicación de origen viral facilita la escisión y circularización del elemento genético y secuencias nucleotídicas flanqueantes completas o parte de estas y en el que dichas secuencias nucleotídicas que se reconocen mediante dicha proteína facilitadora de la replicación de origen viral son adyacentes o están insertadas en una o varias secuencias extrañas que incluyen secuencias intrón o partes de éstas u otras señales de corte y empalme en que el elemento genético y otras secuencias nucleotídicas, en forma no circular, comprende dos secuencias nucleotídicas modulares que, tras la circularización, forman una secuencia genética que muestra una propiedad o capacidad de mostrar una propiedad ausente en las dos secuencias nucleotídicas modulares previamente a la circularización o previamente a la circularización y la expresión.

El término “construcción” se utiliza en un sentido amplio e incluye una construcción genética, una molécula de ácido nucleico, un vector, un plásmido o cualquier otra secuencia nucleotídica que comprende al menos dos secuencias heterólogas. Por lo tanto, la construcción es una molécula recombinante diseñada para comprender dos o más secuencias nucleotídicas de diferentes fuentes genéticas. En un modo de realización, la construcción se encuentra en forma aislada. El término “aislado/a” incluye formas biológicamente puras, substancialmente puras o cualquier otra forma en la que se haya realizado al menos una fase de purificación en la muestra que contiene la construcción. Una “fase de purificación” incluye, por ejemplo, una precipitación, una centrifugación y/o una separación mediante cromatografía o electroforesis. En otro modo de realización, la construcción genética se encuentra integrada en el genoma de una célula huésped. La construcción puede comprender secuencias nucleotídicas que se pierden, se eliminan o se reorganizan tras la integración. En otro modo de realización, la construcción se encuentra en forma circular y se genera *in vitro* o tras la escisión a partir del genoma de la célula huésped.

El término “elemento genético” se usa en su sentido más amplio e incluye una serie de dos o más secuencias nucleotídicas diseñadas en un orden particular respecto a las orientaciones 5' a 3' o 3' a 5' del elemento genético. Básicamente, el elemento genético comprende dos secuencias nucleotídicas en forma modular. El término “modular” no confiere ninguna limitación a la construcción o estructura de las secuencias nucleotídicas, pero enfatiza que una secuencia genética se divide en dos componentes, es decir, en componentes modulares. Tras la circularización, los dos componentes modulares se orientan juntos para constituir, después de la eliminación de cualquier secuencia extraña que incluyen secuencias intrón y secuencias de corte y empalme u otras secuencias de reconocimiento, una secuencia genética que muestra una actividad particular o propiedad que no está presente cuando la secuencia genética se encuentra en forma modular separada. En ciertas circunstancias, no es necesario eliminar las secuencias extrañas que interviene en los componentes modulares cuando están en forma circular, si su presencia no afecta a la función de los componentes modulares de manera substancialmente negativa, cuando se disponen en la orientación correcta entre ellas tras la circularización. Normalmente, los componentes modulares se refieren como porciones 5' y porciones 3' de una secuencia polinucleotídica. Una porción comprende desde unos pocos nucleótidos (es decir de 2 aproximadamente

a 500 aproximadamente) a muchos (es decir de 501 aproximadamente a 10.000 aproximadamente). Las porciones 5' y 3' pueden incluir una porción central.

En un modo de realización preferido, el elemento genético comprende, cuando se encuentra en forma circular, un promotor unido de manera operativa a la secuencia genética que comprende las dos secuencias modulares. Las dos secuencias modulares pueden estar separadas por una secuencia intrón, la señal de corte y empalme u otra secuencia de reconocimiento. El elemento genético comprende, por lo tanto, en forma lineal en dirección 5' a 3', una primera secuencia modular nucleotídica que comprende la porción 3' de una secuencia polinucleotídica, una secuencia promotora unida de manera operativa a la porción 5' de la secuencia polinucleotídica anteriormente mencionada. Tras la circularización, la porción 3' de la secuencia polinucleotídica se orienta y fusiona mediante ligamiento de bases a la porción 5' de la secuencia polinucleotídica y reconstituye de este modo una secuencia polinucleotídica funcional unida de manera operativa a un promotor. Según la construcción, una secuencia intrón, una señal de corte y empalme u otra secuencia de reconocimiento pueden separar las porciones 5' y 3' de la secuencia polinucleotídica reconstituida. Tras el procesamiento durante la expresión, la secuencia intrón, la señal de corte y empalme u otra secuencia de reconocimiento pueden escindirse. En un modo de realización particularmente preferido, el elemento genético comprende una secuencia terminadora de la transcripción unida de manera operativa y en dirección 3' de la porción 3' de la secuencia polinucleotídica. Los términos "promotor" y "terminador" se usan en el sentido más amplio y se describen detalladamente más adelante.

En otro modo de realización, la secuencia polinucleotídica reconstituida codifica una secuencia intrón, una señal de corte y empalme u otra secuencia de reconocimiento situada entre el promotor y la secuencia codificante. De acuerdo con este modo de realización, la secuencia de reconocimiento no se eliminaría durante la transcripción.

En otro modo de realización alternativo, el elemento genético comprende dos componentes modulares de un promotor u de otra secuencia reguladora. Preferiblemente, los componentes modulares forman una secuencia promotora la tras circularización. Si una secuencia intrón, una señal de corte y empalme u otra secuencia de reconocimiento separa los componentes modulares de una secuencia promotora, entonces esa secuencia no destruye o destruye parcialmente la actividad de la secuencia promotora. Alternativamente, el promotor es un promotor de RNA, como un promotor procedente de TMV, AMV o TEV.

La secuencia polinucleotídica, cuando se reconstituye, muestra una actividad o propiedad o una capacidad de mostrar una actividad o propiedad no presente en las secuencias nucleotídicas modulares por separado, previamente a la fusión tras la circularización. Tal actividad o propiedad incluye la habilidad de codificar un péptido, polipéptido o proteína con una función particular, la capacidad de codificar una secuencia mRNA, que puede ser posteriormente traducida en un péptido, polipéptido o proteína o que puede actuar como una molécula sentido o complementaria para la infraexpresión de un gen huésped u otra secuencia genética o actuar como promotor u otra secuencia reguladora. Otra propiedad que contempla las secuencias genéticas incluye la capacidad de unión a proteínas para interactuar con secuencias nucleicas reguladoras o para actuar o codificar moléculas de ribozima y/o desoxiribozima.

De particular importancia, la secuencia genética puede codificar proteínas que poseen actividad enzimática, actividad reguladora o actividad estructural o mostrar una actividad terapéutica si se administra a un mamífero como el ser humano o el ganado. Ejemplos del último tipo de moléculas incluyen las citocinas, interferones y factores de crecimiento. Las proteínas con actividad enzimática son particularmente preferidas y estas proteínas son útiles en la activación de una vía bioquímica, facilitando el flujo de metabolitos a través de una vía en particular, confiriendo propiedades como la resistencia a un insecticida, fungicida o herbicida o que confiere resistencia a un microorganismo patógeno como un microorganismo intracelular patógeno, incluyendo virus y microorganismos intracelulares. Las células que la construcción genética de la presente invención contempla como dianas incluyen células animales, células vegetales, organismos unicelulares y microorganismos. Las células animales pueden proceder de primates, humanos, ganado, aves, peces, reptiles, anfibios e insectos y arácnidos. Las células vegetales pueden proceder de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas.

En un modo de realización particularmente útil, el péptido, polipéptido o proteína codificados por la secuencia polinucleotídica induce a la apoptosis o a otra forma e muerte celular. Este hecho es particularmente útil como medio para otorgar resistencia genética a virus, por ejemplo, o para mediar la muerte celular de determinados tipos de células.

En un modo de realización, por ejemplo, la construcción se usa para otorgar resistencia a un virus DNA de cadena simple (ssDNA). Tales virus perjudican considerablemente a las industrias agrícolas y hortícolas al afectar a cultivos y plantas ornamentales importantes. Dos grupos de virus ssDNA que infectan plantas son los geminivirus y los nanovirus.

En un modo de realización, las secuencias flanqueantes que se reconocen mediante una proteína facilitadora de la replicación de origen viral o derivadas de esta u homólogos de células procariotas o eucariotas son estructuras nucleotídicas tallo/bucle. Preferiblemente, las estructuras tallo/bucle comprenden una secuencia nucleotídica corta en bucle de 5 a 20 nucleótidos aproximadamente, preferiblemente de 6 a 15 aproximadamente y más preferiblemente de 9 nucleótidos aproximadamente (es decir nonanucleótida) y que es el sitio de escisión y ligación de la proteína facilitadora de la replicación de origen viral o sus derivados o u homólogos de células procariotas o eucariotas. En otro modo de realización, las secuencias flanqueantes se reconocen mediante cualquier proteína con actividad de escisión y ligación. Un ejemplo de tal proteína es la topoisomerasa. A todas estas secuencias se les hace referencia

en este documento como “secuencias de reconocimiento”. Más preferiblemente, las secuencias de reconocimiento son reconocidas mediante la proteína “Rep”. Esta proteína deriva de miembros de los *geminiviridae* y *nanovirus* y se une a un dominio 5' en una estructura tallo/bucle que comprende la secuencia de reconocimiento. La presente invención, sin embargo, no se limita al uso de una estructura tallo/bucle, aunque se trata su uso en este documento. La presente invención incluye cualquier proteína Rep de *geminivirus* o de *nanovirus*, así como derivados de estos u homólogos procedentes de otros virus o de células eucariotas o procariotas. Ejemplos de células eucariotas incluyen las células de mamíferos, insectos, reptiles, anfibios y levaduras.

Ejemplos de otras secuencias de reconocimiento o sus equivalentes incluyen las regiones intergénicas de DNA 1-6 del BBTv, las repeticiones cortas y largas de TLCV o TYDV. Una “secuencia intrón” es una secuencia de nucleótidos que, tras la transcripción, posee la capacidad de ser escindida. En ciertas circunstancias, la secuencia intrón no se elimina, como cuando la presencia de la secuencia intrón no afecta de manera negativa al funcionamiento de la secuencia en la que se encuentra insertada la secuencia intrón.

La construcción de este aspecto de la presente invención puede comprender las mismas secuencias o substancialmente las mismas secuencias de reconocimiento como secuencias flanqueantes, es decir, las secuencias que se reconocen mediante una proteína Rep o sus derivados u homólogos o puede comprender secuencias de reconocimiento diferentes que se reconocen mediante proteínas Rep diferentes. Además, las secuencias de reconocimiento pueden ser secuencias completas o partes de secuencias como dos mitades de secuencias intrón.

La proteína Rep puede introducirse en una célula como resultado de una infección o puede codificarse mediante secuencias genéticas que se expresan durante el desarrollo o se expresan específicamente en un tejido en el animal, planta u organismo que contiene la construcción.

En otro modo de realización preferido, se proporciona una construcción que comprende un elemento genético flanqueado por secuencias de reconocimiento de la proteína Rep u homólogos funcionales de otros virus o de células eucariotas o procariotas, que facilitan la generación de una secuencia nucleotídica circular que comprende dicho elemento genético en presencia de una proteína Rep, en el que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep son adyacentes o están insertadas en una o varias secuencias de reconocimiento, dicho elemento genético que comprende una secuencia polinucleotídica unida de manera operativa a secuencias reguladoras necesarias para que se produzca la expresión de dicha secuencia polinucleotídica cuando dicho elemento genético se halla en una molécula circular, en la que el elemento genético en forma lineal comprende en orden 5' a 3':

- una secuencia polinucleotídica; y

- secuencias reguladoras para que se produzca la expresión de dicha secuencia polinucleotídica cuando se encuentra en forma circular,

De modo que tras la circularización el elemento genético comprende la secuencia reguladora separada de la secuencia polinucleotídica mediante una secuencia de reconocimiento de proteína Rep completa o parcial, en la que tras la expresión, dicha secuencia polinucleotídica codifica un producto de expresión.

Preferiblemente, las secuencias reguladoras incluyen o comprenden una secuencia promotora y opcionalmente un terminador de la transcripción. Como se indica anteriormente, una secuencia de reconocimiento incluye una secuencia extraña, como una secuencia intrón u otra señal de corte y empalme.

En otro modo de realización, se proporciona una construcción que comprende un elemento genético flanqueado por secuencias de reconocimiento de la proteína Rep, que facilitan la generación de una secuencia nucleotídica circular que comprende dicho elemento genético en presencia de una proteína Rep, en la que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep son adyacentes o están insertadas en una o varias secuencias extrañas que incluyen secuencias intrón o partes de ésta u otras señales de corte y empalme, dicho elemento genético que comprende una porción 3' y una porción 5' de un promotor separado por una longitud de una secuencia nucleotídica para evitar de manera substancial el funcionamiento de dicho promotor; dicho elemento genético en forma lineal comprende en orden 5' a 3':

- una porción 3' de dicho promotor;

- opcionalmente una secuencia polinucleotídica unida de manera operativa a dicha porción 3' de dicho promotor; y
- una porción 5' de dicho promotor,

De manera que tras la circularización el elemento genético comprende las porciones 5' y 3' de la secuencia promotora separadas por una secuencia de reconocimiento de proteína Rep completa o parcial, pero que no inactiva al promotor. Opcionalmente, dicha molécula circular comprende además el promotor unido de manera operativa a la secuencia polinucleotídica.

Alternativamente, el promotor es un promotor de RNA, tales como los que proceden de TMV, TEV o AMV.

Una de las ventajas de tal sistema es, por ejemplo, cuando la construcción está en forma lineal e integrado en una secuencia nucleotídica de mayor longitud como un genoma, la secuencia promotora está inactiva. Sin embargo, tras la

circularización, la secuencia promotora se reconstituye y permite de este modo la actividad del promotor. La secuencia polinucleotídica opcional unida de manera operativa se expresa entonces.

Ejemplos de promotores adecuados incluyen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Otros promotores útiles son los promotores de la ubiquitina. Normalmente, los promotores monocot como el promotor de la ubiquitina precisan de una secuencia intrón entre el promotor y el codón de inicio del exón que se expresa. En ausencia de esta secuencia intrón, la expresión del promotor es muy baja o completamente nula. La construcción genética de la presente invención puede diseñarse de manera que tras la circularización, la secuencia intrón que comprende la estructura tallo/bucle forme una secuencia intrón en dirección 3' del promotor de la ubiquitina, y permita así su función.

Más adelante se describen otros promotores.

En otro modo de realización preferido, la presente invención proporciona una construcción que comprende en orden 5' a 3' una primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta secuencias nucleotídicas en el que:

la primera y sexta secuencias nucleotídicas pueden ser iguales o diferentes y cada una comprende una secuencia de reconocimiento de la proteína Rep susceptible de ser reconocida por una o varias proteínas Rep o derivados u homólogos de estas, tales como material genético flanqueado por dicha primera y sexta secuencias, que incluyen totalmente o parcialmente dichas primera y sexta secuencias cuando dicha construcción se encuentra integrada en una secuencia nucleotídica de mayor longitud como una secuencia genómica, es susceptible de escisión y circularización, en el que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep son adyacentes o están insertadas en una o varias secuencias extrañas que incluyen secuencias intrón o partes de ésta u otras señales de corte y empalme;

la segunda secuencia nucleotídica comprende una porción 3' de secuencia polinucleotídica;

la tercera secuencia nucleotídica es un terminador de la transcripción o derivado funcional u homólogo de este, unido de manera operativa a dicha segunda secuencia;

la cuarta secuencia nucleotídica es una secuencia promotora unida de manera operativa a la quinta secuencia nucleotídica;

la quinta secuencia nucleotídica es una porción 5' de una secuencia polinucleotídica, en la que las porciones 5' y 3' de dicha secuencia polinucleotídica representan una secuencia codificante completa de dicha secuencia polinucleotídica;

en el que en presencia de una o varias proteínas Rep, cuando la construcción se encuentra integrada en una secuencia nucleotídica de mayor longitud como una secuencia genómica, se genera una secuencia genética circularizada separadamente de dicha secuencia nucleotídica de mayor longitud que comprende en orden dicha secuencia promotora unida de manera operativa a una secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia extraña completa o parte de esta u otra señal de corte y empalme que comprende toda o parte de dichas primera y/o sexta secuencias nucleotídicas y una secuencia terminadora de la transcripción.

De acuerdo con el aspecto mencionado anteriormente de la presente invención, la primera y la sexta secuencias nucleotídicas representan secuencias de reconocimiento para una proteína facilitadora de la replicación de origen viral como la Rep adyacente o insertada en una secuencia intrón u otra señal de corte y empalme. De la segunda a la quinta secuencias nucleotídicas representan los elementos genéticos previamente definidos.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido hacia un elemento genético para su uso en la generación de una construcción, dicho elemento genético que comprende en dirección 5' a 3', una porción 3' de una secuencia polinucleotídica unida de manera operativa a un terminador de la transcripción; un promotor unido de manera operativa a una porción 5' de una secuencia polinucleotídica, en la que tras la circularización, la porción 5' de la secuencia polinucleotídica se encuentra unida de manera operativa a dicha porción 3' de la secuencia polinucleotídica separada por una secuencia extraña completa o parte de esta o una secuencia intrón u otra señal de corte y empalme.

Las construcciones de la presente invención tienen múltiples aplicaciones. En un modo de realización, la construcción se usa para generar resistencia genética en células vegetales a virus ssDNA. Los virus concretos frente a los que se intenta proteger incluyen, aunque no se limitan a estos, a los geminivirus o nanovirus. En este modo de realización, la construcción comprende un "gen suicida", es decir, un gen que codifica un producto que induce la apoptosis celular, lisis, muerte o estado de latencia bioquímica o fisiológica. La construcción se introduce en una célula vegetal en condiciones que permitan la integración en el genoma de la célula vegetal. Una planta se regenera a partir de la célula vegetal y se propaga cuando la planta se infecta con un virus ssDNA particular que posee una proteína Rep que reconoce las secuencias de reconocimiento de la proteína Rep que flanquean el elemento genético de la construcción, la construcción se escinde y recirculariza y reconstituye de este modo el "gen suicida" y que facilita su expresión. La célula entonces muere o bien permanece en estado de latencia y previene así la replicación y liberación de virus ssDNA.

En un modo de realización particularmente preferido, la presente invención proporciona una construcción que comprende la secuencia nucleotídica de manera substancial como se establece en: NÚM. ID. SEC.:31 a NÚM. ID. SEC.:36 o una secuencia nucleotídica con el 60% similitud a cada una de SEQ ID N0:31 a NÚM. ID. SEC.:36 o una secuencia nucleotídica que puede hibridar a una o varias de NÚM. ID. SEC.: 31 a NÚM. ID. SEC.:36 o una forma complementaria de esta en condiciones poco restrictivas a 42°C.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención contempla un método para generar una planta transgénica o progenie de esta resistente a un virus ssDNA, dicho método que comprende la introducción de una construcción en el genoma de dicha planta que comprende en orden 5' a 3', una secuencia de reconocimiento de proteína Rep adyacente o en una secuencia intrón u otra señal de corte y empalme, una porción del extremo 3' de una secuencia polinucleotídica, un terminador de la transcripción o equivalente funcional, una secuencia promotora unida de manera operativa a una porción del extremo 5' de la secuencia polinucleotídica en el que las porciones 5' y 3' de la secuencia polinucleotídica representan la región codificante de un péptido, polipéptido o proteína capaz de inducir la muerte celular o latencia y secuencias iguales o diferentes de reconocimiento de la proteína Rep; en la que tras la infección por un virus ssDNA de dichas células vegetales que poseen una proteína Rep capaz de reconocer las secuencias flanqueantes de reconocimiento de la proteína Rep, la construcción se escinde y se circulariza y se reconstituye de este modo dicha secuencia polinucleotídica en una forma que se expresa en un péptido, polipéptido o proteína que mata la célula vegetal o bien reduce la célula vegetal a un estado de latencia.

Otro uso de la construcción instantánea es producir plantas de sexo masculino estériles. En este modo de realización, un gen que codifica una proteína Rep se somete bajo el control de un promotor específico del polen. Una construcción que comprende el "gen suicida" descrito anteriormente se genera también utilizando secuencias de reconocimiento de la proteína Rep que se reconocen mediante el gen Rep bajo el control del promotor específico del polen. Cuando se forma el polen, el promotor específico del polen se activa y también lo hace el gen suicida. Las células del polen se destruyen entonces selectivamente o se reducen a un estado de latencia.

Otros usos de la construcción que se describe en este documento incluyen la introducción de material genético que facilita un cambio de color en las plantas o en tejido específico o en las semillas u otro material reproductivo en las plantas. Un ejemplo de una secuencia genética que facilita un cambio de color es un gen que codifica una enzima de la vía de la antocianina, tal como la flavonal 3'-hidroxilasa, la flavonal 3',5'-hidroxilasa, o la flavona 3'-sintasa.

En otro modo de realización, la construcción puede estar flanqueada por dos secuencias de reconocimiento de la proteína Rep diferentes, es decir, que se reconoce mediante dos proteínas Rep diferentes. Una proteína Rep puede estar codificada por un gen insertado en el genoma de la planta y la otra proteína Rep puede introducirse por medio de un virus ssDNA infectivo. Alternativamente, las proteínas Rep pueden codificarse por diferentes promotores que se expresan en ciertos estadios del desarrollo.

Aunque la presente invención se describe particularmente en relación a plantas y virus ssDNA, la presente invención abarca estructuras de escisión homólogas y otras proteínas con escisión específica de lugar y actividades de unión de otras fuentes como los virus no-ssDNA y células no eucariotas como las células de insectos, mamíferos o reptiles. Siempre y cuando la presente invención haga referencia a plantas, estas pueden ser plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas.

El término "célula vegetal" como se utiliza en este documento incluye protoplastos u otras células derivadas de las plantas, células productoras de gametos y células que se regeneran en plantas completas. Las células vegetales incluyen las células en las plantas así como protoplastos u otra célula en cultivo.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" como se utiliza en este documento designa mRNA, RNA, cRNA, cDNA o DNA.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a las variantes del mismo.

Los términos utilizados para describir la relación entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "similitud de secuencias", "porcentaje de similitud de secuencias" y "similitud substancial". Una "secuencia de referencia" es al menos 12, pero frecuentemente de 15 a 18 y a menudo al menos 25 unidades monoméricas, incluidos los nucleótidos y residuos de aminoácidos de longitud. Ya que dos polinucleótidos pueden cada uno comprender (1) una secuencia (es decir, solamente una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que los dos polinucleótidos, las secuencias de comparación entre los dos (o más) polinucleótidos se realizan normalmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual al menos de 6 posiciones contiguas, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en los cuales una secuencia se compara a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima. La ventana de comparación puede abarcar las adiciones o las delecciones (es decir, los espacios) de aproximadamente el 20% o de menos con respecto a la secuencia de referencia (que no abarca adiciones o delecciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de

comparación se puede realizar mediante la implementación de algoritmos por ordenador (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el lanzamiento del Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, de Genetics Computer Group, Science Drive Madison, 575 (WI, los E.E.U.U.) o por la inspección y la mejor alineación (es decir, dando lugar al porcentaje de homología más alto sobre la ventana de comparación) generada por cualesquiera de los varios métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST divulgada por ejemplo por Altschul *et al.*, 1997. Una discusión detallada del análisis de secuencia se puede encontrar en la unidad 19,3 de Ausubel *et al.*, 1994-1998.

El término “similitud de secuencias” como se usa en este documento se refiere al grado en que las secuencias son idénticas nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido sobre una ventana de comparación. Así, un “porcentaje de similitud de secuencias” se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de las posiciones en las cuales aparece la base idéntica del ácido nucleico (e.j., A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (e.j., Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para producir un número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de similitud de secuencias. Para los propósitos de la actual invención, la “similitud de secuencias” significa el “porcentaje de apareamiento” calculado por el programa informático DNASIS (versión 2,5 para windows; disponible en Hitachi Software engineering Co., Ltd., San Francisco del sur, California, los E.E.U.U.) utilizando estándares predeterminados, como se utiliza en el manual de referencia que acompaña al software.

La referencia en este documento a las condiciones poco restrictivas incluye y abarca al menos de aproximadamente 0 a al menos aproximadamente un 15% v/v de formamida y al menos de aproximadamente 1 M al menos a la sal de aproximadamente 2 M para la hibridación, y al menos aproximadamente 1 M de sales a al menos aproximadamente 2 M para las condiciones de lavado. Generalmente, las condiciones restrictivas medias son de 25°C a 30°C aproximadamente a 42°C aproximadamente. La temperatura se puede modificar y se pueden utilizar temperaturas superiores para substituir la formamida y/o para establecer condiciones restrictivas alternativas. Las condiciones restrictivas alternativas pueden aplicarse cuando sea necesario, por ejemplo las condiciones medianamente restrictivas, que incluyen y abarcan al menos de aproximadamente 16% v/v de formamida v/v a al menos aproximadamente 30% v/v de formamida y al menos de aproximadamente 0,5 M de sales para la hibridación a al menos aproximadamente 0,9 M, y al menos aproximadamente 0,5 M de sales para las condiciones de lavado a al menos 0,9 M, o condiciones muy restrictivas, que incluyen y abarcan al menos de aproximadamente 31% de formamida v/v a al menos aproximadamente el 50% v/v y al menos de aproximadamente 0,01 M de sales para la hibridación a al menos aproximadamente 0,15 M, y al menos aproximadamente 0,01 M de sales para las condiciones de lavado a al menos aproximadamente 0,15 M. En general, el lavado se realiza a $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C) \%$ (Marmur y Doty, 1962). Sin embargo, el T_m de una cadena doble de DNA desciende 1°C con cada aumento del 1% en la cantidad de pares de bases desapareados (Bonner y Laskey, 1974). La formamida es opcional en estas condiciones de hibridación. Por consiguiente, las condiciones restrictivas particularmente preferidas se definen a continuación: condiciones poco estrictas son un tampón SSC 6X, SDS m/v 0,1% de 25°C a 42°C; las condiciones moderadamente restrictivas son un tampón SSC 2X, SDS m/v 0,1% a una temperatura que oscila entre 20°C y 65°C; condiciones muy restrictivas son un tampón SSC 0,1X, SDS 0,1% m/v a una temperatura de al menos 65°C.

El término “transformación” significa la alteración del genotipo de un organismo, por ejemplo, una célula eucariota, mediante la introducción de un ácido nucleico extraño o endógeno.

Por “vector” se entiende una molécula de ácido nucleico, preferiblemente una molécula de DNA que deriva, por ejemplo, de un plásmido, un bacteriófago, o un virus de una planta, en los que se inserta o se clona una secuencia de ácido nucleico. Un vector preferiblemente contiene uno o varios sitios de restricción únicos y puede replicarse de manera autónoma en una célula huésped definida, que incluye una célula o tejido diana o una célula progenitora o tejido de esta, o puede integrarse al genoma del huésped definido, de modo que la secuencia clonada sea reproducible. Por consiguiente, el vector puede ser un vector que se replica de manera autónoma, es decir, un vector que existe en forma de entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación del cromosoma, por ej., un plásmido lineal o circular, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier mecanismo que asegure la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser que cuando se introduce en una célula, se encuentra integrado en el genoma de la célula receptora y se replica conjuntamente con el cromosoma(s) en el que se ha integrado. Un sistema vector puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el DNA total que se introduce en el genoma de la célula huésped, o un transposón. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula en la que el vector se debe introducir. El vector puede incluir también un marcador de selección como un gen de resistencia a antibióticos, que puede utilizarse para la selección de transformantes adecuados. Los expertos en la materia son conocedores de tales genes de resistencia.

El término “gen” se usa en su sentido más amplio e incluye cDNA que corresponde a los exones de un gen. Por consiguiente, las referencias a un “gen” en este documento se debe considerar que incluyen:

(i) un gen genómico clásico formado por secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir intrones, secuencias sin traducir 5'- y 3'-); o

(ii) mRNA o cDNA que corresponde a las regiones codificantes (es decir exones) y secuencias sin traducir 5'- y 3'-del gen; y/o

(iii) una región estructural que corresponde a las regiones codificantes (es decir exones) que comprenden además secuencias sin traducir opcionalmente y/o una secuencia promotora heteróloga formada por regiones reguladoras de la transcripción y/o traducción capaces de conferir características de expresión a dicha región estructural.

El término "gen" se utiliza también para describir moléculas sintéticas o de fusión que codifican todo el producto funcional o parte de este, en particular, un producto mRNA sentido o complementario o un péptido, oligopéptido o polipéptido o una proteína activa biológicamente. Las referencias a un "gen" incluyen referencias a un "gen sintético".

El término "gen sintético" se refiere a un gen que no es natural como se ha definido anteriormente, que preferiblemente comprende al menos una o varias secuencias reguladoras de la transcripción o traducción unidas de manera operativa a una secuencia genética estructural.

El término "gen estructural" debe entenderse que se refiere a una secuencia nucleotídica que puede ser transmitida para producir mRNA y opcionalmente, codifica una molécula de un péptido, oligopéptido, polipéptido o una proteína activa biológicamente. Los expertos en la materia son conocedores de que no todos los mRNA pueden traducirse en un péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína, por ejemplo, si el mRNA carece de una señal con función de señal de inicio de la traducción o alternativamente, si el mRNA es un mRNA antisentido. La presente invención engloba claramente genes sintéticos que comprenden secuencias nucleotídicas, que no pueden codificar péptidos, oligopéptidos, polipéptidos o proteínas activas biológicamente. En particular, los presentes inventores han observado que tales genes sintéticos pueden ser ventajosos en la modificación de la expresión del gen diana en células, tejidos u órganos de un organismo eucariota.

El término "región de genes estructurales" se refiere a la parte de un gen sintético que se expresa en una célula, tejido u órgano bajo el control de una secuencia promotora a la que está conectado de manera operativa. Una región de genes estructurales puede ser operativa bajo el control de una secuencia promotora única o de múltiples secuencias promotoras. Por consiguiente, la región del gen estructural de un gen sintético puede comprender una secuencia nucleotídica que puede codificar una secuencia de aminoácidos o es complementaria a esta. En este aspecto, una región de genes estructurales que se usa en la realización de la invención instantánea puede comprender también una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácido que carece de un codón de inicio de la traducción funcional y/o un codón de parada de la traducción funcional y como consecuencia, no comprende un marco de lectura abierto completo. En este contexto, el término "región de genes estructurales" comprende también a las secuencias nucleotídicas no codificantes, como las secuencias secuencia arriba de 5'- o secuencia debajo de 3' de un gen que normalmente no se traduciría en una célula eucariota que expresa dicho gen.

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, una región de genes estructurales puede comprender también la fusión entre dos o más marcos de lectura abiertos de del mismo gen o de diferentes genes. En tales modos de realización, la invención puede utilizarse para modular la expresión de un gen, al escoger regiones no contiguas diferentes de estos o alternativamente, para modular la expresión de varios genes distintos simultáneamente, que incluyen diferentes genes de una familia multigénica. En el caso de una molécula de ácido nucleico de fusión que no es endógena de la célula eucariota y en particular comprende dos o más secuencias nucleotídicas derivadas de un microorganismo patógeno viral, la fusión puede proporcionar la ventaja añadida de que confiere inmunidad o protección frente a varios microorganismos patógenos, al seleccionar la expresión de genes en dichos microorganismos patógenos. Alternativamente o aparte, la fusión puede proporcionar una inmunidad más efectiva contra cualquier microorganismo patógeno al seleccionar la expresión de más de un gen de ese microorganismo patógeno.

Las regiones de genes estructurales particularmente preferidas de acuerdo con este aspecto de la invención son aquellas que incluyen al menos un marco de lectura abierto que se pueda traducir, más preferiblemente que incluyan además un codón de inicio de la traducción situado en el extremo 5' de dicho marco de lectura abierto, aunque no necesariamente en el extremo terminal 5' de dicha región del gen estructural. En este aspecto, a pesar de que la región de genes estructurales puede comprender al menos un marco de lectura abierto que se pueda traducir y/o un codón de inicio de la traducción AUG o ATG, la inclusión de tales secuencias no sugiere de ningún modo que la presente invención precise la traducción de la molécula de ácido nucleico que se introduce para modular la expresión del gen diana. Siempre que no esté sujeta a ninguna teoría o modo de acción, la inclusión de al menos un marco de lectura abierto que se pueda traducir y/o un codón de inicio de la traducción en la molécula de ácido nucleico en cuestión puede aumentar la estabilidad del producto de la transcripción del mRNA de esta y por lo tanto mejora la eficiencia de la invención.

La cantidad óptima de secuencias de genes estructurales que pueden aparecer en el gen sintético de la presente invención variará considerablemente, según la longitud de cada una de las secuencias de dicho gen estructural, su orientación y grado de similitud entre ellas. Por ejemplo, los expertos en la materia serán conocedores de la inestabilidad inherente de las secuencias nucleotídicas palindrómicas *in vivo* y de los problemas asociados a la construcción de genes sintéticos de gran longitud que comprenden secuencias nucleotídicas invertidas repetidas, debido a la tendencia de tales secuencias de recombinarse *in vivo*. A pesar de tales problemas, puede determinarse empíricamente la cantidad óptima de secuencias de genes estructurales que deben incluirse en los genes sintéticos de la presente invención por expertos en la materia, sin realizar ningún experimento y siguiendo los procedimientos estándar, como la construcción

del gen sintético de la invención que utiliza líneas celulares deficientes en recombinasa, que reduce la cantidad de secuencias repetidas hasta un nivel en el que se eliminan o minimizan las recombinaciones y se mantiene la longitud total de la secuencia del gen estructural múltiple en un límite aceptable, preferiblemente menos de 5 kb a 10 kb, más preferiblemente menos de 2 kb a 5 kb e incluso más preferiblemente menos de 0,5 kb a 2,0 kb de longitud.

Para su expresión en células eucariotas, la construcción generalmente comprende, además de la secuencia polinucleotídica, un promotor y opcionalmente otras secuencias reguladoras diseñadas para facilitar la expresión de la secuencia polinucleotídica.

Las referencias a un “promotor” en este documento deben entenderse en su contexto más amplio e incluyen las secuencias reguladoras de la transcripción de un gen del genoma clásico, que incluyen la caja TATA, que es necesaria para un inicio de la transcripción preciso, con la presencia de una secuencia de caja CCAAT o sin ella y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras en dirección 5', potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión del gen en respuesta a estímulos del desarrollo y/o estímulos externos, o de manera específica de tejido. Un promotor está normalmente, aunque no necesariamente, situado en posición corriente arriba o 5', o en la región del gen estructural, la expresión del cual regula. Además, los elementos reguladores que comprenden un promotor se posicionan normalmente en las 2 kb del sitio de inicio de la transcripción de un gen.

En este contexto, el término “promotor” se utiliza también para describir una molécula sintética o de fusión, o derivada que confiere, activa o potencia la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula.

Los promotores preferidos pueden contener además, copias de uno o varios elementos reguladores específicos, para potenciar más la expresión de la molécula sentido y/o modificar la expresión espacial y/o temporal de dicha molécula sentido. Por ejemplo, los elementos reguladores que confieren inducción por cobre pueden situarse adyacentes a una secuencia promotora heteróloga que dirige la expresión de una molécula sentido, que confiere por lo tanto a la expresión de dichas moléculas la característica de ser inducibles por cobre.

La colocación de una molécula de ácido nucleico bajo la regulación controlada por una secuencia promotora significa posicionar dicha molécula de manera que la secuencia promotora controle la expresión. Los promotores se sitúan normalmente en posición 5' (corriente arriba) a los genes que controlan. En la construcción de promotores heterólogos/combinaciones de genes estructurales, se prefiere situar al promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen, que es aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en su ubicación natural, es decir, el gen del que deriva el promotor. Como se conoce en la materia, pueden variar las distancias sin producir una pérdida de función del promotor. De manera similar, las posiciones preferidas para colocar una secuencia de un elemento regulador con respecto a un gen heterólogo bajo su control se definen mediante la posición del elemento en su ubicación natural, es decir, los genes de los que deriva. De nuevo, como se conoce en la materia, pueden darse algunas variaciones en esta distancia.

Ejemplos de los promotores adecuados para su uso en los genes sintéticos de la presente invención incluyen promotores derivados de virus, hongos, bacterias, animales y plantas que pueden funcionar en células vegetales, animales, de insectos, fúngicas, de levaduras o bacterianas. El promotor puede regular la expresión de la constitución del componente del gen estructural o en la diferenciación con respecto a la célula, el tejido u órgano en el que se produce la expresión o, con respecto al estado del desarrollo en el que se produce la expresión o en respuesta a estímulos externos como el estrés fisiológico o microorganismos patógenos o iones metálicos, entre otros.

Preferiblemente, el promotor puede regular la expresión de una molécula de ácido nucleico en una célula eucariota, un tejido o un órgano, al menos durante el periodo de tiempo en el que el gen diana se expresa y más preferiblemente precede inmediatamente también el principio de expresión detectable del gen diana en dicha célula, tejido u órgano.

Por consiguiente, los promotores constitutivos potentes son particularmente útiles para las finalidades de la presente invención o los promotores que pueden inducirse mediante una infección viral o el principio de la expresión de un gen diana.

Los promotores que operan en plantas y animales se prefieren particularmente para utilizarlos en la construcción de la presente invención. Ejemplos de promotores preferidos incluyen los promotores víricos, como el promotor del bacteriófago T7, el promotor del bacteriófago T3, promotor SP6, promotores bacterianos como el promotor del operador *lac*, promotor *tac*, promotores de virus como el promotor tardío de SV40, promotor temprano de SV40, promotor RSV-LTR, promotor CMV IE o promotores de virus que afectan a las plantas como el promotor CaMV 35S, promotor SCSV, promotor SCBV y similares.

En consideración del requerimiento preferido para la expresión de alto nivel, que coincide con la expresión del gen diana o precede a la expresión del gen diana, es muy recomendable que la secuencia promotora sea un promotor constitutivo potente en el huésped que interesa como el promotor CMV-IE o la secuencia promotora temprana del SV40, la secuencia promotora tardía del SV40 para las células de los mamíferos y el promotor CaMV 35S o el promotor del SCBV en ciertas células vegetales, entre otros. Los expertos en la materia serán conocedores de secuencias promotoras adicionales distintas a aquellas descritas específicamente.

En este contexto, los términos “en conexión operativa con” o “bajo el control de manera operativa” o similares deben indicar que la expresión de la región de genes estructurales o región de genes estructurales múltiple está bajo

el control de la secuencia promotora con la que está conectada en el espacio en una célula, un tejido, un órgano u organismo completo.

La construcción preferiblemente contiene adicionalmente los elementos reguladores para la transcripción eficiente, por ejemplo, una secuencia terminadora de la transcripción.

El término “terminador” se refiere a una secuencia de DNA situada al final de una unidad transcripcional, cuyas señales terminan la traducción. Los terminadores son secuencias de DNA 3' no traducidas que contienen normalmente una señal de poliadenilación, que facilita la adición de secuencias poliadeniladas al extremo 3' de un transcrito primario. Los terminadores activos en células vegetales son conocidos y están descritos en la literatura y pueden aislarse de bacterias, hongos, virus, animales y/o plantas o pueden sintetizarse de nuevo.

Como las secuencias promotoras, el terminador puede ser cualquier secuencia terminadora que sea operativa en las células, en los tejidos u en los órganos en los que se pretenda utilizar.

Ejemplos de terminadores particularmente adecuados para su uso en los genes sintéticos de la presente invención incluyen la señal de poliadenilación del SV40, la señal de poliadenilación del HSV TK, el terminador de CYC1, el terminador ADH, el terminador SPA, el terminador del gen de la nopalina sintasa (NOS) procedente de *Agrobacterium tumefaciens*, el terminador del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el terminador del gen *zein* procedente de *Zea mays*, las secuencias de terminación del gen de la subunidad pequeña del Rubisco (SSU), secuencias terminadoras del gen del virus del estancamiento subterráneo del trébol (SCSV), cualquier terminador de *E. coli* independiente de Rho, o el terminador lacZ alfa, entre otros.

En un modo de realización particularmente preferido, el terminador es la señal de poliadenilación del SV40 o la señal de poliadenilación del HSV TK, que son operativas en células, tejidos y órganos animales, terminador de la octopina sintasa (OCS) o la nopalina sintasa (NOS) activan en células, tejidos u órganos vegetales, o el terminador lacZ alfa activo en células procariotas.

Los expertos en la materia conocerán las secuencias terminadoras adicionales que pueden ser adecuadas para la realización de la invención. Tales secuencias pueden usarse sin más sin realizar ningún experimento.

Los métodos para introducir las construcciones en las células (es decir, la transfección o la transformación) son conocidos por los expertos en la materia.

Las construcciones descritas anteriormente son susceptibles de más modificaciones, por ejemplo, mediante la inclusión de secuencias nucleotídicas marcadoras que codifican una enzima marcadora detectable o un análogo funcional o derivado de estos, para facilitar la detección del gen sintético en una célula, un tejido o un órgano en el que se expresa. De acuerdo con este modo de realización, las secuencias nucleotídicas marcadoras estarán presentes en un formato que pueda traducirse y expresarse, por ejemplo, como un polipéptido de fusión con el producto(s) de traducción de cada una o varios de los genes estructurales o alternativamente como un polipéptido que no es de fusión.

Los expertos en la materia sabrán cómo producir los genes sintéticos descritos en este documento y los requisitos para la expresión de éstos, cuando se desee, en una célula específica o tipo celular en las condiciones deseadas. En particular, los expertos en la materia sabrán que las manipulaciones genéticas necesarias para realizar la presente invención pueden precisar de la propagación de una construcción genética descrita en este documento o a derivada de este en una célula procariota como la célula de *E. coli* o una célula vegetal o animal.

Las construcciones de la presente invención pueden introducirse en una célula, un tejido o un órgano adecuados sin modificación como DNA lineal, opcionalmente contenido por un portador adecuado, tal como una célula, una partícula viral o un liposoma, entre otros. Para producir una construcción genética, el gen sintético de la invención se inserta en un vector o liposoma, tal como un vector bacteriófago, un vector viral o un plásmido, cósmido o un vector de cromosoma artificial que se mantiene y/o se replica y/o expresa en la célula, en un tejido o en un órgano del huésped, en el que se introduce posteriormente.

Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona una construcción genética que al menos comprende un elemento genético como se describe en este documento y uno o varios orígenes de replicación y/o secuencias del gen marcador seleccionable.

Las construcciones genéticas son particularmente adecuadas para la transformación de una célula eucariota para introducir en esta rasgos genéticos nuevos, además de conferir resistencia frente a microorganismos patógenos virales. Tales rasgos nuevos adicionales pueden introducirse en una construcción genética separada o alternativamente, en la misma construcción genética, que comprende los genes sintéticos descritos en este documento. Los expertos en la materia reconocerán las ventajas significativas, en particular en términos de reducción de la cantidad de manipulaciones y requisitos de cultivo de tejidos y en el aumento de la relación coste-efectividad al incluir secuencias genéticas que codifican tales rasgos adicionales y los genes sintéticos descritos en este documento en una única construcción genética.

Generalmente, un origen de replicación o un gen marcador seleccionable adecuados para su uso en bacterias está separado físicamente de las secuencias genéticas que contiene la construcción genética que se pretende que se expresen o se transfieran a una célula eucariota o se integren en el genoma de una célula eucariota.

Como se utiliza en este documento, el término “gen marcador seleccionable” incluye cualquier gen que confiera un fenotipo a una célula en la que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con una construcción genética de la invención o un derivado de estas.

Los genes marcadores seleccionables adecuados que se tratan en este documento incluyen el gen de resistencia a la ampicilina (Amp^r), el gen de resistencia a la tetraciclina (Tc^r), el gen bacteriano de resistencia a la kanamicina (Kan^r), es el gen de la resistencia a la zeocina (la zeocina es un fármaco de la familia de la bleomicina que se lo comercializa por InVitrogen Corporation), el gen *AURI-C* que confiere resistencia al antibiótico aureobasidina A, el gen de resistencia a la fosfotricina, el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*), el gen de resistencia a la higromicina, el gen β -glucuronidasa (GUS), el gen de la acetiltransferasa del cloranfenicol (CAT), el gen que codifica la proteína verde fluorescente o el gen de la luciferasa, entre otros.

Preferiblemente, el gen marcador seleccionable es el gen *nptII* o gen Kan^r o el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP).

Los expertos en la materia conocerán otros genes marcadores seleccionables útiles para la realización de la presente invención y la invención en cuestión no está limitada por la naturaleza del gen marcador seleccionable.

La presente invención comprende a todas las construcciones genéticas como se describen en este documento básicamente, que incluyen además secuencias genéticas para mantenimiento y/o replicación de dicha construcción genética en procariotas o eucariotas y/o la integración de dicha construcción genética o parte de este en el genoma de una célula eucariota u organismo.

Los métodos estándar descritos anteriormente pueden utilizarse para introducir las construcciones en la célula, el tejido o el órgano, por ejemplo, la transfección mediada por liposomas o transformación, transformación de células con partículas virales atenuadas o células bacterianas, acoplamiento celular, procedimientos de transformación o transfección conocidos por los expertos en la materia.

Métodos adicionales para introducir DNA recombinante en el tejido o células de plantas incluyen, aunque no se limitan a estos, la transformación que utiliza CaCl₂ y variantes de la misma, captación directa de DNA en los protoplastos, captación de DNA mediada por PEG en los protoplastos, bombardeo de micropartículas, electroporación, microinyección de DNA, bombardeo de micropartículas de tejido explanto o células, infiltración al vacío de ácido nucleico en un tejido o en el caso de plantas, la transferencia de T-DNA de *Agrobacterium* al tejido de la planta.

Para el bombardeo de células con micropartículas, se propulsa una micropartícula al interior de una célula para producir una célula transformada. Cualquier metodología de transformación balística adecuada de la célula y aparato puede utilizarse al realizar la presente invención. Se presentan aparatos ejemplares y procedimientos por Stomp *et al.* (Patente estadounidense núm. 5,122,466) y Sanford y Wolf (Patente estadounidense núm. 4,945,050). Al utilizar procedimientos de transformación balística, la construcción genética puede incorporar un plásmido que puede replicarse en la célula que se desea transformar.

Ejemplos de micropartículas adecuadas para su uso en tales sistemas incluyen las esferas de oro de 1 a 5 μ m. La construcción de DNA puede depositarse sobre la micropartícula mediante cualquier técnica adecuada, como la precipitación.

En otro modo de realización de la presente invención, las construcciones genéticas descritas en este documento se adaptan para la integración en el genoma de una célula en la que se expresa. Los expertos en la materia serán conocedores de que para conseguir la integración de una secuencia genética o construcción genética en el genoma de una célula huésped, pueden ser necesarias ciertas secuencias genéticas adicionales. En el caso de las plantas, normalmente serán necesarias las secuencias de los bordes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti de la *Agrobacterium tumefaciens*.

La presente invención comprende además una célula, un tejido o un órgano aislados que comprenden las construcciones o partes de las mismas. La presente invención abarca también los tejidos, órganos y organismos regenerados completos derivados de dichas células, tejidos y órganos y a propágulos y progenie de los mismos, así como a semillas y otro material reproductivo.

Por ejemplo, las plantas pueden regenerarse a partir de células vegetales transformadas o tejidos u órganos en medios que contienen hormonas y las plantas regeneradas pueden tomar variedad de formas, como quimeras de células transformadas y células sin transformar; transformantes clónicos (p.ej. todas las células transformadas que contienen el casete de expresión); injertos de tejidos transformados y sin transformar (p.ej. un patrón transformado injertado en una púa sin transformar en especies de cítricos). Las plantas transformadas pueden propagarse por muchos medios, como por propagación clónica o técnicas de crianza clásicas. Por ejemplo, una primera generación (o T1) de plantas transformadas pueden autoreproducirse para proporcionar una segunda generación homocigota (o T2) de plantas transformadas y las plantas T2 se propagan además mediante técnicas de crianza clásicas.

En otro modo de realización, la construcción se usa para inducir modulación de la expresión de una secuencia genética diana. Por ejemplo, una construcción, cuando se encuentra en forma lineal, comprende en dirección 5' a 3' una secuencia complementaria, un promotor y una secuencia sentido. Estos elementos están flanqueados por secuencias de

reconocimiento de proteínas facilitadoras de la replicación de origen viral (p.ej. tallo bucle) o mamíferos o microbios homólogos. Una secuencia terminadora se sitúa fuera de la región flanqueada por la secuencia de reconocimiento. Tras la liberación durante la replicación, se produce una secuencia polinucleotídica que comprende formas complementarias y sentido de una secuencia genética diana.

La secuencia polinucleotídica resultante puede formar entonces un bucle en horquilla. La construcción puede variar para producir tándem o repeticiones múltiples, invertidas o combinaciones de estas. Tales construcciones son útiles para el silenciamiento de genes en células vegetales y animales. El orden de los elementos en forma lineal no es crucial. Por ejemplo, la posición de las secuencias sentido y complementaria pueden intercambiarse. Un ejemplo de construcción adecuada se muestra en la Figura 27.

La presente invención se describe además por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Vectores de expresión basados en el BBTV

Se construyó una serie de vectores de expresión que contenían el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S) que dirigía la expresión del gen que codifica la barnasa, en el que se introdujo el intrón del gen de la patata específico de tejido ST-LS1 inducible mediante la luz (NT-INTRON-CT). El terminador era derivado del gen que codifica la nopalina sintasa (nos) o el marco de lectura abierto principal (ORF) del DNA-6 del BBTV (BT6).

Las construcciones se ensamblaron mediante PCR con cebadores solapantes (Tabla 1) y se clonaron en vectores pGEM-T mediante técnicas estándar conocidas en la materia. El vector de expresión pTBN se construyó y se muestra en la Figura 1. pTBN (SEQ ID NO:66) representa el eje sobre el que otros vectores de expresión se construyeron. Se indican los nombres de los cebadores y los sitios de unión, así como el tamaño de cada secuencia. pTBN (como las otras construcciones) que se amplificó de manera escalonada. Inicialmente, los tres fragmentos se amplificaron por separado (es decir 35S, NT-INTRON-CT y nos). Se amplificó toda la secuencia al mezclar cada uno de los fragmentos con los cebadores +1 y -4 en la PCR.

El pTBN6 (NÚM. ID. SEC.:67) que se muestra en la Figura 2 contiene una región de 624 pb que contiene el CR-SL y el CR-M del DNA-6 del BBTV (6I), insertadas en el intrón.

El pTBN1 (NÚM. ID. SEC.:68) que se muestra en la Figura 3 contiene una región de 163 pb que contiene el CR-SL y CR-M del DNA-1 del BBTV (1I), insertadas en el intrón, de manera idéntica a pTBN6. El terminador nos se sustituyó por el terminador de 126 pb del ORF largo del BBTV DNA-6.

La recircularización de vectores está basada en pTBN6 y pTBN1. Estos están flanqueados por secuencias de reconocimiento Rep y están diseñados para recircularizar y posteriormente ser activos en la transcripción, sólo en presencia de la Rep del BBTV. Se construyeron tres vectores diferentes: pRTBN6, pRTBN1 y pRTBN1/6.

El pRTBN6 que se muestra en la Figura 4 se construyó a partir del pTBN6. Se amplificaron dos fragmentos que utilizaron +5 y -4 y +1 y -6 respectivamente. Estos se clonaron en el pGEM-T y se subclonaron para crear el pRTBN6.

El pRTBN1 que se muestra en la Figura 5 se construyó a partir del pTBN1 de modo similar al pRTBN6.

El pRTBN1/6 que se muestra en la Figura 6 era un híbrido de pRTBN1 y pRTBN6.

Se construyeron también vectores no traducibles para cada una de las construcciones mencionadas anteriormente (excepto para pTBN). En estos vectores, el codón de inicio del gen de la barnasa se eliminó utilizando el cebador +11 (véase la Tabla 1). Las construcciones se denominaron pUBN6, pUBN1, pRUBN6 y pRUBN1.

TABLA 1

Secuencias oligonucleotídicas de los cebadores

Ceba- dor	Nombre	Secuencia (5'-3')
1	TS1-H	AAGCTTCATGGAGTCAAAGA (NÚM. ID. SEC.:1)
		TCATTTGGAGAGGATCCATGGCACAGGTT (NÚM. ID.

ES 2 296 736 T3

2	5S1-B	SEC.:2)
5	-	B
2	2-35S	AACCTGTGCCATGGATCCTCTCCAAATGA (NÚM. ID. SEC.:3)
10	+	B
3	1-N	AAAATCAGATAAGAGCTCGATCGTTCAAA (NÚM. ID. SEC.:4)
15	-	N
3	2-B	TTTGAACGATCGAGCTCTTATCTGATTTT (NÚM. ID. SEC.:5)
20	-	N
4	OS4-H	AAGCTTTTCGCCATTCAGGCTGC (NÚM. ID. SEC.:6)
25	+	B
5	3-6	TATCATTAATTAGTAAGTTGTGCTGTAA (NÚM. ID. SEC.:7)
30	-	6
5	-B4	TTACAGCACAACCTACTAATTAATGATA (NÚM. ID. SEC.:8)
35	+	6
6	-B3	GGAAGGCAGAAGCGAGTAATATAATATT (NÚM. ID. SEC.:9)
40	-	B
6	4-6	AATATTATATTACTCGCTTCTGCCTTCC (NÚM. ID. SEC.:10)
45	+	B
7	5-I	ATCATTAATTAGTCACACTATGACAAAAG (NÚM. ID. SEC.:11)
50	-	I
7	-B6	TTGTCATAGTGTGACTAATTAATGATAAT (NÚM. ID. SEC.:12)
55	+	I
8	-B5	GACATTTGCATCAGTAATATAATATTTCA (NÚM. ID. SEC.:13)
60	-	B
8	6-I	AATATTATATTACTGATGCAAATGTCCCG (SEQ ID NO 14)
65	+	B
9	7-6T	TCAGATAAGAGCTCAGTAACAGCAACAAC (NÚM. ID. SEC.:15)
	-	6
		GCTGTACTGAGCTCTTATCTGATCTTTG (NÚM. ID.

9	T2-B	SEC.:16)
5	-	6 AAGCTTATTTCCTCAAATATACGT (NÚM. ID.
10	T4-H	SEC.:17)
10	+	U
11	NTBarn	GGATCCGCACAGGTTATCAAC (NÚM. ID. SEC.:18)

Ejemplo 2

Vectores de expresión basados en TYDV

(a) La construcción de un casete de expresión del gen indicador GUS que contiene intrones

El vector pCAMBIA 2301 se obtuvo de CAMBIA (Canberra, Australia). Este vector contiene un intrón de 189 pb de la catalasa en la porción 5' de la región codificante *uidA*. Se extrajeron la región promotora 35S del CaMV (800 pb), la región codificante *uidA* y el terminador nos del pCAMBIA 2301 como un fragmento *HindIII/SphI* y se insertó en un vector pGEM-T (Promega) digerido de forma similar. La construcción subsiguiente se denominó pGEM-2301. El promotor de 800 pb 35S del CaMV se substituyó por el promotor de mayor potencia de 530 pb 35S del CaMV mediante digestión con *NotI/BglII* y ligación. El vector subsiguiente se denominó p35S-2301 (Figura 7) y sirvió como molde para todos los pasos de clonación posteriores.

(b) Asilamiento de la región intergénica grande del mastrevirus del enanismo amarillo del tabaco (TYDV) e inserción en el intrón de la catalasa del p35S-2301

Un fragmento de 272 pb que contenía la región intergénica grande (LIR) (nt +1 a nt +272) del TYDV (Genoteca Acc M81103) se amplificó a partir de tejido procedente de hojas infectadas por el TYDV mediante PCR utilizando los cebadores LIR-F y LIR-R (véase la Figura 1). Este fragmento se denominó LIR.

Cebadores:

LIR-F 5' -GCTCTTCCTGCAGGCGGCCGCATTAAGGCTCAAGTACCGTA3'

[NÚM. ID. SEC.: 19]

LIR-R 5' - GCTCTTCGTCGACGAATTCATTTTCAACTTTGGGATGTCAC-3'

[NÚM. ID. SEC.:20]

El segmento que comprende el promotor 35S del CaMV (530 pb), el primer exón *uidA* (19 pb) y la mitad 5' del intrón de la catalasa (83 pb) se amplificó a partir del DNA del plásmido p35S-2301 mediante PCR, utilizando los cebadores 35S-IE y CAT-A. Este fragmento se denominó CAT-A.

Cebadores:

35S-IE 5' -GAATTCCATGGAGTCAAAGATTCA-3' [NÚM. ID. SEC.:21]

CAT-A 5' -GCCCCGCTGCAGAGTTTAAAGAAAGATCAAAGC-3' [NÚM. ID.

SEC.:22]

El segmento que comprende la mitad 3' del intrón de la catalasa (106 pb) y el segundo exón de *uidA* (1809 pb) se amplificó a partir del DNA del plásmido p35S-2301 mediante PCR, utilizando los cebadores CAT-B y GUS-*BstEII*. Este fragmento se denominó CAT-B.

Cebadores:

CAT-B 5' -GCCCCGGTCGACGATCTATTTTTTAATTGATTGG-3'

[NÚM. ID. SEC.:23]

GUS-BstEII 5' -TTCGAGCTGGTCACCTGTAATTCACACGTGGTG-3'

[NÚM. ID. SEC.:24]

Los productos resultantes de la PCR se clonaron en el pGEM-T y se comprobó la secuencia nucleotídica. Por último, cada fragmento se escindió (CAT-A con *EcoRI/PstI*, LIR con *PstI/SalI*, y CAT-B con *SalI/BstEII*) del pGEM-T y se ligaron conjuntamente en el p35S-2301 digerido con *EcoRI/BstEII* para crear el plásmido pTEST1 (Figura 8).

(c) *Determinación del efecto la inserción de la LIR de TYDV en el intrón de la catalasa sobre la expresión de GUS*

Con el fin de determinar si la expresión de GUS y por lo tanto el corte y empalme de intrones se afectaba por la inserción de la LIR del TYDV en el intrón de la catalasa del p35S-2301, se bombardearon en células embrionarias del banano con las construcciones y se estudió la actividad de GUS transitoriamente. El plásmido pTEST1 de la prueba y el plásmido p35S-2301 como control positivo se cubrieron con partículas de oro de 1 μm y se introdujo con técnicas biolísticas en células embrionarias de la banana de 5 días de vida (*Musa ssp. cv. "Ladyfinger" AAA*), de acuerdo con Becker *et al.* (2000). Dos días después del bombardeo, se recogieron las células y la actividad de GUS se estudió desde el punto de vista histoquímico (Jefferson *et al.*, 1987).

No se observó actividad GUS endógena en las células no bombardeadas. Se observó una actividad potente de GUS, visible en forma de mancha de células teñidas de color azul brillante en las células bombardeadas con el plásmido p35S-2301 de control positivo. Por el contrario, la expresión de GUS de las células bombardeadas con pTEST1, fue inferior (5 veces inferior aproximadamente) al determinarse la cantidad e intensidad del foco de células teñidas de azul. Este resultado sugería que la inserción de LIR del TYDV en el intrón de la catalasa del p35S-2301 no eliminaba la expresión de GUS, pero podía afectar al procesamiento del intrón en cierto grado.

(d) *Identificación de sitios de corte y empalme crípticos de intrones en el LIR del TYDV*

Con el fin de determinar si el LIR del TYDV contenía sitios potenciales de corte y empalme crípticos de intrones, que podían afectar al procesamiento del pre-mRNA, se sintetizó cDNA a partir de extractos RNA derivados de células bombardeadas con p35S-2301 y pTEST1. El RNA total se aisló de las células de la banana al cabo de dos días del bombardeo de p35S-2301 y pTEST1 con el método de Chang *et al.* (1993) Se sintetizó DNA complementario a partir del RNA total utilizando el cebador uidA2. Este cDNA se utilizó como molde para una PCR interna con los cebadores uidA1 y uidA3. Los productos resultantes de la PCR se clonaron en el pGEM-T y se secuenciaron. La secuenciación identificó dos sitios potenciales en el LIR del TYDV, que pueden contribuir a un corte y empalme aberrante del intrón de la catalasa del pre-mRNA de la región codificante de *uidA*. La primera secuencia, CTGCAGDGC, situada en el cebador LIR-F que se utilizó para aislar la LIR del TYDV, guarda una gran similitud con el sitio de corte y empalme 3' consenso (T (10X)GCAGVGT). La segunda secuencia, TAVGTGAGT (nt +43 a nt +50), comparte cierta similitud con el sitio de corte y empalme 5' consenso (AGVGTAAGT).

Cebadores:

uidA1 5' - CCATGGTAGATCTGAGGG-3' [NÚM. ID.

SEC.:25]

uidA2 5' -TACGTACACTTTTCCCGGCAATAAC-3' [NÚM. ID.

SEC.:26]

uidA3 5' -GTAACGCGCTTTCCCAACCAACGC-3' [NÚM. ID.

SEC.:27]

(e) Eliminación del sitio de corte y empalme críptico 3' de intrones del LIR del TYDV

De los dos sitios de corte y empalme crípticos de intrones que se identificaron, el primero (CTGCAGGC) se consideró el más significativo debido a su situación en relación con el sitio 5' de corte y empalme de intrones de la catalasa. Para eliminar esta secuencia del LIR del TYDV, se diseñó un cebador nuevo LIR-*Xho* que incorporaba un sitio *Xho*I en lugar de los sitios de restricción originales *Pst*I y *Not*I.

El LIR TYDV se reamplificó a partir del DNA del plásmido pTEST1 mediante PCR con los cebadores LIR-*Xho* y LIR-R. Este fragmento se denominó LIR-X. De manera similar, el fragmento que comprende el promotor 35S de CaMV (530 pb), el primer exón *uidA* (19 pb) y la mitad 5' del intrón de la catalasa (83 pb) se reamplificó a partir del DNA del plásmido pTEST1 mediante PCR con los cebadores FUP y CAT-*Xho*. Este fragmento se denominó CAT-X. Ambos productos de la PCR se clonaron en el pGEM-T y se comprobaron sus secuencias. Por último, los fragmentos de la PCR se escindieron del pGEM-T (LIR-X con *Xho*I/*Sal*I y CAT-X con *Pst*I/*Xho*I) y se ligaron en el pTEST1 digerido con *Pst*I/*Sal*I para reemplazar los insertos originales. Esta construcción se denominó pTEST2 (Figura 9). La eliminación del sitio de corte y empalme críptico de intrones en el pTEST2 generó una mayor expresión de GUS que el pTEST1 gracias a la disminución de corte y empalme aberrante y a la mejora del procesamiento de mRNA.

Cebadores:

LIR-*Xho* 5' -CTCGAGATTAAGGCTCAAGTACCGTA-3' [NÚM. ID.

SEC.:28]

CAT-*Xho* 5' -AGTTTAAAGAAAGATCAAAGC-3' [NÚM. ID.

SEC.:29]

FUP 5' -AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' [NÚM. ID.

SEC.:30]

(f) Construcción del vector de expresión de GUS activado por Rep

Un fragmento de 229 pb que contiene la región intergénica pequeña del TYDV (SIR) (nt +1275 a nt +1504) se amplificó del tejido de la hoja del tabaco infectado con TYDV mediante PCR con los cebadores SIR-F y SIR-R (véase la Figura 2). El producto resultante de la PCR se clonó en el pGEM-T y se comprobó la secuencia nucleotídica. Este plásmido se denominó pGEM-SIR. La SIR del TYDV se escindió del pGEM-SIR en forma de fragmento *Sph*I y se insertó en el único sitio de *Sph*I, en dirección 3' del terminador nos, en el pTEST1. Esta construcción se denominó pTEST1-SIR.

Cebadores:

SIR-F 5' -GCATGCAAGAGTTGGCGGTAGATTCCGCATGT-3' [NÚM. ID.

SEC.:31]

SIR-R 5' -GCTCTTCGCGGCCGCGCTCCTGAA.TCGTCGAGTCA-3' [NÚM.

ID. SEC.:32]

El promotor 35S de CaMV, el primer exón *uidA*, la mitad 5' del intrón de la catalasa y el LIR del TYDV se escindieron del pTEST2 en forma de un fragmento *Not*I/*Sal*I y se insertó en un vector pGEM-T digerido de manera similar. El clon subsiguiente denominó pGEM-CATX. El LIR del TYDV, mitad 3' del intrón de la catalasa, el segundo exón *uidA*, el terminador nos y la SIR del TYDV se escindieron a partir del pTEST1-SIR en forma de un fragmento *Not*I y se insertaron en el único sitio de *Not*I en el pGEM-CATX. Esta construcción se denominó pTEST3 (Figura 10). El casete activable de la expresión de GUS se escindió posteriormente del pTEST3 mediante digestión con *Sac*I/*Apa*I y se insertó en los sitios de restricción *Sac*I/*Apa*I situados en dirección 5' del casete promotor de nos-NPTII-terminador de nos en el plásmido binario pART27 (Gleave 1992). Esta construcción se denominó pTEST4 (Figura 11). El vector pTEST4 se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) mediante electroporación mediante el método de Singh *et al.* (1993).

(g) Construcción del TYDV 1.1 mer infeccioso

Se amplificaron dos fragmentos solapados del genoma del TYDV a partir del tejido de la hoja de tabaco infectado con el TYDV mediante PCR, con los pares de cebadores LIR-F/SIR-R (NÚM. ID. SEC.:19/NÚM. ID. SEC.:32) y LIR-R/TYD-3F (NÚM. ID. SEC.:20/NÚM. ID. SEC.: 33). Los productos resultantes de la PCR (TYD-R y TYD-L, respectivamente) se clonaron en el pGEM-T y se comprobaron sus secuencias. Estos plásmidos se denominaron pGEM-TYD-R y pGEM-TYD-L, respectivamente. Un fragmento de 1659 pb del genoma del TYDV se escindió del pGEM-TYD-L mediante digestión con *EcoRI* y se insertó en el único sitio de *EcoRI* en el pGEM-TYD-R. Esta construcción se denominó pGEM-TYDV1.1mer. El TYDV 1.1mer se escindió del pGEM-TYDV 1.1mer mediante digestión parcial con *SalI/EcoRI* y se insertó en el vector pBI101.3, digerido de manera similar (Clontech), para reemplazar el gen *uidA* y el terminador nos. Esta construcción se denominó pBI-TYDV1.1mer (Figura 12). El vector pBI-TYDV1.1mer se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) mediante electroporación con el método de Singh *et al.* (1993).

Cebadores:

TYD-3F 5'-TTTAAACGTTTAGGGGTTAGCA-3' [NÚM. ID. SEC.:33]

(h) Construcción de la fusión entre CaMV 35S- TYDV Rep

El gen completo de la Rep (que incluye RepA) del TYDV (nt +2580 a nt +1481) se amplificó a partir de tejido de las hojas de tabaco infectadas con el TYDV mediante PCR con los cebadores TYDVRepF y TYDVRepR. El producto resultante de la PCR se clonó directamente en el sitio *SmaI* situado entre el promotor CaMV 35S (530 pb) y el terminador de CaMV 35S (200 pb) en pDH51 (Pietrzak *et al.*, 1986). Esta construcción se denominó p35S-Rep (Figura 13).

Cebadores:

TYDVRepF 5'-TCAGTGACTCGACGATTC-3' [NÚM. ID. SEC.:34]

TYDVRepR 5'-TTAATATGCCTTCAGCCC-3' [NÚM. ID. SEC.:35]

Ejemplo 3

Análisis de la expresión de GUS mediante el uso de vectores TYDV

(a) Expresión activada por Rep transitoria de GUS en células mono y dicotiledóneas

Las células de tabaco (NT-1) se mantienen esencialmente tal y como describe An (1985), y se preparan para el bombardeo con micropartículas como detallada Dugdale *et al.* (1998). Las suspensiones de células embrionarias de banana (*Musa spp.* Cv. "Ladyfinger" AAA) se prepararon como se describe previamente. El recubrimiento de las partículas de oro y los parámetros biolísticos fue esencialmente como describen Dugdale *et al.* (1998) o Becker *et al.* (2000).

Los plásmidos utilizados para este estudio fueron:

(i) p35S-2301 como control positivo (Figura 7),

(ii) pTEST3 (Figura 10),

(iii) p35S-Rep (Figura 13), y

(iv) pTEST3 y p35S-Rep.

Se bombardean cinco placas de ambas líneas celulares con cada una de las cuatro combinaciones plasmídicas. Las células se recolectan tres días después del bombardeo y se analiza la actividad de GUS histoquímica y/o fluorométricamente (Jefferson *et al.*, 1987).

No se observa actividad GUS endógena en las células no bombardeadas. En las células bombardeadas con el plásmido p35S-2301 como control positivo se observa una fuerte actividad GUS, evidente en forma de focos celulares teñidos de azul vivo. No se observa expresión de GUS en las células bombardeadas con p35S-Rep o con pTEST3. En contraste, las células bombardeadas con ambos plásmidos, p35S-Rep y pTEST3, tiñen intensamente de azul, más que aquellas obtenidas con el plásmido control positivo de p35S-2301. Este resultado sugiere que solo bajo la adición de Rep TYDV en *trans* hace que el casete de expresión de GUS en pTEST3 se active.

(b) *Detección del corte, la unión y la replicación asistidos por Rep en el episoma de planta multicopia (MPE) de GUS*

La detección de los MPEs GUS basados en TYDV se consigue mediante PCR. Los cebadores uidA1 (NÚM. ID. SEC.:25) y uidA3 (NÚM. ID. SEC.:27) amplifican un fragmento del gen *uidA* (abarcando el intrón de catalasa) el intrón de la catalasa. Sólo en la liberación asistida por Rep del MPE basado en TYDV del plásmido pTEST3 ésta combinación de cebadores genera un producto de 600 pb (que incluye 140 pb del gen *uidA*, 190 pb del intrón de la catalasa y 270 pb del LIR de TYDV) en una PCR.

Las células NT-1 de tabaco y de banana se bombardean con cada una de las cuatro combinaciones plasmídicas citadas arriba. Tres días después del bombardeo, se recogen las células y se extrae el gDNA total utilizando el método de Stewart and Via (1993). El gDNA total (1 µg) se utiliza como molde para una PCR con los cebadores uidA1 (NÚM. ID. SEC.:25) y uidA3 (NÚM. ID. SEC.:27). Los productos de la PCR se electroforizan a través de un gel de agarosa al 1,5% m/v. A partir del gDNA de las células bombardeadas con el plásmido control p35S-2301 (Figura 7), se obtiene un producto de 330 pb. Este producto correspondía al *uidA* y a la secuencia del intrón de la catalasa del DNA del plásmido de entrada. A partir del gDNA de las células no bombardeadas o de las células bombardeadas con pTEST3 o con p35-Rep solos, no se obtuvo ningún producto de PCR. A partir de las células de gDNA bombardeadas con pTEST3 y p35S-Rep se obtuvo un producto de 600 pb. Este resultado apoya los análisis histoquímicos de GUS previos y sugiere que los MPEs basados en TYDV se generan únicamente en las células bombardeadas con ambos plásmidos pTEST3 y p35S-Rep.

La replicación de los MPEs basados en TYDV se evalúa mediante hibridación Southern. Utilizando este procedimiento, las formas multiméricas de los MPE, indicativas de replicación en círculo rodante, se detectan mediante hibridación. El gDNA total (20 µg) de las células bombardeadas con cada una de las cuatro combinaciones plasmídicas, se electroforiza a través de un gel de agarosa al 1,5% m/v. El DNA se transfiere a una membrana de nailon (Roche) mediante el método Southern (1975). Se amplificó una sonda de 600 pb marcada con DIG, específica para *uidA* y el intrón de la catalasa mediante PCR, utilizando los cebadores uidA1 (NÚM. ID. SEC.:25) y uidA3 (NÚM. ID. SEC.:27). La sonda específica de *uidA* se hibrida con la membrana de nailon a 42°C en solución DIG Easy-Hyb (Roche) y la señal se detecta utilizando el sustrato CDP-Star (Roche) según las instrucciones del fabricante. Las formas características superhelicoidales, lineales, y circulares abiertas, y las formas multiméricas de peso molecular superior de los MPEs basados en TYDV sólo se detectan en el gDNA procedente de células vegetales bombardeadas con ambos plásmidos, pTEST3 y p35S-2301. En conjunto estos resultados confirman que, cuando se proporcionan en *trans*, el Rep TYDV es capaz de cortar, unir, y replicar el MPE basado en TYDV en los tipos celulares mono y dicotiledóneo. Además, estos resultados sugieren que la expresión de *uidA* a partir del plásmido pTEST3 sólo se activa tras la adición del Rep TYDV, y la adición resulta en una expresión significativamente más alta que un casete de expresión de GUS no replicativo (p35S-2301).

Ejemplo 4

Transformación estable de una planta monocotiledónea y una dicotiledónea con el casete activable por Rep

Las suspensiones de células embrionarias de banana (*Musa spp.* Cv. "Ladyfinger" AAA) son la diana para la transformación estable basada en microproyectiles. Se bombardean las células con pTEST3, como se describe previamente, con la excepción que el plásmido se co-transforma con 1 µg de pDHKAN (Pietrzak *et al.*, 1986). Este plásmido contiene un casete promotor 35S de CaMV-NPTII-terminador 35S de CaMV, a partir del cual la expresión del gen NPTII confiere resistencia a los antibióticos canamicina o geneticina. La selección, el cultivo y la regeneración de las plantas de banana transgénicas se realizan esencialmente como describen Becker *et al.* (2000). Se confirma que las plantas transgénicas independientes contienen ambos genes, NPTII y *uidA* mediante PCR, utilizando los pares de cebadores NPT-F/NPT-R y uidA4/uidA5, respectivamente. Se seleccionan diez transformantes independientes para los siguientes estudios.

NPT-F 5' -ATGATTGAACAAGATGGATT-3' [NÚM. ID. SEC.:36]

NPT-R 5' -TGAGAAGAACTCGTCAAGA-3' [NÚM. ID. SEC.:37]

uidA4 5' -GTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTA-3' [NÚM. ID. SEC.:38]

uidA5 5' -CTAGCTTGTTTGCCTCCCTGCTGCG-3' [NÚM. ID. SEC.:39]

El tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. "Samsun") se transforma mediante la infección de discos de hoja mediada por *Agrobacterium* según el método de Horsch *et al.* (1988). Se transforman diez plantas transgénicas independientes con el T-DNA del plásmido pTEST4. Cada línea contiene las regiones codificantes de NPTII y *uidA* mediante PCR, como se describe arriba.

Los trozos de hojas de cada una de las diez líneas de bananas y de tabaco transgénicos transformadas con el casete de expresión de GUS activable por Rep (es decir, pTEST3 [Figura 19] y pTEST4 [Figura 11], respectivamente) se bombardean con el plásmido p35S-Rep. Tres días después del bombardeo, los trozos de hoja se someten a análisis histoquímicos de GUS. La expresión de GUS no es evidente en los trozos de hojas no bombardeados de cada una de las diez líneas de banana y tabaco. Los trozos de hoja bombardeadas con el plásmido p35S-Rep, muestran múltiples focos de tinción azul de GUS. En estos trozos de hoja, se confirma el corte, la unión, y la replicación de los MPEs basados en TYDV, como se describe previamente. Estos resultados indican que el Rep TYDV es capaz de activar la expresión de GUS a partir de una copia integrada de forma estable de cualquier plásmido, y es capaz de cortar, unir y replicar el MPE basado en TYDV *in vivo*.

Ejemplo 5

Expresión activada de la infección de TYDV en el tabaco transgénico

Cada una de las diez líneas de tabaco transgénicas se infiltra con cultivos de *Agrobacterium* transformados con pBI-TYDV 1,1 nucleótidos (remitirse a Ejemplo 2 (f), Figura 12) utilizando el método de Boulton (1995). Después de un periodo de dos meses, se recogen las muestras del punto de infección y por toda la planta, y se evalúa la expresión de GUS utilizando análisis histoquímicos. La actividad GUS (es decir, tejido teñido de azul) sólo se observa en las plantas infectadas con TYDV, comparado con los controles inoculados de forma simulada. Con el tiempo, la expresión de GUS se expande, *vía* la vasculatura, desde el punto de infección hacia varias partes de la planta. El corte, la unión y la replicación del casete de expresión de GUS dirigidos por Rep se establece como se describe previamente. Este resultado sugiere que la infección con TYDV es suficiente para la liberación replicativa del casete de expresión de GUS a partir de una copia cromosómica integrada.

Ejemplo 6

Análisis de muerte celular transitoria utilizando vectores de expresión basados en BBTv

Para demostrar que la barnasa era capaz de causar la muerte celular, se realizaron los análisis con los vectores de expresión (pTBN, pTBN6, pTBN1, Figuras 1, 2 y 3). Los controles negativos fueron pUBN6 y pUBN1 (remitirse a Ejemplo 1, arriba). Cada una de estas construcciones se co-bombardeó con un vector GUS en suspensiones de células embrionarias de banana (*Musa spp* cv. Bluggoe) esencialmente como se describe por Dugdale *et al.*, 1998. El vector GUS contenía un promotor fuerte (*Ubi1* de maíz, 35S de CaMV o *Act1* de banana) que conducía a la expresión del gen indicador, la β -glucoronidasa (Jefferson, 1987). Análisis posteriores MUG para la actividad GUS mostraron que las células que se habían transformado con pTBN, pTBN6 o pTBN1 tenían una actividad GUS inferior que la que tenía el control negativo (pUBN1 o pUBN6) (Figura 14). Esto sugiere que el corte y empalme del intrón todavía tiene lugar, y que al menos en el caso del pTBN1, no difiere significativamente del vector original pTBN. Así, la inclusión de los elementos de replicación de BBTv en el intrón no redujo significativamente la eficacia del corte y empalme o la posterior actividad barnasa, en relación al pTBN.

Se llevaron a cabo experimentos que mostraron que la recircularización y replicación de “1.1 mers” basados en BBTv tiene lugar en presencia de Rep (producto génico a partir del DNA-1 de BBTv). También se encontró que aumentaba la replicación mediante la inclusión del producto génico del DNA-5 de BBTv (una proteína con tendencia a enlazarse al retinoblastoma putativo). Consecuentemente, cada uno de los vectores de recircularización (pRTBN6 [Figura 4], pRTBN1 [Figura 5], pRUBN6, pRUBN1) se bombardeó con el DNA-1 y 5 de BBTv de “1.1 mers” y un vector de expresión de GUS.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Combinaciones plasmídicas utilizadas para el bombardeo con microproyectiles de células de banana

Marcador del eje de las x (Figura 15)	RTBN6	RUBN6	RTBN1	RUBN1
BBTV1	√	√	√	√
BBTV5	√	√	√	√
GUS	√	√	√	√
RTBN6	√	-	-	-
RUBN6	-	√	-	-
RTBN1	-	-	√	-
RUBN1	-	-	-	√

Los resultados que se muestran en la Figura 15 apoyaban a los previos análisis de muerte celular del vector de expresión (Figura 14). Otra vez, las construcciones que contenían barnasa no traducible (pRUBN6 y pRUBN1) tenían una actividad GUS superior a la de las construcciones traducibles.

Se realizaron experimentos para demostrar que la actividad barnasa estaba inducida sólo en presencia de la proteína Rep. Consecuentemente, se llevaron a cabo análisis +/- Rep ("1.1 mer" DNA-1 de BBTV) para demostrar que la expresión sólo tendría lugar cuando estaba presente (Tabla 3). Se utilizó DNA de relleno para mantener una concentración de DNA constante.

TABLA 3

Combinaciones plasmídicas para el bombardeo con microproyectiles de células de banana

Marcador del eje de las x (Figura 16)	RTBN6+	RTBN6-	RUBN6+	RTBN1+	RTBN1-	RUBN1+
BBTV1	√	-	√	√	-	√
BBTV5	√	√	√	√	√	√
GUS	√	√	√	√	√	√
RTBN6	√	√	-	-	-	-
RUBN6	-	-	√	-	-	-
RTBN1	-	-	-	√	√	-
RUBN1	-	-	-	-	-	√
Stuffer	-	√	-	-	√	-

Para observar si las construcciones de recircularización podían de replicar en presencia de "1.1 mer" DNA-1 y 5 de BBTV, se incluyeron las construcciones no traducibles en los ensayos de replicación de las células de banana transitoria. Se recolectaron las células 0,4 y 8 días después del bombardeo, se extrajo el DNA celular total y se analizó mediante hibridación Southern.

Inicialmente, las membranas se marcaron con una sonda de 35S de CaMV marcada con DIG. Las formas no replicativas eran evidentes en las células al día 4 o 8. Sin embargo, al día 0, las formas potencialmente replicativas se encontraban en concentraciones muy bajas, tanto en los plásmidos pRUBN6, como en pURBN1. Se sacó la sonda 35S se y las membranas se volvieron a marcar con una sonda del DNA-1 del BBTV marcada con DIG. Se observaron altos niveles de replicación en las células recogidas los días 4 y 8, y casi no había replicación en las células recogidas el día 0.

Ejemplo 7

10 *Análisis de muerte celular utilizando vectores de expresión basados en TYDV*

(a) *Un vector de un gen suicida activable por Rep para conferir resistencia a TYDV*

El plásmido pRTBN (DNA Plant Technologies, Oakland, California) contiene la región que codifica la barnasa (339 pb) en la que se ha incorporado el intrón LS1 de la patata (188 pb). El gen de la barnasa y el intrón enteros se amplificaron a partir del pRTBN mediante PCR utilizando los cebadores BARN.EXP1 y BARN.EXP2. Se amplificó un control génico no traducible de forma semejante utilizando los cebadores BARN.UTR y BARN.EXP2.

20 Cebadores:

BARN.EXP1 5'-GGATCCATGGCACAGGTTATCAACACGTTTGACG-3' [NÚM. ID. SEC.:40]

BARN.EXP2 5'-CTAGAGTTATCTGATTTTTGTAAAGGTC-3' [NÚM. ID. SEC.:41]

BARN.UTR 5'-GGATCCGCACAGGTTATCAACACGTTTGACG-3' [NÚM. ID. SEC.:42]

Los productos de la PCR se clonaron en un vector pGEM-T. Estos clones se nombraron pGEM-BTR y pGEM-BUTR, respectivamente. Se escindió el LIR de TYDV (LIR-X) como un fragmento EcoRI a partir del pGEM-T y se insertó en el sitio *MfeI* localizado en el intrón LTS de patata del pGEM-BTR y del pGEM-BUTR. Estos plásmidos se nombraron pBTR-LIR y pBUTR-LIR, respectivamente. Los genes de barnasa que contenían la secuencia LIR en pBTR-LIR y pBUTR-LIR se escindieron como fragmentos *BamHI/PstI* y se insertaron en un vector pGUS2 digerido de forma semejante para reemplazar la región codificante de *uidA* original. El plásmido pGUS2 contiene un promotor 35S de CaMV (530 pb)-gen *uidA*-terminador 35S de CaMV (200 pb). Estas construcciones se nombraron p35S-BTR-LIR y p35S-BUTR-LIR, respectivamente (Figura 17). Se construyeron dos plásmidos de control mediante la escisión de los genes de la barnasa de los plásmidos pGEM-BTR y pGEM-BUTR con *BamHI/PstI*, y la inserción en pGUS2 digerido de forma semejante. Estos plásmidos de control se nombraron p35S-BTR y p35S-BUTR, respectivamente (Figura 18).

(b) *Evaluación transitoria de la actividad barnasa activada por Rep en TYDV en células mono y dicotiledóneas*

Para poder determinar la actividad barnasa *in vivo*, se co-bombardean construcciones suicidas con un casete de expresión de una proteína verde fluorescente (pvf). Se considera que la expresión y la acción de la barnasa (p. ej. muerte celular) tienen lugar cuando se observa una reducción significativa en los focos fluorescentes verdes en comparación con los controles de barnasa no traducible.

Las células de banana (*Musa* spp. Cv. "Ladyfinger") y de tabaco (*Nicotiana tabacum* NT-1) se bombardean con los plásmidos (i) p35S-BTR, (ii) p35S-BUTR, (iii) p35S-BTR-LIR, y (iv) p35S-BUTR-LIR (Figuras 17 y 18) como se describe en el Ejemplo 3, arriba. Cada plásmido se co-bombardea con 1µg de pWORM. La construcción pWORM contiene casete con un promotor 35S de CaMV (530 pb)-pvf (750 pb)-terminador 35S de CaMV (200pb) y previamente se ha demostrado que provee de una fuerte fluorescencia verde en los análisis transitorios con ambos tipos celulares (Dugdale *et al.*, 1998).

Tres días después del bombardeo, se visualiza la fluorescencia verde utilizando un microscopio estereoscópico Leica MZ12 con un módulo de fluorescencia PVF-Plus (excitación=490, emisión=510). Ambos plásmidos, p35S-BTR y p35S BTR-LIR, reducen significativamente la expresión de pvf a partir de pWORM (como determinan el número y la intensidad de los focos de fluorescencia verde) en comparación con p35S-BUTR y p35S-BUTR-LIR. Este resultado sugiere que la inserción del LIR de TYDV al intrón LS1 de ST en p35S-BTR no interfiere con el tratamiento del intrón ni inhibe la expresión de la barnasa.

(c) Construcción del vector Barnasa activable por Rep de TYDV

El promotor 35S de CaMV, la mitad 5' del gen de la barnasa, la mitad 5' del intrón LS1 de ST y el LIR de TYDV se re-amplifican a partir de p35S-BTR-LIR (Figura 17A) mediante una PCR utilizando los cebadores 35S-IE (NÚM. ID. SEC.:21) y LIR-R (NÚM. ID. SEC.:20). El producto de la PCR se clona al vector pGEM-T y se verifica la secuencia. Este plásmido se nombra pGEMB5'. La región LIR de TYDV, mitad 3' del intrón LS1 de ST, la mitad 3' del gen de la barnasa y el terminador nos se escinde del p35S-BTR-LIR como un fragmento *XhoI/SacI*, el SIR de TYDV se escinde del pGEM-SIR como un fragmento *SacI/NcoI*, y el promotor 35S de CaMV, la mitad 5' del gen de la barnasa, la mitad 5' del intrón LS1 de ST y el LIR de TYDV se escinden del pGEMB5' como un fragmento parcial de *NcoI/SacII*. Los insertos se ligan con un pBluescript II (Stratagene) digerido con *XhoI/SacII*. La construcción resultante se nombra pBTR.test1 (Figura 19A). La región no traducible del vector control se prepara de una forma semejante y la construcción resultante se nombra pBUTR.test1 (Figura 19B).

(d) Expresión transitoria de la barnasa activada por Rep de TYDV en células mono y dicotiledóneas

Las células de banana (*Musa spp.* Cv. "Ladyfinger") y de tabaco (*Nicotiana tabacum* NT-1) se bombardean, como se describe anteriormente, con las combinaciones plasmídicas que se enumeran en la Tabla 4, abajo:

TABLA 4

Combinaciones plasmídicas para los análisis de transformación transitorios en células de banana y de tabaco, y la expresión de pvf resultante (valorada como + o -)

Combinación plasmídica	p35S-BTR pWORM	p35S-BUTR pWORM	pBTR-test1 pWORM	pBUTR-test1 pWORM	pBTR-test1 pWORM p35S-Rep	pBUTR-test1 pWORM p35S-Rep
Foco de fluorescencia verde 3 días después del bombardeo	no	si	si	si	no	si

Los resultados de la Tabla 4 sugieren que la expresión de la barnasa (y por tanto de la muerte celular) sólo se activa a partir de pBTR-test1 cuando el Rep de TYDV se proporciona en *trans*. La expresión activada por Rep del casete génico de la barnasa no traducible (pBUTR-test1) resulta en una reducción no significativa de la expresión de pvf a partir de pWORM. El corte, la unión, y la replicación asistidos por Rep de los MPEs de las células bombardeadas con pBUTR-test1, pWORM y p35S-Rep se confirma como se describe previamente, exceptuando la utilización de los cebadores BARN.UTR (NÚM. ID. SEC.:40) y BARN.EXP2 (NÚM. ID. SEC.:41) para la PCR y la sintetización de una sonda específica para la barnasa y marcada con DIG utilizando los cebadores antes mencionados.

(e) Construcción de plásmidos binarios que contienen los casetes génicos de la barnasa activables por Rep

Los casetes de la barnasa activables por Rep se escinden de pBTR-test1 y pBUTR-test1 como fragmentos *PvuII* y se insertan en el único sitio *EcoRI* (de extremo romo utilizando el fragmento klenow grande de la DNA polimerasa I) localizado en 3' del casete promotor 35S de CaMV-NPTII-terminador 35S de CaMV en el plásmido binario pTAB5 (CSIRO, Canberra, Australia). Las construcciones resultantes se denominan pTAB-BTR1 y pTAB-BUTR1, respectivamente. Ambos vectores se introducen en *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) mediante electroporación utilizando el método de Singh *et al.* (1993).

(f) *Transformación estable de una planta monocotiledónea y una planta dicotiledónea con los casetes de la barnasa activables por Rep*

La transformación estable del banana (*Musa* spp. Cv. "Ladyfinger") y del tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. "Samsun") se realiza tal y como se describe en el Ejemplo 4, arriba, excepto que los plásmidos pBTR-test1 y pBUTR-test1 se co-transforman independientemente con pDHKAN para la transformación estable del banana y que los cultivos de *Agrobacterium* que tienen los plásmidos pTAB-BTR1 y pTAB-BUTR1 se utilizan para la transformación mediada por *Agrobacterium* de los discos de hojas de tabaco.

Se confirma que las plantas transformadas contienen los casetes génicos de la barnasa y el gen NPTII mediante PCR, utilizando las parejas de cebadores LIR-F/LIR-R (NÚM. ID. SEC.:20, NÚM. ID. SEC.:19) y NPT-F/NPT-R (NÚM. ID. SEC.:36/NÚM. ID. SEC.:37), respectivamente. Se seleccionan diez líneas transgénicas independientes de ambas especies mono y dicotiledóneas para estudios posteriores.

(g) *Resistencia hipersensible activada por Rep a TYDV en el tabaco transgénico*

La activación de la expresión de la barnasa mediante Rep en las diez plantas independientes de tabaco transformadas con pTAB-BTR1 y pTAB-BUTR1 se analiza inicialmente mediante bombardeo de partículas de la construcción p35S-Rep a los trozos de hojas, como se describe. Dos días después del bombardeo, la necrosis de las áreas bombardeadas es sólo evidente en las hojas de plantas de tabaco transformadas con el casete del gen de la barnasa traducible activable por Rep (pTAB-BTR1) en comparación con el control no traducible (pTAB-BUTR1). Este resultado sugiere que la introducción del Rep de TYDV en *trans* es suficiente para la liberación replicativa del casete de expresión de la barnasa a partir de una copia cromosómica integrada. El corte, la unión y la replicación asistidos por Rep se confirman en los trozos de hoja de plantas de tabaco transformadas con pTAB-BUTR1, como se describe para los análisis transitorios en células NT-1.

Para demostrar la resistencia hipersensible a TYDV en el tabaco transgénico, se deja que los saltamontes virulíferos (*Orosius argentatus*) se alimenten de las plantas durante 2 días. Durante de la semana siguiente, se examinan las plantas para los síntomas característicos de TYDV como describe originalmente Hill (1937). Las plantas transformadas con el casete de expresión de la barnasa no traducible activable por Rep (pTAB-BUTR1) producen síntomas de TYDV típicos, como enanismo, clorosis, curvatura de los márgenes y las puntas de las hojas jóvenes, y acortamiento de los entrenudos. En contraste, las plantas de tabaco transformadas con el casete de expresión de la barnasa traducible activable por Rep (pTAB-BTR1) manifiestan lesiones necróticas atípicas en el lado de la alimentación de los áfidos (probablemente el resultado de la muerte celular inducida por la barnasa). Estas plantas se desarrollan de forma normal durante los siguientes tres meses, en comparación con las plantas de tabaco no infectadas, y en ningún momento desarrollan síntomas característicos de la infección con TYDV.

Se aísla el gDNA total de las hojas de cada una de las 20 plantas de tabaco transgénicas y los controles no infectados, dos semanas después de la infección, utilizando el método de Stewart And Via (1993). El gDNA total (1µg) se utiliza como molde para una PCR con los cebadores diseñados para el gen de la proteína de la cubierta (CP-F y CP-R). El gen de la proteína de la cubierta de 765 pb, y por lo tanto el genoma vírico, sólo se detecta en el tabaco transformado con pTAB-BUTR1. Este resultado sugiere que las plantas de tabaco transformadas con pTAB-BTR1 son resistentes a la infección por TYDV y permanecen libres de los síntomas inducidos por TYDV durante largos períodos de tiempo.

Cebadores:

CP-F 5' -ATGGCGGGCCGGTATAAGGGTTTGG-3' [NÚM. ID. SEC.:43]

CP-R 5' -TTATTGATTGCCAACTGATTTGAAAT-3' [NÚM. ID. SEC.:44]

Ejemplo 8

Construcciones del vector de pvf - basadas en BBTv

Se construyó una serie semejante de vectores, basada en los casetes de la barnasa activables por Rep utilizando el gen indicador que codifica la proteína fluorescente verde (PVF) y las regiones intergénicas del BBTv. Ambos vectores de expresión y de recircularización se construyeron mediante PCR solapada de un modo semejante al de la serie de vectores pRTBN y se clonaron en un vector pUC19. Los cebadores utilizados en la construcción de estos vectores se indican en la Tabla 5. En algunos casos los plásmidos pBN, pTBN6 y pTBN1 se utilizaron como moldes para las PCRs.

ES 2 296 736 T3

TABLA 5

Secuencias oligonucleotídicas

Cebador	Nombre	Secuencia (5' -3')
+1	35SH	AAGCTTCATGGAGTCAAAGA (NÚM. ID. SEC.:45)
+2	5' mGFFBam	GGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTT (NÚM. ID. SEC.:46)
+3	gFB1	AAGTCAAGTTTGAGGTAAGTTTCTGCTTC (NÚM. ID. SEC.:47)
-3	B2GFP	GAAGCAGAACTTACCTCAAACCTTGACTT (NÚM. ID. SEC.:448)
+4	B1GFP	TTGTTGATGTGCAGGGAGACACCCTCGTC (NÚM. ID. SEC.:49)
-4	GFPB2	GACGAGGGTGTCTCCCTGCACATCAACAA (NÚM. ID. SEC.:50)
-5	3' mGFPSac	GAGCTCTTATTTGTATAGTTCATCCAT (NÚM. ID. SEC.: 51)
-6	NOS4-H	AAGCTTTTCGCCATTCAGGCTGC (NÚM. ID. SEC.:52)
+7	B3-6	TATCATTAAATTAGTAAGTTGTGCTGTAA (NÚM. ID. SEC.:53)
-8	B4-6	AATATTATATTACTCGCTTCTGCCTTCC (NÚM. ID. SEC.:54)
+9	B5-I	ATCATTAAATTAGTCACACTATGACAAAAG (NÚM. ID. SEC.:55)
-10	B6-I	AATATTATATTACTGATGCAAATGTCCCCG (NÚM. ID. SEC.:56)

Inicialmente, se construyeron los plásmidos pGI (NÚM. ID. SEC.:69), pGI6 (NÚM. ID. SEC.:70), pGI1 (NÚM. ID. SEC.:71) y se muestran en las Figuras 20, 21 y 22, respectivamente. Al final, se construyeron los plásmidos pRGI6, pRGI1, pRGI1/6 y se muestran en las Figuras 23, 24 y 25, respectivamente. En las Figuras 20 a la 25, intrón se refiere al intrón LS1 de ST de la patata, las regiones intergénicas se derivan del DNA-1 o -6 del BBTv y CT y NT se refiere a las regiones C-terminal y N-terminal del gen indicador PVF.

La eficacia de estas diversas construcciones se evalúa en ensayos transitorios vía bombardeo de suspensiones celulares de banana con microproyectiles. Los primeros análisis transitorios miden la expresión de PVF para determinar si los varios monómeros son liberados replicativamente y recircularizados, y que el gen PVF se transcribe, se procesa y se expresa correctamente. Se mezcla un DNA-1 "1,1 mer" de BBTv en cantidades equimolares de pGI1 o pGI6 y se bombardean en las suspensiones celulares embriogénicas de banana. Ocho días después del bombardeo, se analizan la liberación y circularización replicativa mediante la hibridación Southern, utilizando una sonda específica para PVF. La expresión de PVF se controla con un microscopio PVF y se cuantifica mediante método de análisis Western y antisero específico para PVF.

La hibridación Southern indica la presencia de moléculas circulares monoméricas de cada plásmido, pGI1 y pGI6, sólo cuando el "1,1 mer" DNA-1 de BBTv se encuentra en *trans*. De forma semejante, la expresión de PVF sólo se detecta cuando el "1,1 mer" derivado de virus está presente.

Ejemplo 9

Transformación estable del banana para la resistencia a BBTv inducida por la barnasa

Las suspensiones de células embriogénicas de banana de Bluggoe y Cavendish se co-transforman con pRTBN6 y un plásmido que lleva un gen marcador seleccionable utilizando un bombardeo con microproyectiles (Becker *et al.*, 2000). Las plántulas regeneradas se analizan mediante PCR para determinar si se ha incorporado una copia completa del casete de la barnasa activable por Rep en el genoma del banana. Los transformantes positivos se multiplican y inicialmente se prueban cinco plantas de cada transformación con 20 áfidos virulíferos de BBTv. Se utilizan los análisis de hibridación Southern para comparar los niveles de acumulación de DNA viral entre las plantas transformadas y las no transformadas. Las líneas celulares prometedoras se multiplican, se re-prueban y analizan adicionalmente.

En casi todos los casos, las plantas de banana transgénicas no muestran evidencia de enfermedad del cogollo racimoso del banana, en comparación con los controles. En concreto, se observa necrosis atípica en el punto de la alimentación de los áfidos, probablemente reflejando la muerte celular inducida por la barnasa. Utilizando la PCR y la hibridación Southern el gen de la proteína de la cápside de BBTv no se puede detectar en ninguna de las partes de la planta analizadas, sugiriendo que estas líneas son resistentes a la infección, replicación y propagación de BBTv.

Ejemplo 10

Expresión activada por Rep, inducible y específica de tejido, basada en TYDV

Para controlar el lugar de expresión de Rep y por tanto de la activación/replicación transgénica *in planta*, se utilizaron promotores específicos de tejido.

(a) *Expresión constitutiva*

El vector pTAB16 contiene los casetes promotor 35S de CaMV-gen de selección bar-terminador ocs y promotor 35S de CaMV-uidA-terminador 35S de CaMV localizados entre los bordes derecho e izquierdo del T-DNA en pBIN16. El casete del gen Rep CaMV 35S-TYDV se elimina de p35S-Rep mediante digestión con *EcoRI/BamHI* y se inserta en un vector pTAB16 digerido de forma similar para reemplazar el casete 35S del CaMV-uidA original. Esta construcción se denomina pTAB-TYDV-Rep.

(b) *Expresión específica de semillas*

Se ha demostrado que el promotor de glutelina de arroz de 1 kb (Genbank Accession X52153) dirige la expresión del gen indicador específico de semillas en el tabaco (Leisy *et al.*, 1989). El promotor de glutelina de arroz se elimina del plásmido pGT3-JEFLK (Miller, 2001) mediante digestión *NcoI* y se liga a un vector pTAB-TYDV-Rep digerido de forma similar para reemplazar el promotor CaMV 35S original. Esta construcción se denomina pGL-TYDV-Rep.

(c) *Expresión específica de raíces*

Se ha demostrado que el promotor de 800pb del homólogo de la quinasa (ARSK1) específica de raíz de *Arabidopsis thaliana* dirige la expresión específica de tejido del gen indicador *uidA* en las regiones epidérmica, endoepidérmica, y de la corteza de las raíces de *A. thaliana* (Hwand and Goodman, 1995). El promotor ARSK1 se amplifica a partir del

gDNA de *A. thaliana* mediante PCR utilizando los cebadores ARSK-F y ARSK-R. El producto resultante de la PCR se clona en pGEM-T y se verifica la secuencia.

El promotor ARSK1 se escinde de pGEM-T mediante digestión con *NcoI* y se liga en el pTAB-TYDV-Rep digerido de forma semejante para reemplazar el promotor 35S de CaMV original. Esta construcción se nombra pAR-TYDV-Rep.

Cebadores:

ARSK-F [NÚM. ID. SEC.:57]

ARSK-R [NÚM. ID. SEC.:58]

(d) *Expresión inducible por lesión*

Se ha demostrado que el promotor del gen PR de *Asparagus officinalis* (AoPR1) de 2032 pb (Núm. de acceso: A26573) dirige la expresión fuerte del gen indicador en tipos celulares lesionados y que se dividen activamente tales como, por ejemplo, los callos (Firek *et al.*, 1993). El promotor AoPR1 se amplifica a partir del gDNA de *A. Officinalis* mediante PCR utilizando los cebadores AoPR-F y AoPR-R. El producto resultante de la PCR se clona en pGEM-T y se verifica la secuencia. Se escinde el promotor de pGEM-T mediante digestión con *NcoI* y se liga en un pTAB-TYDV-Rep digerido de forma semejante para reemplazar el promotor 35S de CaMV original. Esta construcción se nombra pAo-TYDV-Rep.

Cebadores:

AoPR-F [NÚM. ID. SEC.:59]

AoPR-R [NÚM. ID. SEC.:60]

(e) *Expresión inducible por alcohol*

El interruptor ALC, derivado de *Aspergillus nidulans*, es un sistema de promotor inducible por alcohol basado en el promotor AlcA y el receptor AlcR. Se ha demostrado que el interruptor ALC funciona en sistemas vegetales utilizando un modelo de gen indicador *uidA* (Caddick *et al.*, 1998). El plásmido pSRNAGS (BTI, Cornell University, Ithaca, Nueva York) contiene un casete promotor 35S de CaMV-genAlcR-terminador nos y promotor de AlcA-gen indicador uidA-terminador 35S de CaMV en pBIN16. El casete promotor 35S de CaMV-gen AlcR-terminador nos-promotor AlcA se amplifica a partir de pSRNAGS mediante PCR, utilizando los cebadores 35S-IE(NÚM. ID. SEC.:21) y Alc-R (NÚM. ID. SEC.:61). El producto de la PCR se clona en pGEM-T y se verifica la secuencia. Se escinde el inserto mediante digestión con *NcoI* y se liga a un pTAB-TYDV-Rep digerido de forma semejante para reemplazar el promotor 35S de CaMV original. Esta construcción se nombra pAlc-TYDV-Rep

Cebadores:

Alc-R [NÚM. ID. SEC.:61]

Cada uno de los plásmidos TYDV binarios que contienen Rep se introduce en *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) mediante electroporación utilizando el método de Singh *et al.* (1993).

(f) *La expresión de Rep específica de tejido e inducible dirige la activación del gen indicador en tipos de tejido precisos*

Las hojas de las plantas del tabaco que se han transformado con el plásmido pTEST4 se sobreinfectan con *Agrobacterium* que contienen los plásmidos pTAB-TYDV-Rep, pGL-TYDV-Rep, pAR-TYDV-Rep, pAo-TYDV-Rep, y pAlc-TYDV-Rep, utilizando el método de Horsch *et al.* (1998). En este caso, la selección de las plantas de tabaco transformadas se consigue utilizando el herbicida amonio fosfotricin (PPT). Se confirma que las plantas transgénicas contienen el gen Rep TYDV mediante PCR utilizando los cebadores TYDV.RepF y TYDV.RepR. Se seleccionan diez transformantes independientes para cada plásmido para posteriores estudios. Las plantas se cultivan hasta la madurez, permitiendo que florezcan y se recolectan las semillas. Se recolectan distintos órganos de las plantas de transformantes independientes, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores y semillas, y se detecta la actividad GUS utilizando análisis histoquímicos.

Las plantas de tabaco sobretransformadas con el plásmido pTAB-TYDV-Rep manifiestan una fuerte expresión de GUS en todas las partes de la planta examinadas. El nivel de la expresión de GUS en estas plantas es considerablemente superior al de las plantas transformadas con el control no replicativo, pTAB16.

En contraste, las plantas sobretransformadas con el plásmido pGL-TYDV-Rep muestran una fuerte expresión de GUS sólo en las semillas, las plantas sobretransformadas con el plásmido pAR-TYDV-Rep muestran fuerte expresión de GUS sólo en las raíces, las plantas sobretransformadas con el plásmido pAo-TYDV-Rep muestran fuerte expresión de GUS en las células con lesiones y meristemáticas, y las plantas sobretransformadas con el plásmido pAlc-TYDV-Rep muestran una fuerte expresión constitutiva de GUS sólo cuando se sumergen en una solución de etanol al 1% v/v.

El corte, la unión y la replicación asistidos por Rep del casete de expresión de GUS se confirma (como se describe previamente) en todos los tipos de tejido de las plantas de tabaco sobretransformadas con el plásmido pTAB-TYDV-Rep. En contraste, esta actividad sólo se detecta en las semillas de las plantas sobretransformadas con el plásmido pGL-TYDV-Rep, en las raíces de las plantas sobretransformadas con el plásmido pAR-TYDV-Rep, en el sitio de lesión de las plantas sobretransformadas con el plásmido pAo-TYDV-Rep, y constitutivamente en las plantas inducidas con etanol sobretransformadas con el plásmido pAlc-TYDV-Rep. Este resultado sugiere que la expresión del gen Rep de TYDV específica del tejido o inducida confiere un alto nivel de expresión a partir del casete de GUS activable por Rep sólo en estos tejidos.

Ejemplo 11

Resistencia mediada por los genes TMV p50 y hrnA - basado en TYDV

(a) *La expresión del fragmento de la helicasa p50 de TMV activada por Rep TYDV induce la resistencia adquirida sistémica (SAR, por sus siglas en inglés) en el tabaco*

Los estudios previos (Erickson *et al.*, 1999) han demostrado que la expresión no viral del fragmento de la helicasa de 50kDa del virus del mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) es suficiente para inducir la respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) mediada por N en variedades de tabaco adecuadas (p. ej. *Nicotiana tabacum* cv. "Petite Havana" SR1 homocigota para el gen N). La respuesta de defensa se caracteriza por la muerte celular en el sitio de la infección vírica y la inducción de la vía de resistencia adquirida sistémica (SAR) resultando en una inhibición de la replicación y el movimiento viral.

El fragmento génico p50 se amplifica mediante una PCR utilizando los cebadores p50-F y p50-R a partir de DNA de TMV genómico clonado (Plant Gene Expression Centre, University of California, EUA). El producto de la PCR se clona en pGEM-T y se verifica la secuencia. El intrón de la catalasa que contiene el LIR de TYDV del pTEST3 (Figura 10) se diseña dentro del marco del único sitio *EcoRI* en la región codificante p50. El plásmido se nombra pGEM50-LIR. A continuación se construye un plásmido basado en pUC, con el gen p50 activable por Rep, como se describe en el caso de pTEST3 en el Ejemplo 2, arriba. Se inserta el casete en pART27, como se describe en el caso del pTEST4. El plásmido resultante binario de p50 activable por Rep se nombra pSAR1. El plásmido pSAR1 se utiliza para transformar *Agrobacterium* como se describe previamente.

Cebadores:

p50-F [NÚM. ID. SEC.: 62]

p50-R [NÚM. ID. SEC.: 63]

(b) *Resistencia adquirida sistémica a TYDV en el tabaco*

Se obtuvieron diez plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. "Petite Havana" SR1 homocigotas para el gen N) transformadas con el T-DNA del plásmido pSAR1 mediante transformación mediada por *Agrobacterium* y se confirmó que contenían el casete activable por Rep y el gen NPTII mediante una PCR como se describe arriba. Se infectaron las plantas con TYDV y se observaron los síntomas, como se describe previamente. Las plantas transformadas con el gen p50 activable por Rep muestran necrosis hipersensible atípica en el sitio de la alimentación de los áfidos, dos días después de la infección. Estas plantas se desarrollan de forma normal durante los siguientes 3 meses, en comparación con las plantas de tabaco no transgénicas infectadas, que muestran síntomas típicos inducidos por TYDV.

Se detecta el DNA genómico de TYDV en el tabaco no-transgénico inoculado pero no en las líneas de control transgénicas o no infectadas, como se describe previamente. Este resultado sugiere que la expresión inducida por Rep de TYDV del gen p50 de TMV es suficiente para estimular la respuesta hipersensible del gen N en los cultivos de tabaco adecuados y proporciona resistencia a la infección por TYDV.

(c) La expresión de Rep de TYDV inducida por lesión activa la expresión de gen p50 de TMV y provoca SAR a varios patógenos

- Las hojas de las plantas de tabaco transformadas con pSAR1 se sobreinfectan con *Agrobacterium* que contiene el plásmido pAo-TYDV-Rep (Ejemplo 10), como se describe previamente. Se seleccionan diez líneas sobretransformadas, que se ha confirmado que tienen el gen Rep inducible por lesión, para estudios posteriores. Las plantas transgénicas y los controles adecuados se someten a una infección con una variedad de patógenos virales p. ej. (i) Transmisión áfida del virus.
- Las plantas transgénicas y los controles adecuados están expuestos a la infección por una gran diversidad de patógenos virales p.ej. (i) el virus del moteado de las venas del tabaco, (ii) el virus del cascabeleo del tabaco, a través del vector nematodo *Paratrichodorus pachydermus*, y (iii) la introducción biolística de un 1.1mer BeYDV infeccioso. Con el paso del tiempo, se observan los síntomas inducidos viralmente característicos en las plantas. Todas las plantas transgénicas muestran una necrosis hipersensible atípica en el lugar de la inoculación del virus, en comparación con los controles.

(d) La expresión de Rep de TYDV inducible por heridas activa la resistencia patógena de amplio espectro mediada por hrmA en el tabaco

- Se ha demostrado que el producto génico de hrmA de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* activa genes relacionados con el patógeno en diferentes cultivos de tabaco y confiere resistencia a numerosos patógenos, como los virus, los hongos y las bacterias (Shen *et al.*, 2000).
- El gen de hrmA se amplifica a partir de un plásmido que contiene la secuencia codificadora mediante PCR, utilizando los cebadores hrm-F y hrm-R. Posteriormente, se construye un plásmido de hrmA activable por Rep, basado en pUC, como se describe en el Ejemplo 2, arriba, para pTEST3. El casete se inserta en pART27, tal y como se describe para pTEST4. El plásmido binario activable por hrmA resultante se denomina pSAR2. El plásmido pSAR2 se utiliza para transformar el *Agrobacterium*, tal y como se describe.

hrm-F [NÚM. ID. SEC.:64]

hrm-R [NÚM. ID. SEC.:65]

- Se obtuvieron diez plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con T-DNA a partir del plásmido pSAR2 mediante transformación mediada por *Agrobacterium* y se confirmó que contenía el casete activable por Rep y el gen NPTII mediante PCR, tal y como se ha descrito previamente. Las hojas de plantas del tabaco pSAR2 transformadas se sobreinfectan con *Agrobacterium* que contiene el plásmido pAo-TYDV-Rep, tal y como se ha descrito previamente.
- Se seleccionaron para estudios adicionales diez líneas sobretransformadas, de las que se confirmó que contenían el gen Rep inducible por heridas. Las plantas transgénicas y los controles adecuados están expuestos a la infección por un gran número de patógenos p.ej. el virus del moteado de las venas del tabaco, el virus del grabado del tabaco, el virus de la "pata prieta" *Phytophthora parasitica* y el "fuego salvaje del tabaco" *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Con el tiempo, se observa que las plantas presentan síntomas característicos de la inducción patógena. Todas las plantas transgénicas presentan una necrosis hipersensible atípica en el lugar de inoculación, en comparación con los controles.

Ejemplo 12

50 Sobreexpresión de la albúmina sérica humana basada en TYDV

(a) Sobreexpresión activada por Rep de una proteína comercialmente importante, la albúmina sérica humana

- La albúmina es una proteína soluble monomérica que comprende una mitad de la proteína sérica de la sangre, aproximadamente. La albúmina funciona principalmente como un portador de proteínas para los esteroides, los ácidos grasos y las hormonas tiroideas y también estabiliza el volumen de fluido extracelular.

- La región codificadora de la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) 1831 bp, Lawn *et al.*, (1981), se amplifica a partir de un plásmido que contiene el gen mediante PCR utilizando los cebadores Alb-F y Alb-R. El plásmido de HSA activable por Rep basado en pUC se construye posteriormente, tal y como se describe en el ejemplo 2, para pTEST3. El casete se inserta en pART27, tal y como se describe para pTEST4. El plásmido binario activable por HSA resultante se denomina pHSA1. El plásmido pHSA1 se utiliza para transformar *Agrobacterium*, tal y como se ha descrito.

- Se obtienen diez plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con T-DNA, a partir del plásmido pHSA1, mediante la transformación mediada por *Agrobacterium* y se confirma que contienen el casete Rep activable y el gen NPTII mediante PCR, tal y como se ha descrito. Las hojas de las plantas de tabaco transformadas con pHSA1 se

sobreinfectan con *Agrobacterium* que contiene los plásmidos pTAB-TYDV-Rep, pGL-TYDV-Rep, pAo-TYDV-Rep, pAlc-TYDV-Rep, tal y como se describe. Se confirmó que diez líneas sobretransformadas de cada transformación contenían el gen Rep y se seleccionaron para estudios futuros. Las plantas crecen hasta la madurez y se analiza su contenido de HSA con un ELISA y anticuerpos obtenidos para el producto génico de HSA. Se detectan en niveles elevados de proteína HSA, pero en diferentes partes de la planta o bajo condiciones específicas; p.ej. constitutivamente (pTAB-TYDV-Rep), sólo semillas (pGL-TYDV-Rep), tejidos con lesiones (pAo-TYDV-Rep) y constitutivamente en plantas tratadas con alcohol (pAlc-TYDV-Rep). En la figura 26 se representa una propuesta de modelo para la expresión activada por Rep del gen de la albúmina sérica humana del plásmido pHSA1

Cebadores:

Alb-F [NÚM. ID. SEC.:72]

Alb-R [NÚM. ID. SEC.:73]

Bibliografía

Altschul et al. (1997) *Nucl. Acids Res.* 25:3389. 1997.

An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology* 79: 568-570.

Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology” John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

Becker DK, Dugdale B, Smith MK, Harding RM, Dale JL (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv “Grand Nain” via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19 (3): 229-234.

Bonner and Laskey (1974) *Eur. J. Biochem.* 46: 83.

Boulton MI (1995) *Agrobacterium*-mediated transfer of geminiviruses to plant tissues. *Methods in Molecular Biology* 49: 77-93.

Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, Krause KP, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schuch W, Sonnewald U, Tomsett AB (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology* 16(2): 177-80.

Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from Pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2): 113-116.

Dugdale B, Beetham PR, Becker DK, Harding RM, Dale JL (1998) Promoter activity associated with the intergenic regions of banana bunchy top virus DNA-1 to -6 in transgenic tobacco and banana cells. *Journal of General Virology* 79 (10): 2301-11.

Erickson FL, Holzberg S, Calderon-Urrea A, Handley V, Axtell M, Corr C, Baker B (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant Journal* 18(1): 67-75.

Firek S, Ozcan S, Warner SA, Draper J (1993) A wound-induced promoter driving npt-II expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic shoots. *Plant Molecular Biology* 22 (1): 129-42.

Gleave AP (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* 20(6): 1203-1207.

Hill AV (1937) Yellow dwarf of tobacco in Australia: V. transmission by *Orosius argentatus* (Evans) to some alternative host plants. *Journal for Scientific and Industrial Research Australia* 10: 228-230.

Horsch R B, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers S G, Fraley RT (1988) Leaf disc transformation. In *Plant Molecular Biology Manual*, pp. A5/1-A5/9. Edited by S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort. Dordrecht: Kluwer.

Hwang I, Goodman HM (1995) An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant Journal* 8(1):37-43.

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric plant genes: The GUS fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 381-405.

Lawn RM, Adelman J, Bock SC, Franke AE, Houck CM, Najarian RC, Seeburg PH, Wion KL (1981) The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Research* 9(22): 6103-114.

Leisy DJ, Hnilo J, Zhao Y, Okita TW (1990) Expression of a rice glutelin promoter in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 14(1): 41-50.

Marmur and Doty (1962) *J. Mol. Biol.* 5: 109.

Miller J (2001) Expression of potential vaccines in plants. PhD Thesis, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.

Pietrzak M, Shillito RD, Hohn T, Potrykus I (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Research* 14(14): 5857-5868.

Shen S, Li Q, He SY, Barker KR, Li D, Hunt AG (2000) Conversion of compatible plant-pathogen interactions into incompatible interactions by expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrnA gene in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 23(2): 205-13.

Singh A, Kao T, Lin JJ (1993) Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with T-DNA vector using high-voltage electroporation. *Focus* 15: 84-87.

Southern (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.

Stewart CN, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique for RAPD fingerprint and PCR applications. *Biotechniques* 14: 748-750.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción que comprende un elemento genético flanqueado funcionalmente por secuencias nucleotídicas reconocibles mediante una proteína que facilita la replicación, derivada de un virus cuando se integra en el genoma de una célula eucariota, cuya proteína que facilita la replicación, derivada de un virus facilita la escisión y la circularización del elemento genético y de todo o parte de las secuencias nucleotídicas que flanquean y en el que dichas secuencias nucleotídicas reconocidas por la proteína que facilita la replicación, derivada de un virus son adyacentes a o están insertadas en una o más secuencias externas, incluyendo secuencias intrón o partes de la misma u otros señales de corte y empalme en las que el elemento genético y otras secuencias nucleotídicas, en una forma no circular, comprenden dos secuencias nucleotídicas modulares que, tras la circularización, forman una secuencia genética que muestra una propiedad o una capacidad para exhibir una propiedad ausente en las dos secuencias nucleotídicas modulares, previas a la circularización o previas a la circularización y la expresión.
2. La construcción de la reivindicación 1, en el que la proteína que facilita la replicación, derivada de un virus es Rep.
3. La construcción de la reivindicación 1 o la 2, en el que la proteína que facilita la replicación, derivada de un virus y/o las secuencias nucleotídicas que la flanquean son del mismo virus.
4. La construcción de las reivindicaciones 1 o 2 o 3, en el que la proteína que facilita la replicación, derivada de un virus y/o las secuencias nucleotídicas que la flanquean son de virus diferentes.
5. La construcción de la reivindicación 1, en el que las secuencias externas comprenden una secuencia codificante, un promotor y una o más señales de corte y empalme.
6. La construcción de la reivindicación 5, en el que las secuencias que codifican cuando la construcción se encuentra en una forma lineal, comprende dos secuencias modulares separadas por una secuencia intrónica.
7. La construcción de las reivindicaciones 5 o 6, en el que después de la circularización del elemento genético, una secuencia codificante completa está unida funcionalmente a dicho promotor.
8. La construcción de la reivindicación 7, en el que la secuencia codificante codifica un mRNA o péptido, polipéptido o proteína que confiere una propiedad fenotípica o genotípica en dicha célula o en un organismo o planta que comprende dicha célula.
9. La construcción de la reivindicación 8 en la que el péptido, el polipéptido o la proteína causan o de otro modo facilitan la muerte celular.
10. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, en las que la construcción se introduce en una célula eucariota.
11. La construcción de la reivindicación 10, en la que la célula eucariota es una célula de una planta.
12. La construcción de la reivindicación 10, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.
13. La construcción de la reivindicación 10, en el que la célula eucariota es una célula aviaria.
14. Una construcción según la reivindicación 1 que comprende un elemento genético flanqueado por secuencias de reconocimiento de la proteína Rep que facilitan la generación de una secuencia nucleotídica circular que comprende dicho elemento genético en presencia de una proteína Rep, en la que dichas secuencias de reconocimiento de la proteína Rep son adyacentes a o están insertadas en una o más señales de corte y empalme, dicho elemento genético comprende una secuencia polinucleotídica unida funcionalmente a secuencias reguladoras necesarias para permitir la expresión de dicha secuencia polinucleotídica, cuando dicho elemento genético está contenido en una molécula circularizada en la que el elemento genético en forma lineal comprende, en el orden del extremo 5' al 3':
una secuencia polinucleotídica; y
secuencias reguladoras que permiten la expresión de dicha secuencia polinucleotídica cuando se encuentra en forma circular;
de modo que tras la circularización el elemento genético comprende la secuencia reguladora separada de la secuencia polinucleotídica mediante todas o parte de la secuencia de reconocimiento de proteína Rep, en la que después de la expresión, dicha secuencia polinucleotídica codifica un producto de expresión.
15. La construcción de la reivindicación 14 en el que la secuencia polinucleotídica, cuando la construcción está en forma lineal, comprende porciones de los extremos 5' y 3' de una secuencia codificante separada por una señal de corte y empalme, de modo que cuando se encuentra en forma circular se constituye una secuencia codificante completa.

16. La construcción de la reivindicación 14, en la que se utiliza una sola secuencia de reconocimiento de la proteína Rep.

17. La construcción de la reivindicación 14, en la que se utilizan dos secuencias de reconocimiento de la proteína Rep, derivadas de virus diferentes.

18. La construcción de la reivindicación 14, o 15 o 16 o 17 en la que la secuencia polinucleotídica además comprende una secuencia terminadora unida funcionalmente al extremo 3' de la secuencia codificante.

19. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 18, en la que la secuencia reguladora es un promotor unido funcionalmente al extremo 5' de la secuencia codificante.

20. La construcción de la reivindicación 19, en la que la secuencia codificante, cuando el elemento genético se encuentra en forma circular, codifica un mRNA o un péptido, un polipéptido o una proteína que confiere una propiedad fenotípica o genotípica a dicha célula o a un organismo o planta que conste de esta célula.

21. La construcción de la reivindicación 20, en la que el péptido, polipéptido o la proteína causan o de otro modo facilitan la muerte celular.

22. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones 14 a la 21, en la que la construcción se introduce en una célula eucariota.

23. La construcción de la reivindicación 22, en la que la célula eucariota es una célula de una planta.

24. La construcción de la reivindicación 22, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.

25 La construcción de la reivindicación 22, en la que la célula eucariota es una célula aviaria.

26. Una construcción, según la reivindicación 1 que comprende en el orden del extremo 5' a 3' las secuencias nucleotídicas primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta, en las que:

la primera y la sexta secuencia nucleotídicas pueden ser iguales o diferentes y cada una comprende una secuencia de reconocimiento de proteína Rep que se puede detectar mediante una o más proteínas Rep, de modo que el material genético flanqueado por estas primeras y sextas secuencias, incluyendo todas o parte de estas primera y sexta secuencias, cuando dicha construcción se integra en una secuencia nucleotídica más larga, como una secuencia genómica, se pueden escindir y circularizar en el punto en que dichas secuencias de reconocimiento de proteína Rep son adyacentes a o están insertadas en una o más secuencias externas o partes de la misma u otras señales de corte y empalme; la segunda secuencia nucleotídica comprende una porción del extremo 3' de una secuencia polinucleotídica;

la tercera secuencia nucleotídica es un terminador transcripcional o un derivado funcional o homólogo del mismo, unido funcionalmente a dicha segunda secuencia;

la cuarta secuencia nucleotídica es una secuencia promotora, unida funcionalmente a la quinta secuencia nucleotídica; y

la quinta secuencia nucleotídica es una porción del extremo 5' de una secuencia polinucleotídica en la que las porciones del extremo 5' y 3' de dicha secuencia polinucleotídica en la que las porciones del extremo 5' y 3' de dicha secuencia polinucleotídica representan una secuencia codificante completa de dicha secuencia polinucleotídica;

en la que en presencia de una o más proteínas Rep, cuando la construcción se integra en una secuencia nucleotídica más larga, como una secuencia genómica, se genera una secuencia genética circularizada, separada de esta secuencia nucleotídica más larga, que comprende en orden, dicha secuencia de promotor unida funcionalmente a una secuencia polinucleotídica que comprende todas o parte de las secuencias externas u otras señales de corte y empalme que comprenden todas o parte de estas primera y/o sexta secuencias nucleotídicas y una secuencia de terminación de la transcripción.

27. La construcción de la reivindicación 26 en el que la secuencia codificante completa de la secuencia polinucleotídica codifica un mRNA o un péptido, polipéptido o proteína que confiere una propiedad fenotípica o genotípica en dicha célula o en un organismo o planta que comprenda dicha célula.

28. La construcción de la reivindicación 27, en el que el péptido, el polipéptido o la proteína causan o de otro modo facilitan la muerte celular.

29. La construcción de cualquiera de las reivindicaciones de la 26 a la 28, en las que la construcción se introduce en una célula eucariota.

30. La construcción de la reivindicación 29, en el que la célula eucariota es una célula de una planta.

31. La construcción de la reivindicación 29, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.

32. La construcción de la reivindicación 29, en la que la célula eucariota es una célula aviaria.

5 33. Un método para generar una planta transgénica o progenie de la misma, resistente a un virus ssDNA, dicho método consta de la introducción en el genoma de dicha planta una construcción que consta dentro del orden del extremo 5' al 3' de una secuencia de reconocimiento de la proteína Rep adyacente a o dentro de una secuencia intrónica u otras señales de corte y empalme, una porción del extremo 3' de una secuencia polinucleotídica, un terminador de la transcripción, una secuencia promotora unida funcionalmente a la porción del extremo 5' de la secuencia nucleotídica en la que las porciones del extremo 5' y 3' de la secuencia nucleotídica representan la región codificante de un péptido, un polipéptido o una proteína que puede inducir la muerte celular o inactividad y secuencias de reconocimiento de proteína Rep iguales o diferentes; en las que después de la infección de dichas células vegetales mediante un virus ssDNA que tiene una proteína Rep que puede reconocer las secuencias de reconocimiento de proteína Rep. que la flanquean, la construcción se escinde y se circulariza, por tanto, reconstituyendo dicha secuencia polinucleotídica en una forma que se expresa como un péptido, un polipéptido o una proteína que mata la célula vegetal o de otro modo provoca que la célula quede inactiva.

34. El método de la reivindicación 33, en la que el virus ssDNA es un miembro de los Geminiviridae o del grupo de los nanovirus.

20 35. El método según la reivindicación 34, en el que el virus Germinivirdae es un begomovirus mastrevirus.

36. El método de la reivindicación 33 o 34 o 35, en el que la construcción comprende la secuencia nucleotídica de acuerdo con lo que se ha establecido en NÚM. ID. SEC.:31 a NÚM. ID. SEC.:36 o una secuencia nucleotídica con una identidad del 60% con cada una de NÚM. ID. SEC.:31 hasta NÚM. ID. SEC.:36 o una secuencia nucleotídica que pueda hibridarse con una o más secuencias de NÚM. ID. SEC.:31 hasta NÚM. ID. SEC.:36 o una forma complementaria del mismo condiciones de baja restricción a 42°C.

30 37. Un elemento genético lineal utilizado para generar una construcción de DNA circular cerrado covalentemente, dicho elemento genético comprende en dirección 5' a 3' una porción de 3' de una secuencia polinucleotídica unida funcionalmente a un terminador de la transcripción; un promotor unido funcionalmente a una porción de 5' de una secuencia polinucleotídica en la que tras la circularización, la porción de 5' de la secuencia polinucleotídica está unida funcionalmente a dicha porción 3' de la secuencia polinucleotídica separada mediante todas o parte de una secuencia externa o una secuencia intrón u otra señal de corte y empalme.

35 38. El elemento genético de la reivindicación 37 que además comprende las secuencias nucleotídicas reconocibles por una proteína que facilita la replicación, derivada de un virus.

40 39. El elemento genético de la reivindicación 38, en el que la proteína que facilita la replicación, derivada de un virus, es Rep.

40. El elemento genético de la reivindicación 38 o 39, en las que dos secuencias nucleotídicas reconocidas mediante proteínas que facilitan la replicación derivadas de un virus, se derivan de diferentes virus.

45 41. El elemento genético de la reivindicación 37 o 38 o 39, en las que la secuencia polinucleotídica, cuando la construcción circular cerrada covalentemente codifica un mRNA o un péptido, polipéptido o proteína.

42. El elemento genético de la reivindicación 40, en la que el péptido, polipéptido o proteína causa o de otro modo facilita la muerte celular.

50 43. El elemento genético de la reivindicación 37 cuando se introduce en una célula eucariota.

44. El elemento genético de la reivindicación 42, en la que la célula eucariota es una célula vegetal.

55 45. El elemento genético de la reivindicación 42, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.

46. El elemento genético de la reivindicación 42, en la que la célula eucariota es una célula aviaria.

60 47. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta la 9.

48. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones 14 hasta la 21.

65 49. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones 26 hasta la 28.

ES 2 296 736 T3

50. Una planta genéticamente modificada o parte de la misma que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones 37 hasta la 43.

5 51. Una especie aviaria genéticamente modificada que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9.

52. Una especie aviaria genéticamente modificada que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones de la 14 a la 21.

10 53. Una especie aviaria genéticamente modificada que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones de la 26 a la 28.

15 54. Una especie aviaria genéticamente modificada que consta de una construcción genética de cualquiera de las reivindicaciones de la 37 a la 43.

20 55. Una construcción según la reivindicación 1 que comprende un elemento genético flanqueado por secuencias de reconocimiento de proteínas Rep que facilita la generación de una secuencia nucleotídica circular que comprende dicho elemento genético en presencia de la proteína Rep o sus derivados funcionales u homólogos, en el que dichas secuencias de reconocimiento de proteínas Rep son adyacentes a o están insertadas en una o más secuencias externas, incluyendo las secuencias intrónicas o partes de la misma u otras señales de corte y empalme, dicho elemento genético comprende una porción 3' y una porción 5' de un promotor separada por la longitud de una secuencia nucleotídica para prevenir sustancialmente el funcionamiento de dicho promotor, este elemento genético en forma lineal comprende, en el orden 5' a 3':

25 una porción 3' de dicho promotor

opcionalmente, una secuencia polinucleotídica unida funcionalmente a dicha porción 3' de este promotor;

30 y una porción 5' de dicho promotor,

de modo que tras la circularización el elemento genético comprende las porciones 3' y 5' de la secuencia del promotor, separada por toda o parte de la secuencia de reconocimiento de proteína Rep y/o secuencias intrónicas de otra señal de corte y empalme, pero que no desactivan la actividad del promotor, dicha molécula circular puede constar opcionalmente del promotor unido funcionalmente a la secuencia polinucleotídica.

35

40

45

50

55

60

65

pTBN

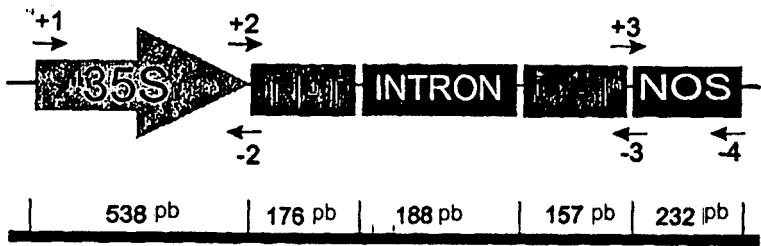


Fig 1

pTBN6

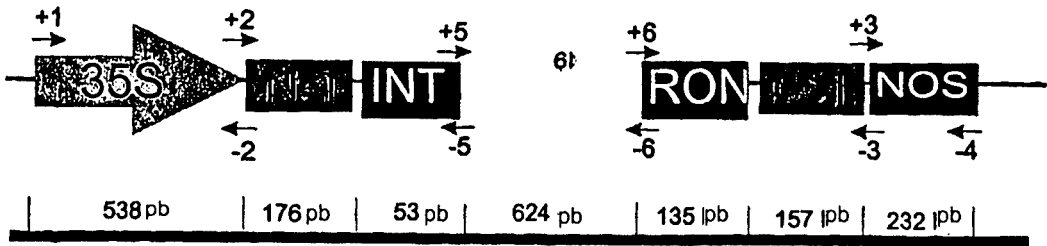


Fig 2

pTNB1

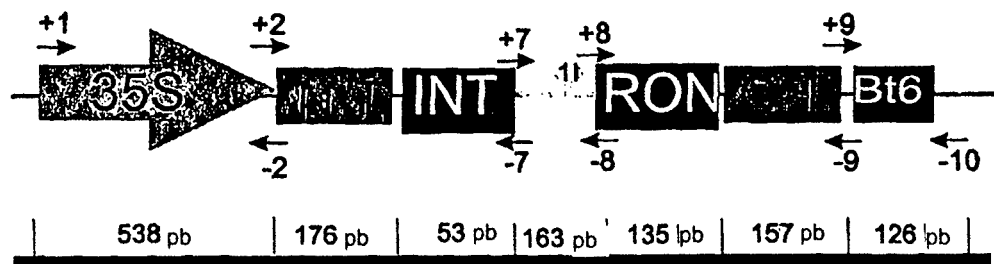


Fig 3

pRTBN6

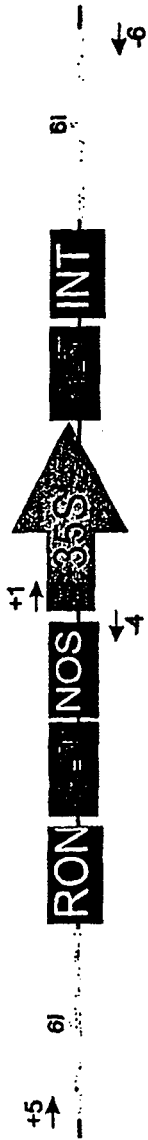


Fig 4

pRTBN1

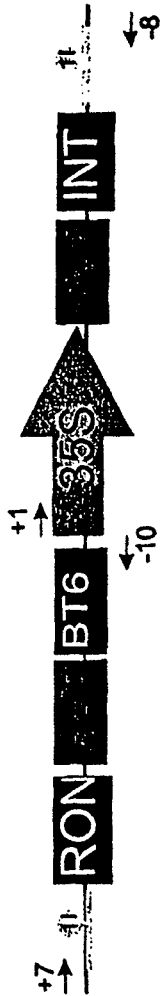


Fig 5

pRTBN 1/6

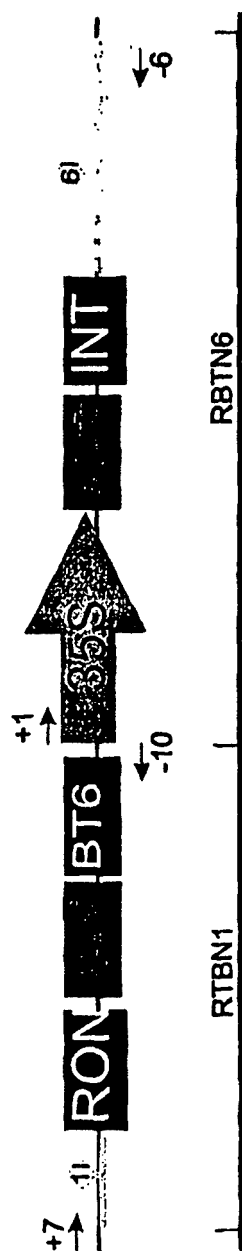


Fig 6

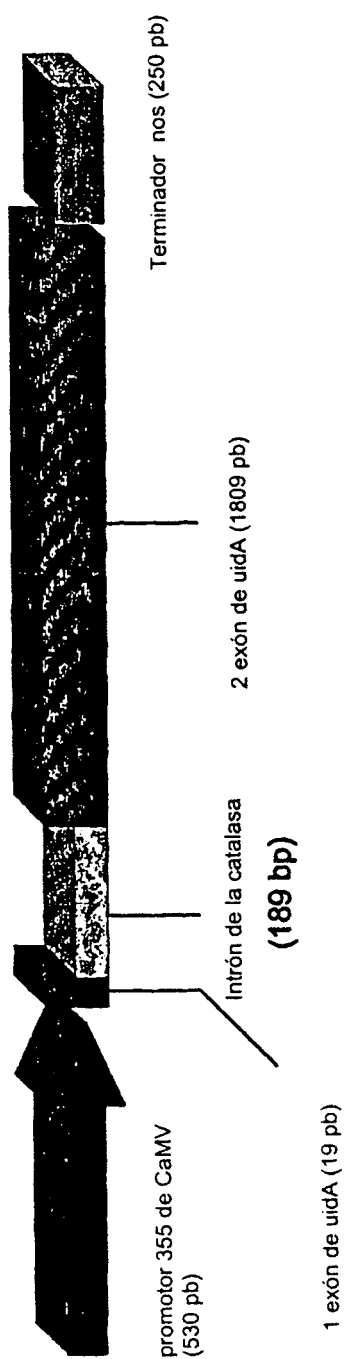


Fig 7

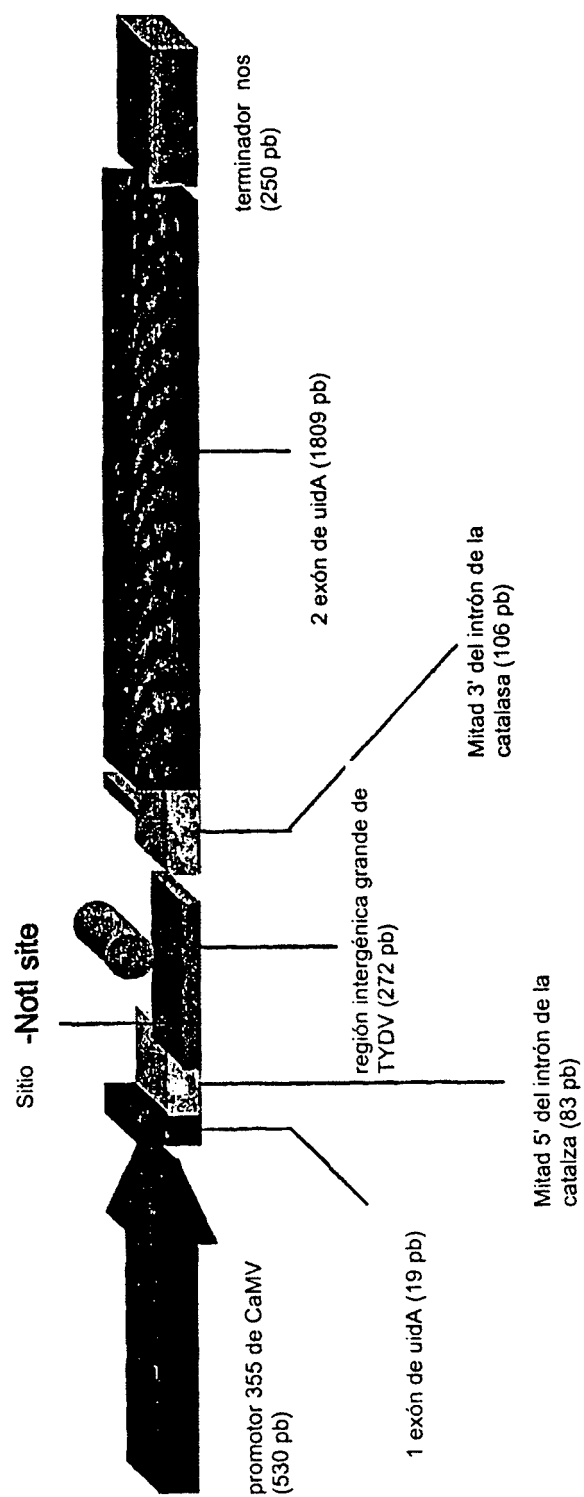


Fig 8

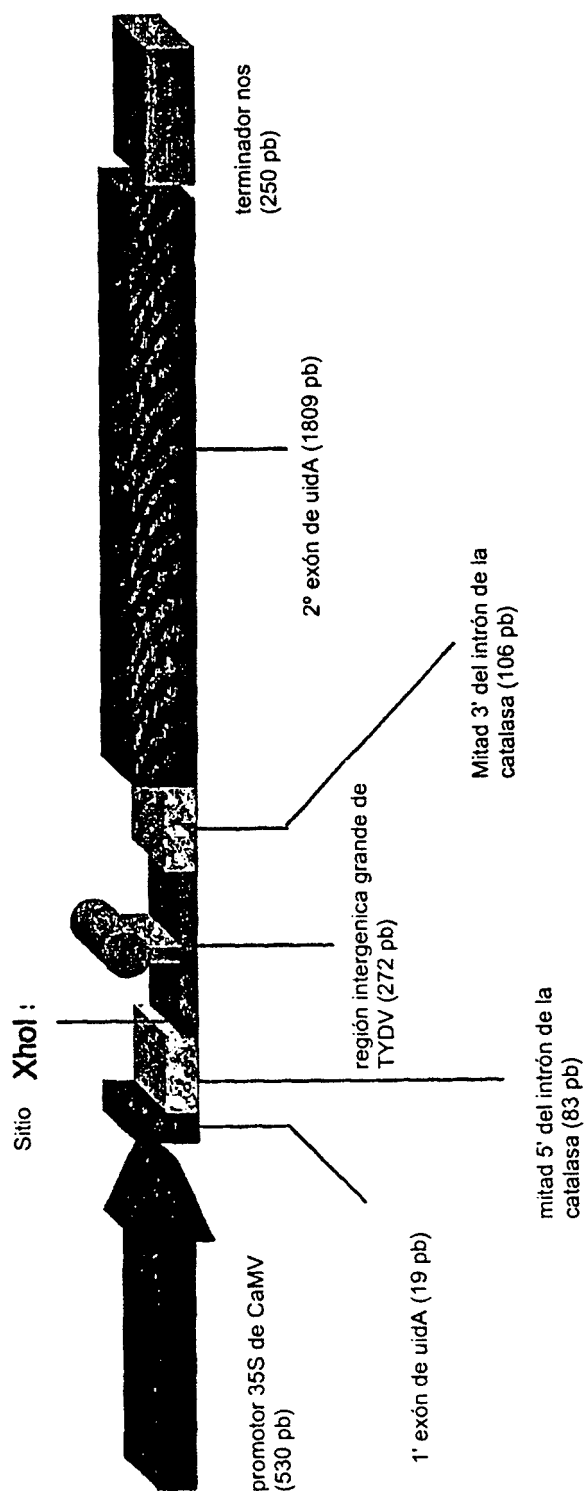


Fig 9

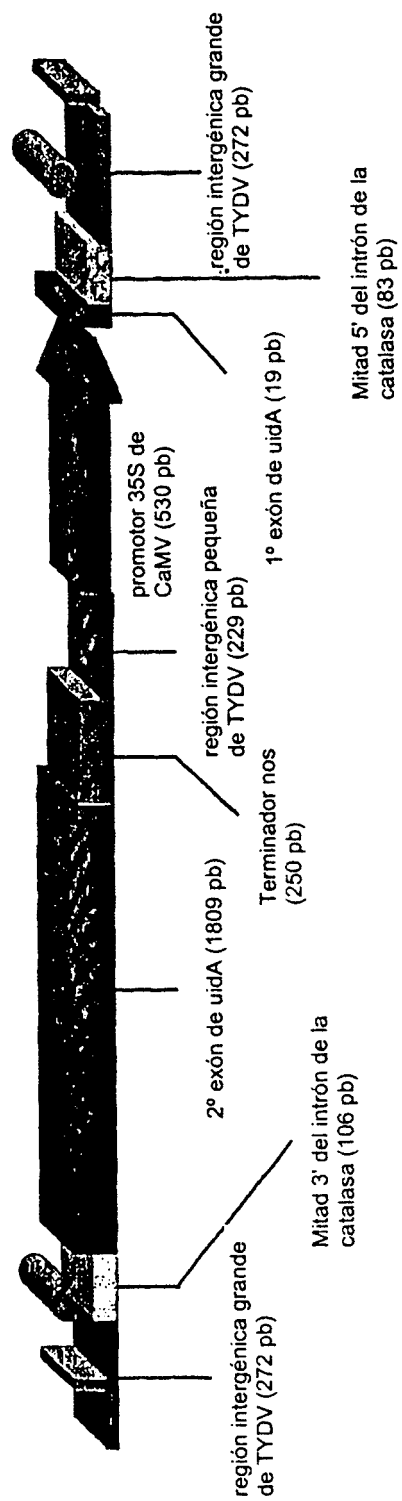


Fig 10

Casete Rep-activable de pTEST 3

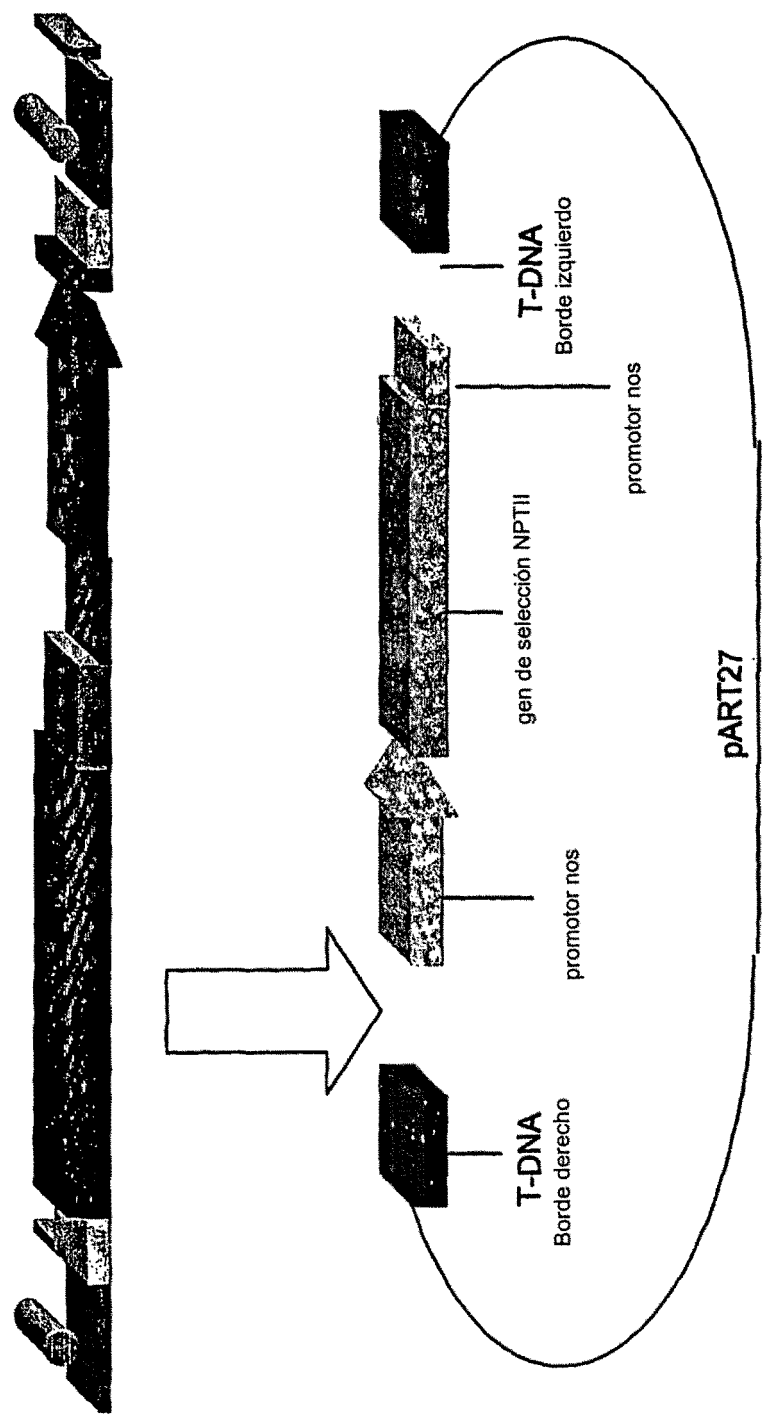


Fig 11

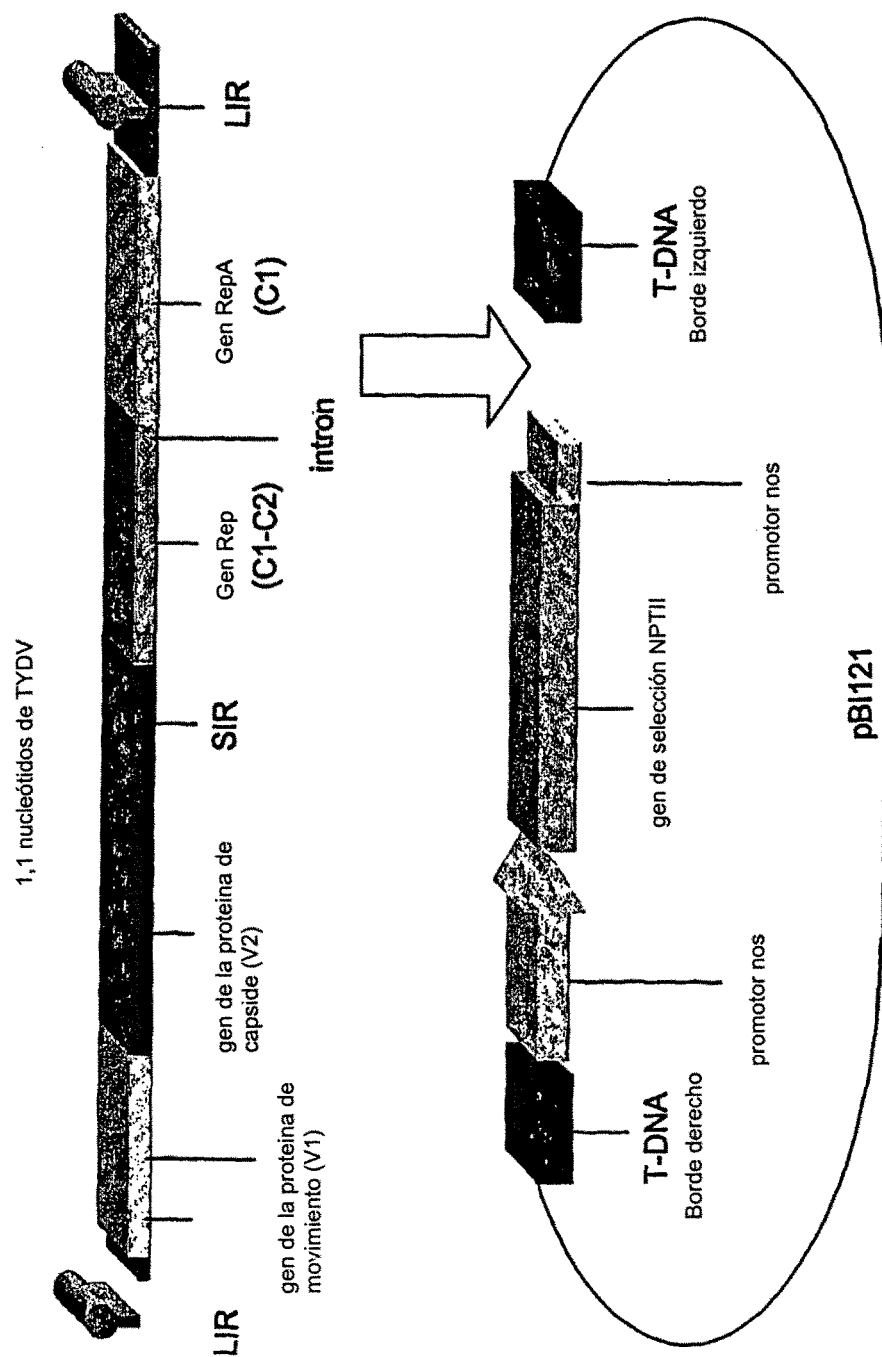


Fig 12

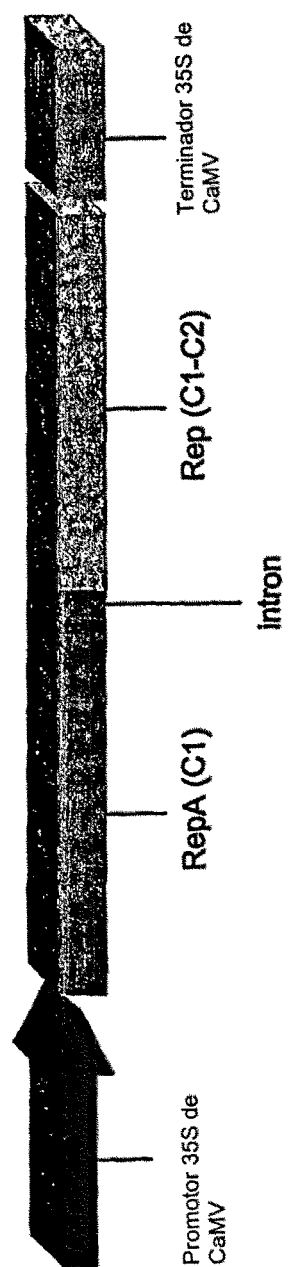


Fig 13

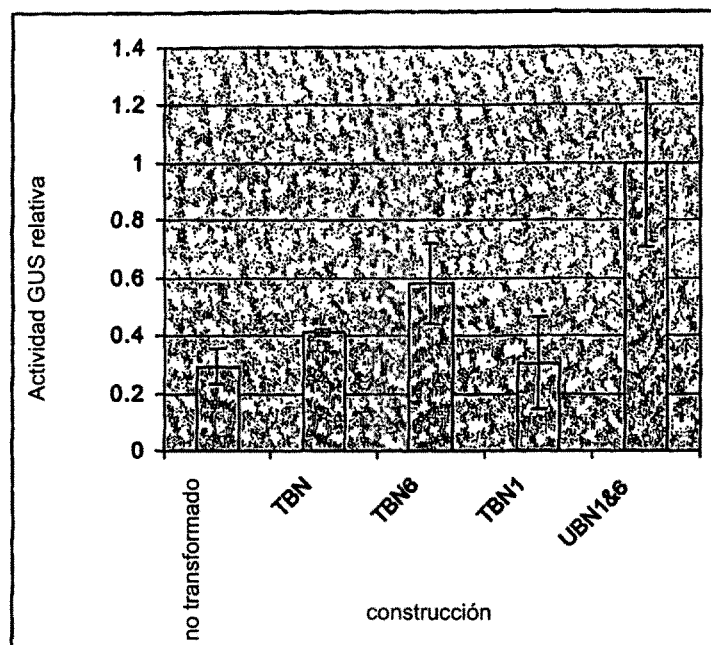


Fig 14

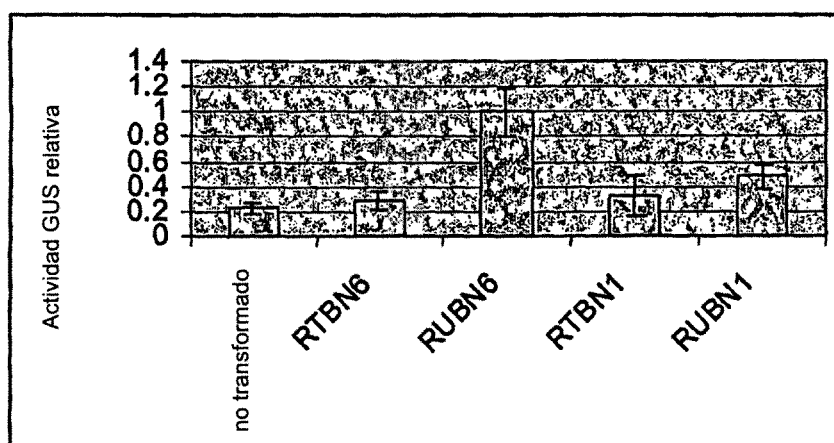


Fig 15

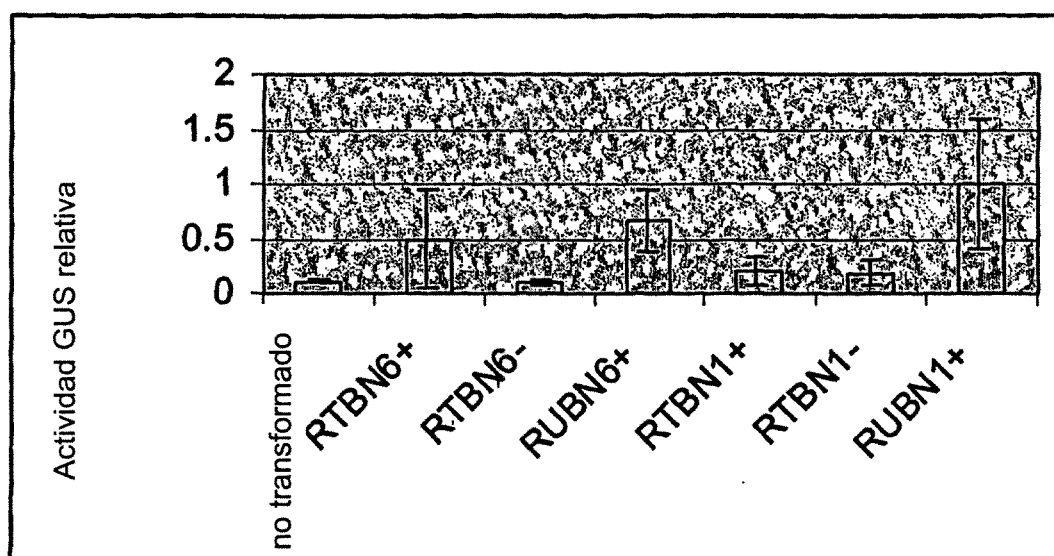


Fig 16

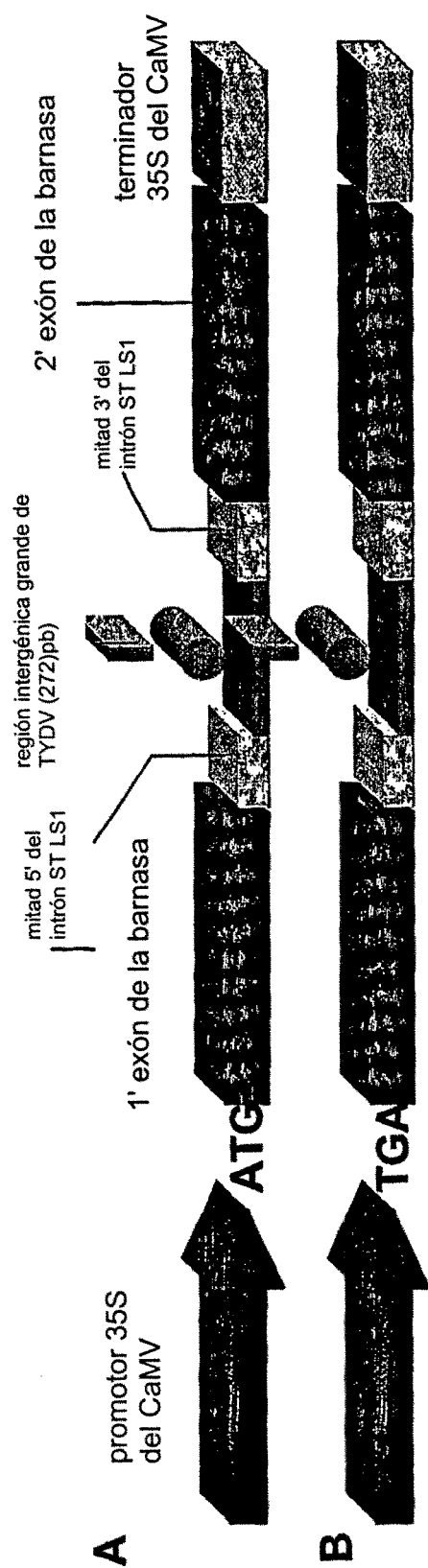


Fig 17

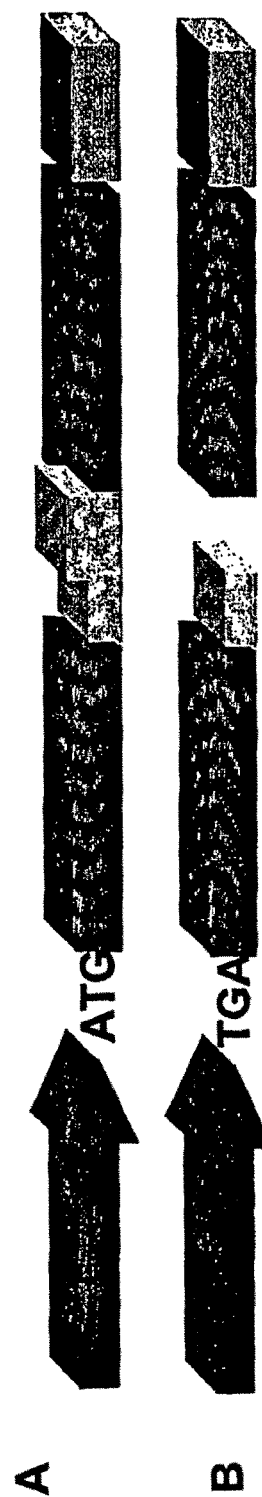


Fig 18

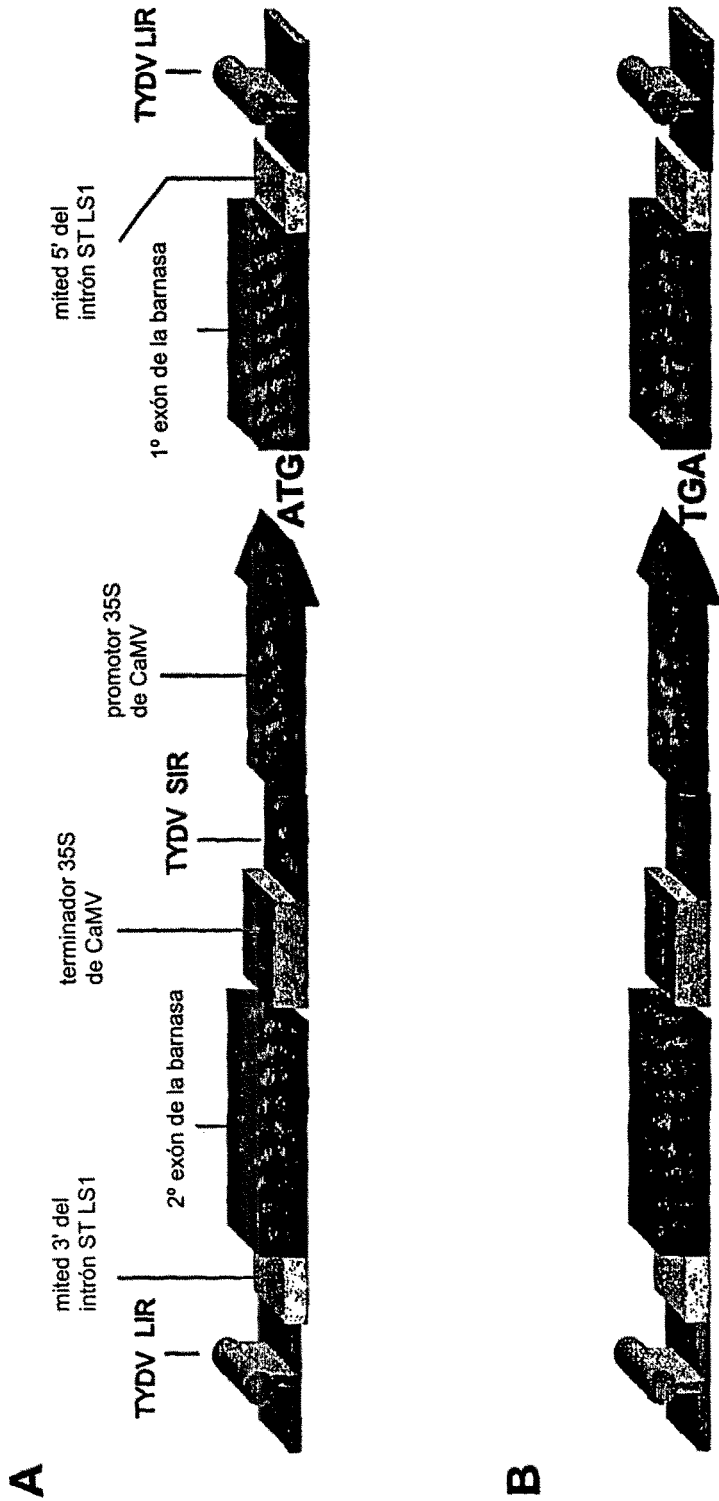


Fig 19

pGI

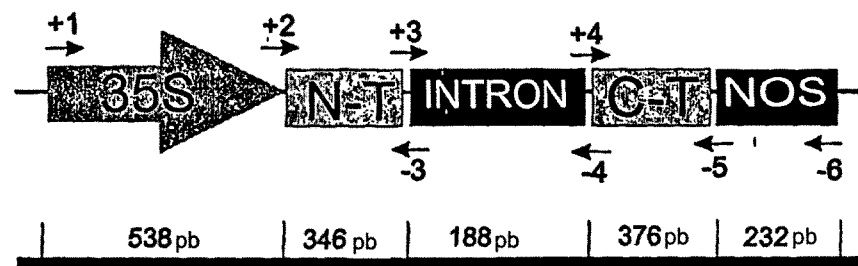


Fig 20

pGl6

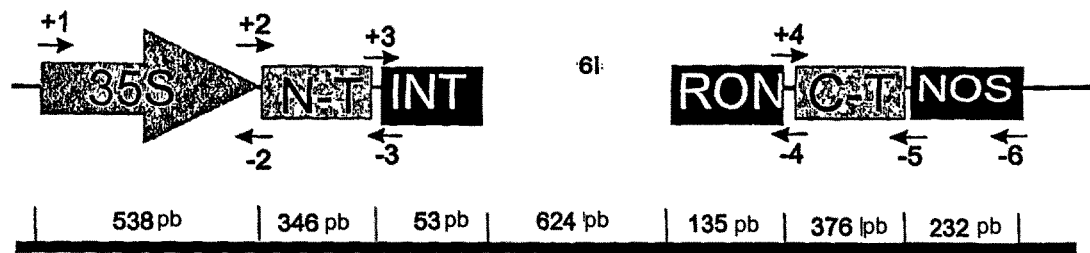


Fig 21

pGl1



Fig 22

pRG16

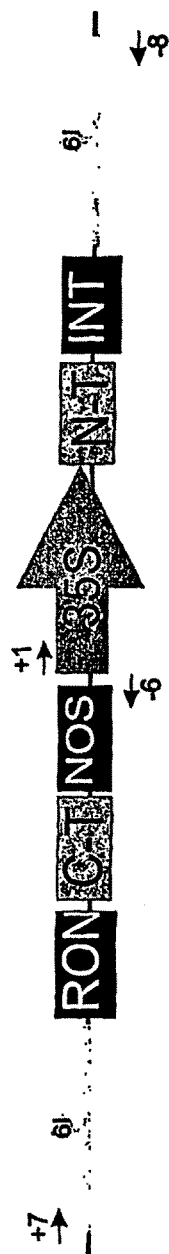


Fig 23

pRG11

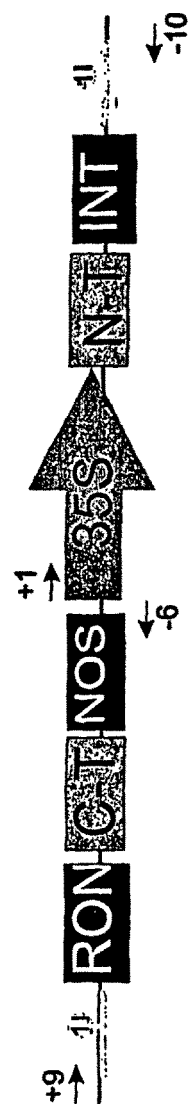


Fig 24

pRG11/6

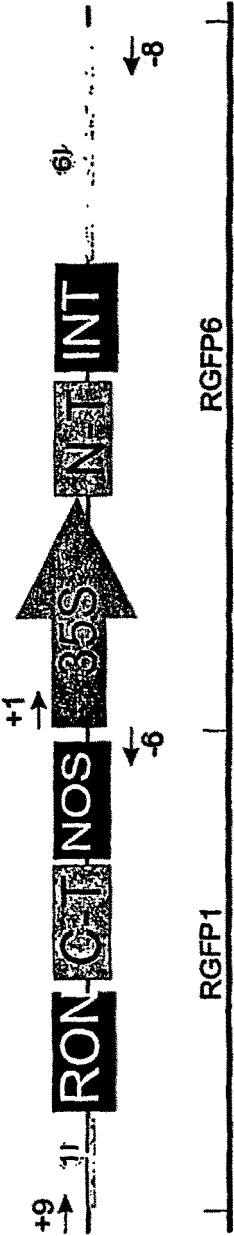
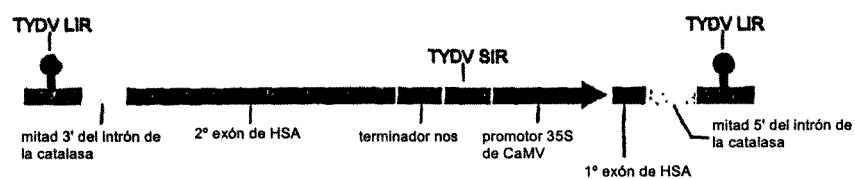
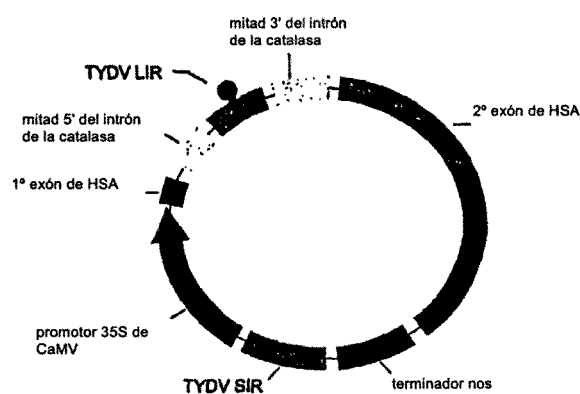


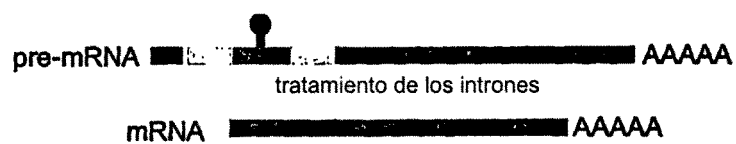
Fig 25



1, corte y unión de TYDV asistido por Rep.



2. transcripción



3. translación

expresión y acumulación de albúmina serica humana (HSA) en la planta

Fig 26

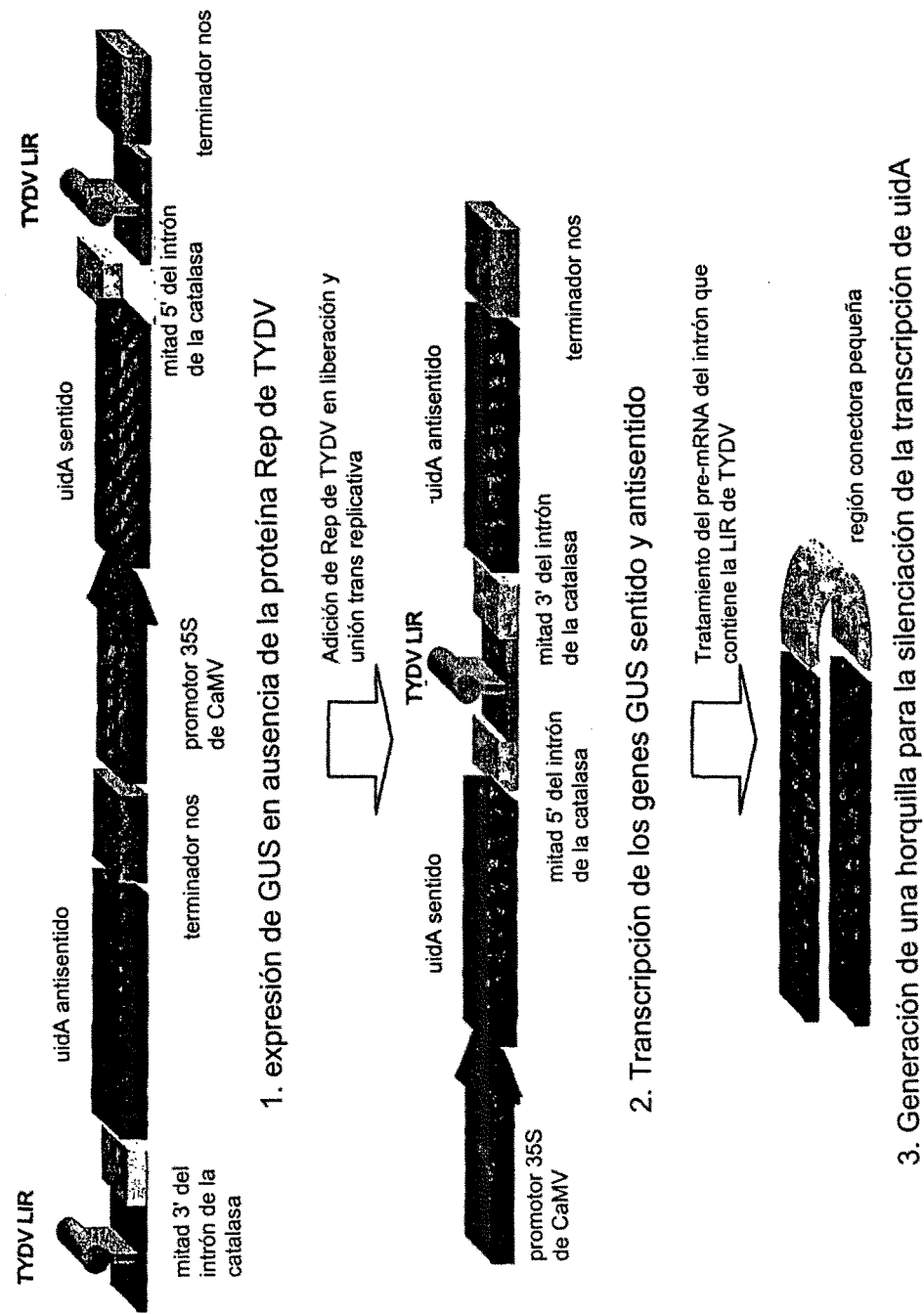


Fig 27

ES 2 296 736 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Queensland University of Technology	
5	<120> Una construcción	
	<130> 2392677/EJH	
	<140> Internacional	
	<141> 28-03-2001	
10	<150> AU PQ6516	
	<151> 28-03-2000	
	<150> AU PR1081	
	<151> 27-10-2000	
15	<160> 73	
	<170> Patente en versión 3.0	
	<210> 1	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
25	<400> 1	
	aagcttcattg gagtcaaaga	20
30	<210> 2	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
35	<400> 2	
	tcatttgagg aggatccattg gcacaggtt	29
40	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> DNA	
45	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 3	
50	aacctgtgcc atggatcctc tccaaatga	29
	<210> 4	
	<211> 29	
55	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 4	
60	aaaatcagat aagagctcga tcgttcaaa	29
	<210> 5	
65	<211> 29	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
5	tttgaacgat cgagctctta tctgatttt	29
	<210> 6	
10	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
15	<400> 6	
	aagcttttcg ccattcaggc tgc	23
20	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
25	<400> 7	
	tatcattaat tagtaagttg tgctgtaa	28
30	<210> 8	
	<211> 28	
	<212> DNA	
35	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
40	ttacagcaca acttactaat taatgata	28
	<210> 9	
	<211> 28	
45	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
50	ggaaggcaga agcgagtaat ataattatt	28
	<210> 10	
55	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 10	
	aatattatat tactcgettc tgccttcc	28
65	<210> 11	
	<211> 29	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
5	atcattaatt agtcacacta tgacaaaag	29
	<210> 12	
10	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
15	<400> 12	
	ttgtcatagt gtgactaatt aatgataat	29
20	<210> 13	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
25	<400> 13	
	gacatttgca tcagtaatat aatatttca	29
30	<210> 14	
	<211> 29	
	<212> DNA	
35	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 14	
40	aatattatat tactgatgca aatgtcccg	29
	<210> 15	
	<211> 29	
45	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
50	tcagataaga gctcagtaac agcaacaac	29
	<210> 16	
55	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 16	
	gctgttactg agctcttatac tgatctttg	29
65	<210> 17	
	<211> 23	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
5	aagcttattt cccaaatata cgt	23
	<210> 18	
10	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
15	<400> 18	
	ggatccgcac aggttatcaa c	21
20	<210> 19	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
25	<400> 19	
	gctcttcctg cagcgccg cattaaggct caagtaccgt a	41
30	<210> 20	
	<211> 41	
	<212> DNA	
35	<213> cebador	
	<400> 20	
40	gctcttcgtc gacgaattca tttcaactt tgggatgtca c	41
	<210> 21	
	<211> 24	
45	<212> DNA	
	<213> cebador	
	<400> 21	
50	gaattccatg gagtcaaaga ttca v	24
	<210> 22	
55	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
60	<400> 22	
	gcccgtgca gagtttaaag aaagatcaaa gc	32
65	<210> 23	
	<211> 34	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> cebador	
	<400> 23	
5	gccccgggtcg acgatctatt ttttaattga ttgg	34
	<210> 24	
10	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
15	<400> 24	
	ttcgagctgg tcacctgtaa ttcacacgtg gtg	33
20	<210> 25	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
25	<400> 25	
	ccatggtaga tctgaggg	18
30	<210> 26	
	<211> 25	
	<212> DNA	
35	<213> cebador	
	<400> 26	
40	tacgtacact ttcccgga ataac	25
	<210> 27	
	<211> 23	
45	<212> DNA	
	<213> cebador	
	<400> 27	
50	gtaacgcgct ttccacca cgc	23
	<210> 28	
55	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
60	<400> 28	
	ctcgagatta aggetcaagt accgta	26
65	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> cebador	
	<400> 29	
5	agtttaaaga aagatcaaag c	21
	<210> 30	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
15	<400> 30	
	aattaaccct cactaaaggg	20
20	<210> 31	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
25	<400> 31	
	gcatgcaaga gttggcggta gattccgcat gt	32
30	<210> 32	
	<211> 35	
	<212> DNA	
35	<213> cebador	
	<400> 32	
40	gctcttcgcg gccgcgctcc tgaatcgteg agtca	35
	<210> 33	
	<211> 22	
45	<212> DNA	
	<213> cebador	
	<400> 33	
50	tttaaacggt taggggtag ca	22
	<210> 34	
55	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
60	<400> 34	
	tcagtgactc gacgattc	18
65	<210> 35	
	<211> 18	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> cebador	
	<400> 35	
5	ttaatatgcc ttcagccc	18
	<210> 36	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
15	<400> 36	
	atgattgaac aagatggatt	20
20	<210> 37	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
25	<400> 37	
	tgagaagaac tcgtcaag	18
30	<210> 38	
	<211> 25	
	<212> DNA	
35	<213> cebador	
	<400> 38	
40	gttattgccg ggaaaagtgt acgta	25
	<210> 39	
	<211> 25	
45	<212> DNA	
	<213> cebador	
	<400> 39	
50	ctagcttggt tgcctccctg ctgcg	25
	<210> 40	
55	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
60	<400> 40	
	ggatccatgg cacaggttat caacacgttt gacg	34
65	<210> 41	
	<211> 28	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> cebador	
	<400> 41	
5	ctagagttat ctgattttg taaaggtc	28
	<210> 42	
10	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
15	<400> 42	
	ggatccgcac aggttatcaa cacgtttgac g	31
20	<210> 43	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
25	<400> 43	
	atggcgggcc ggtataaggg ttgg	25
30	<210> 44	
	<211> 26	
	<212> DNA	
35	<213> cebador	
	<400> 44	
40	ttattgattg ccaactgatt tgaaat	26
	<210> 45	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 45	
50	aagcttcattg gactcaaaga	20
	<210> 46	
55	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintéticos	
60	<400> 46	
	ggatccatga gtaaaggaga agaactt	27
65	<210> 47	
	<211> 29	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 47	
5	aagtcaagtt tgaggttaagt ttctgcttc	29
	<210> 48	
10	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
15	<400> 48	
	gaagcagaaa cttacctcaa acttgactt	29
20	<210> 49	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
25	<400> 49	
	ttgttgatgt gcaggagac accctcgtc	29
30	<210> 50	
	<211> 29	
	<212> DNA	
35	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 50	
40	gacgagggtg tctccctgca catcaacaa	29
	<210> 51	
	<211> 27	
45	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 51	
50	gagctcttat ttgtatagtt catccat	27
	<210> 52	
55	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
60	<400> 52	
	aagcttttcg ccattcaggc tgc	23
65	<210> 53	
	<211> 28	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 53	
5	tatcattaat tagtaagttg tgctgtaa	28
	<210> 54	
10	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
15	<400> 54	
	aatattatat tactcgcttc tgccttcc	28
20	<210> 55	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> oligonucleótido sintético	
25	<400> 55	
	atcattaatt agtcacacta tgacaaaag	29
30	<210> 56	
	<211> 30	
	<212> DNA	
35	<213> oligonucleótido sintético	
	<400> 56	
40	aatattatat tactgatgca aatgtccccc	30
	<210> 57	
	<211> 30	
45	<212> DNA	
	<213> cebador	
	<400> 57	
50	ccatggatct cattctcctt caacaaggcg	30
	<210> 58	
55	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
60	<400> 58	
	ccatggtttc aactcttct tttgtgttat ttg	33
65	<210> 59	
	<211> 27	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

	<213> cebador	
	<400> 59	
5	gaattcaggg gtaagtttgc aaatc	27
	<210> 60	
10	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
15	<400> 60	
	cgaggttg ccagtcgagc attgcc	26
20	<210> 61	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
25	<400> 61	
	ccatggttg aggcgagtg ataggattgg	30
30	<210> 62	
	<211> 30	
	<212> DNA	
35	<213> cebador	
	<400> 62	
40	ccatggagat agagtcttta gacgagttc	30
	<210> 63	
	<211> 30	
45	<212> > DNA	
	<213> cebador	
	<400> 63	
50	ggatcctatt gtgttcctgc atcgacctta	30
	<210> 64	
55	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> cebador	
60	<400> 64	
	ccatgggcat gcacgtctct ccagcgtaga agcg	34
65	<210> 65	
	<211> 30	
	<212> DNA	

ES 2 296 736 T3

<213> cebador

<400> 65

5 ggatcctcag ttctgcgcc tgagcgccgg

30

<210> 66

10 <211> 1294

<212> DNA

<213> construcción sintética

15 <400> 66

	catggagtca aagattcaaa tagaggacct aacagaactc gccgtaaaga ctggcgaaca	60
	gttcatacag agtctcttac gactcaatga caagaagaaa atcttcgtca acatggtgga	120
20	gcacgacaca cttgtctact ccaaaaatat caaagataca gtctcagaag accaaagggc	180
	aattgagact tttcaacaaa gggtaatatc cggaaacctc ctgggattcc attgccagc	240
	tatctgtcac tttattgtga agatagtggg aaaggaaggt ggctcctaca aatgccatca	300
25	ttgcgataaa ggaaaggcca tcgttgaaga tgcctctgcc gacagtgggc ccaaagatgg	360
	aeccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca	420
	agtggattga tgtgatatct ccactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc	480
30	gcaagaccct tctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggatcc catggcacag	540
	gttatcaaca cgtttgacgg ggttgcggat tatcttcaga catatcataa gctacctgat	600
	aattacatta caaaatcaga agcacaagcc ctccgctggg tggcatcaaa agggaaacctt	660
	gcagacgtcg ctccggggaa aagcatcggc ggagacatct tctcgaaacag gtaagtttct	720
35	gcttctacct ttgatataa tataataatt atcatataatt agtagtaata taatatttca	780
	aatatttttt tcaaaataaa agaattgtagt atatagcaat tgcttttctg tagtttataa	840
	gtgtgtatat ttttaatttat aacttttcta atatatgacc aaaatttggt gatgtgcagg	900
40	gagggcaagc tcccgggcaa aagcggacga acatggcgtg aagcggatat taactataca	960
	tcaggcttca gaaattcaga ccggattcct tactcaagcg actggctgat ttacaaaaca	1020
	acggaccatt atcagacctt tacaaaaatc agataactct agagtttctt aagattgaat	1080
45	cctgttgccg gtcttgccat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta	1140
	ataattaaca tgtaatgcat gacgttatct atgagatggg tttttatgat tagagtcccg	1200
	caattataca ttttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta	1260
50	tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat cggg	1294

<210> 67

<211> 2708

55 <212> DNA

<213> construcción sintética

<400> 67

60	gcgaagttgt gctgtaattg taattaataa aacgtatatt tgggaaattg atagttgtat	60
	aaaacataca acacactatg aaatacaaga cgctatgaca aatgtacggg tatctgaatg	120
65	agtttttagta tcgcttaagg gccgcaggcc cgttaaaaat aataatcgaa ttataaacgt	180

ES 2 296 736 T3

	tagataataa	tcagagatag	gtgatcagat	aatataaaca	taaacgaagt	atatgccggt	240
	acaataataa	aataagtaat	aacaaaaaaa	atatgtatac	taatctctga	ttgggttcagg	300
	agaaaggccc	accaactaaa	aggtggggag	aatgtccga	tgacgttaagc	acgggggact	360
5	attattacc	cccggtgctcg	ggacggggaca	tgacgtcagc	aaggattata	atgggctttt	420
	tattagccca	tttattgaat	tgggcccgggt	tttgtcattt	tacaaaagcc	cgggtccagga	480
	taagtataat	gtcacgtgcc	gaattaaaag	gttgcttcgc	cacgaagaaa	cctaatttga	540
10	ggttgcgtat	tcaatacgtc	accgaatatc	tattaatatg	tgagtctctg	ccgaaaaaaa	600
	tcagagcgaa	agcgggaaggc	agaagcgagt	aatataatat	ttcaaatatt	ttttttcaaaa	660
	taaaagaatg	tagtatatag	caattgcttt	tctgtagttt	ataagtgtgt	atatttttaat	720
	ttataacttt	totaatatat	gacccaaaatt	tgttgatgtg	cagggagggo	aagctcccgg	780
15	gcaaaagcgg	acgaacatgg	cgtgaagcgg	atattaacta	tacatcaggc	ttcagaaatt	840
	cagaccggat	tctttactca	agcgactggc	tgatttacia	aacaacggac	cattatcaga	900
	cctttacaaa	aatcagataa	gagctogttt	cttaagattg	aatcctgttg	ccggtcttgc	960
20	gatgattatc	atataatttc	tgttgaatta	cgtaagcat	gtaataatta	acatgtaatg	1020
	catgacgtta	tttatgagat	gggtttttat	gattagagtc	ccgcaattat	acattttaata	1080
	cgcatagaa	aacaaaatat	agcgcgcaaa	ctaggataaa	ttatcgcgcg	cgggtgtcatc	1140
	tatgttacta	gatcggggaa	ttcaactggc	gtcgttttac	aacgtcgtga	ctgggaaaaac	1200
25	cctggcggtta	cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	ctggcgtaat	1260
	agcgaagagg	ccgcaccca	tcgccttcc	caacagttgc	gcagcctgaa	tggcgaaaag	1320
	cttcatggag	tcaaagattc	aaatagagga	cctaacagaa	ctcgccgtaa	agactggcga	1380
30	acagttcata	cagagtctct	tacgactcaa	tgacaagaag	aaaatcttcg	tcaacatggg	1440
	ggagcacgac	acacttgtct	actccaaaaa	tatcaaagat	acagtctcag	aagaccaaag	1500
	ggcaattgag	acttttcaac	aaagggtaat	atccggaaac	ctcctcggtg	tccattgccc	1560
35	agctatctgt	cactttattg	tgaagatagt	ggaaaaggaa	gggtggctcct	acaaatgccca	1620
	tcattgcgat	aaaggaaagg	ccatcggtga	agatgcctct	gccgacagtg	gtcccaaaaga	1680
	tggaccccca	cccacgagga	gcacgtgga	aaaagaagac	gttccaacca	cgtcttcaaaa	1740
	gcaagtggat	tgatgtgata	tctccactga	cgtaagggat	gacgcacaat	cccactatcc	1800
40	ttcgcaagac	ccttcctcta	tataagggaag	ttcatttcat	ttggagagga	tccatgoaca	1860
	ggttatcaac	acgtttgacg	gggttgcgga	ttatcttcag	acatatcata	agctacctga	1920
	taattacatt	acaaaatcag	aagcacaaagc	cctcggtctg	gtggcatcaa	aagggaacct	1980
45	tgcagacgtc	gctocgggga	aaagcatcgg	oggagacatc	ttctcgaaca	ggtaagtttc	2040
	tgccttctacc	tttgatatat	atataataat	tatcattaat	tagtaagttg	tgctgtaatg	2100
	tttaattaata	aaacgtatat	ttgggaaatt	gatagttgta	taaaacatac	aacacactat	2160
	gaaatacaag	acgctatgac	aaatgtacgg	gtatctgaat	gagttttagt	atcgcttaag	2220
50	ggccgcaggc	ccgttaaaaa	taataatcga	attataaacg	ttagataata	atcagagata	2280
	ggtgatcaga	taatataaac	ataaacgaag	tatatgcccg	tacaataata	aaataagtaa	2340
	taacaaaaaa	aatatgtata	ctaactctctg	attgggttcag	gagaaaggcc	caccaactaa	2400
55	aagggtgggga	gaatgtcccg	atgacgtaag	cacgggggac	tattattacc	ccccgtgctc	2460
	gggacggggac	atgacgtcag	caaggattat	aatgggcttt	ttattagccc	atttattgaa	2520
	ttgggcccggg	ttttgtcatt	ttacaaaagc	cgggtccagg	ataagtataa	tgtcacgtgc	2580
60	ogaattaaaa	ggttgcttcg	ccacgaagaa	acctaatttg	agggttcgta	ttcaatacgc	2640
	taccgaatat	ctattaatat	gtgagtctct	gccgaaaaaa	atcagagcga	aagcgggaagg	2700
	cagaagcg						2708

65

ES 2 296 736 T3

<210> 68

<211> 1512

<212> DNA

5 <213> construcción sintética

<400> 68

```

10  cacactatga caaaagtacg ggtatctgat tgggttatct taacgatcta gggccgtagg      60
    ccogtgagca atgaacggcg agatcagatg tcccgagtta gtgcgccacg taagcgctgg      120
    ggcttattat tccccccagc gctcgggacg ggacatttgc atcagtaata taatatttca      180
15  aatatttttt tcaaaataaa agaatgtagt atatagcaat tgcttttctg tagtttataa      240
    gtgtgtatat tttaatttat aacttttcta atatatgacc aaaatttggt gatgtgcagg      300
    gagggcaagc tcccgggcaa aagcggacga acatggcgtg aagcggatat taactataca      360
20  tcaggcttca gaaattcaga ccggattctt tactcaagcg actggctgat ttacaaaaca      420
    acggaccatt atcagacctt tacaaagatc agataagagc tcagtaacag caacaactgt      480
    aatgaattat gtgatctgaa gtgttatggt gtttggtcgt taagaatcaa ggaataaaag      540
    ttgtgctgta atgttaatta ataaaacgta tatttgggaa ataagcttca tggagtcaaa      600
25  gattcaataa gaggacctaa cagaactcgc cgtaaagact ggogaacagt tcatcacagag      660
    tctcttacga ctcaatgaca agaagaaaat cttcgtcaac atggtggagc acgacacact      720
    tgtctactcc aaaaatatca aagatacagt ctacagaagc caaagggcaa ttgagacttt      780
30  tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt      840
    tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtg ctccatacaaa tgccatcatt gcgataaagg      900
    aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac      960
35  gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg      1020
    tgatatctcc actgaogtaa gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagaccttc      1080
    ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga gaggatccat gcacagggtta tcaacacgtt      1140
40  tgacgggggtt gcggtattatc ttcagacata tcataagcta cctgataatt acattacaaa      1200
    atcagaagca caagccctcg gctgggtggc atcaaaaggg aaccttgagc acgtcgtctc      1260
    ggggaaaagc atcggcggag acatcttctc gaacaggtaa gtttctgctt ctacctttga      1320
    tatatatata ataattatca ttaattagtc acactatgac aaaagtacgg gtatctgatt      1380
45  gggttatctt aacgatctag ggccgtaggc ccgtgagcaa tgaacggcga gatcagatgt      1440
    cccgagttag tgccgccacgt aagcgtctgg gcttattatt acccccagcg ctccgggacgg      1500
    gacatttgca tc                                          1512
50

```

<210> 69

<211> 1691

55 <212> DNA

<213> construcción sintética

60

65

ES 2 296 736 T3

<400> 69

```

5      aagcttcatg gagtcaaaga ttcaaataga ggacctaaca gaactcgccg taaagactgg      60
      cgaacagttc atacagagtc tcttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat      120
      ggtggagcac gacacacttg tctactccaa aaatatcaaa gatacagtct cagaagacca      180
      aagggcaatt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg      240
10     cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg      300
      ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa      360
      agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc      420
15     aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta      480
      tccttgcgaa gaccttccct ctatataagg aagttcattt catttggaaga ggggatccat      540
      gagtaaagga gaagaacttt tcaactggag tgtcccaatt cttgttgaat tagatgggtga      600
      tgttaatggg cacaaatfff ctgtcagtgg agaggggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa      660
20     acttaccctt aaattttatt gcactactgg aaaactacct gttccgtggc caacacttgt      720
      cactactttc tcttatgggt ttcaatgctt ttcaagatac ccagatcata tgaagcggca      780
      cgacttcttc aagagcgcca tgcctgaggg atacgtgcag gagaggacca tcttcttcaa      840
25     ggacgacggg aactacaaga cacgtgctga agtcaagttt gaggtaagtt tctgcttcta      900
      cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta atataatatt tcaaataatt      960
      ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt ctgtagttta taagtgtgta      1020
30     tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt gttgatgtgc agggagacac      1080
      cctcgtcaac aggatcgagc ttaagggaaat cgatttcaag gaggacggaa acatcctcgg      1140
      ccacaagttg gaatacaact acaactccca caacgtatac atcatggccg acaagcaaaa      1200
35     gaacggcatc aaagccaact tcaagacccg ccacaacatc gaagacggcg gcgtgcaact      1260
      cgctgatcat tatcaacaaa atactccaat tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa      1320
      ccattacctg tccacacaat ctgccctttc gaaagatccc aacgaaaaga gagaccacat      1380
40     ggtccttctt gagtttgtaa cagctgctgg gattacacat ggcattgatg aactatacaa      1440
      agctataaga gctcgtttct taagattgaa tctgtgtgcc ggtccttgcg tgattatcat      1500
      ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt      1560
45     tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa      1620
      caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga      1680
      tcggggaatt c

```

50 <210> 70

<211> 2315

<212> DNA

55 <213> construcción sintética

60

65

ES 2 296 736 T3

<400> 70

	aagcttcatg	gagtcaaaga	ttcaaataga	ggacctaaaca	gaactcgccg	taaagactgg	60
5	cgaacagttc	atacagagtc	tcttaacgact	caatgacaag	aagaaaatct	tcgtcaacat	120
	gggtggagcac	gacacacttg	tctactccaa	aaatatcaaa	gatacagttc	cagaagacca	180
	aagggcaatt	gagacttttc	aacaaagggg	aatatccgga	aacctcctcg	gattccattg	240
10	cccagctatc	tgtaacttta	ttgtgaagat	agtggaaaag	gaagggtggc	cctacaaatg	300
	ccatcattgc	gataaaggaa	aggccatcgt	tgaagatgcc	tctgcgcaca	gtgggtcccaa	360
	agatggaccc	ccacccacga	ggagcatcgt	ggaaaaagaa	gacgttccaa	ccacgtcttc	420
	aaagcaagtg	gattgatgtg	atatctccac	tgacgtaagg	gatgacgcac	aatcccacta	480
15	tccttcgcaa	gaccttctct	ctatataagg	aagttcattt	catttggaga	ggggatccat	540
	gagtaaagga	gaagaacttt	tcactggagt	tgtcccaatt	cttggtgaat	tagatgggtg	600
	tgtaaatggg	cacaaatttt	ctgtcagtg	agagggtgaa	ggtgatgcaa	catacggaaa	660
20	acttaccctt	aaattttatt	gcactactgg	aaaactacct	gttcctgtgg	caacacttgt	720
	cactactttc	tcttatgggt	ttcaatgott	ttcaagatac	ccagatcata	tgaagcggca	780
	cgacttcttc	aagagcgcca	tgcttgaggg	atacgtgcag	gagaggacca	tcttcttcaa	840
25	ggacgcaggg	aactacaaga	caagtgtgta	agtcaagttt	gaggtaagtt	tctgcttota	900
	cctttgatat	atatataata	attatcatta	attagtgcga	agttgtgtgt	taatgttaat	960
	taataaaacg	tatatattgg	aaattgatag	ttgtataaaa	catacaacac	actatgaaat	1020
	acaagacgct	atgacaaatg	tacgggtatc	tgaatgagtt	ttagtatcgc	ttaaggcccg	1080
30	caggcccggt	aaaaataata	atcgaattat	aaacgttaga	taataatcag	agataggtga	1140
	tcagataata	taaacataaa	cgaagtatat	gccggtacaa	taataaaata	agtaataaca	1200
	aaaaaaatat	gtatactaata	ctctgattgg	ttcaggagaa	aggcccacca	actaaaagggt	1260
35	ggggagaatg	tcocgatgac	gtaagcaagg	gggactatta	ttaccccccg	tgctcgggac	1320
	gggacatgac	gtcagcaagg	attataatgg	gctttttatt	agcccattta	ttgaattggg	1380
	ccgggttttg	tcatttttaca	aaagcccggt	ccaggataag	tataatgtca	cgtgccgaat	1440
40	taaaagggtg	cttcgccacg	aagaaacctt	atttgagggt	gcgtattcaa	tacgctaccg	1500
	aatatctatt	aatatgtgag	tctctgccga	aaaaaatcag	agcgaaagcg	gaaggcagaa	1560
	gcgagtaata	taatatattca	aatatttttt	tcaaaataaa	agaatgtagt	atatagcaat	1620
45	tgctttttctg	tagttttata	gtgtgtatat	tttaattttat	aacttttcta	atatatgacc	1680
	aaaattttgt	gatgtgcagg	gagacacctt	cgtcaacagg	atcgagctta	agggaaatcg	1740
	tttcaaggag	gacggaaaca	tcctcggcca	caagttggaa	tacaactaca	actcccacaa	1800
	cgtatacatc	atggccgaca	agcaaaagaa	cggcatcaaa	gccaaacttc	agacccgcca	1860
50	caacatcgaa	gaaggcgggc	tgcaactcgc	tgatcattat	caacaaaata	ctccaattgg	1920
	cgtggccctt	gtcctttttac	cagacaacca	ttacctgtcc	acacaatctg	ccctttcgaa	1980
	agatcccaac	gaaaagagag	accacatggg	ccttcttgag	tttgtaacag	ctgctgggat	2040
55	tacacatggc	atggatgaac	tatacaaagc	tagagctcgt	ttottaagat	tgaatcctgt	2100
	tgccggtctt	gcgatgatta	tcataataat	tctgttgaat	tacgttaagc	atgtaataat	2160
	taacatgtaa	tgcattgacg	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	tcocgcaatt	2220
60	atacatttaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atagcgcgca	aactaggata	aattatcgcg	2280
	cgcggtgtca	tctatgttac	tagatcgggg	aatttc			2315

<210> 71

65 <211> 1851

<212> DNA

<213> construcción sintética

ES 2 296 736 T3

<400> 71

	aagcttcatg gagtcaaaga ttcaaataga ggacctaaaca gaactcgccg taaagactgg	60
	ogaacagttc atacagagtc tcttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat	120
5	ggtggagcac gacacacttg tctactccaa aaatatcaaa gatacagtct cagaagacca	180
	aagggcaatt gagacttttc aacaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg	240
	cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtgaaaaag gaagggtggct cctacaaatg	300
10	ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgcgcaca gtggtcccaa	360
	agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc	420
	aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta	480
	tccttcgcaa gacccctcct ctatataagg aagttcattt catttgagga ggggatccat	540
15	gagtaaagga gaagaacttt tcaactggagt tgtcccaatt cttggtgaat tagatggtga	600
	tggttaatggg caaaaatttt ctgtcagtg agagggtgaa ggtgatgcaa catacggaaa	660
	acttaccctt aaattttattt gcactactgg aaaactacct gttccgtggc caacacttgt	720
20	cactactttc tcttatgggtg ttcaatgctt ttcaagatac ccagatcata tgaagcggca	780
	cgacttcttc aagagcgcca tgcctgaggg atacgtgcag gagaggacca tcttcttcaa	840
	ggacgcaggg aactacaaga cacgtgctga agtcaagttt gaggtaagtt tctgcttcta	900
	cctttgatata atataataa attatcatta attagtcaca ctatgacaaa agtacgggta	960
25	tctgattggg ttatcttaac gatctagggc cgtaggcccg tgagcaatga acggcgagat	1020
	cagatgtccc gagttagtgc gccacgtaag cgctggggct tattattacc ccagcgctc	1080
	gggacgggac atttgcatca gtaataaat atttcaaata tttttttcaa aataaaagaa	1140
30	tgtagtatata agcaattgct tttctgtagt ttataagtggt gtatatttta atttataact	1200
	tttctaataa atgacaaaaa tttgttgatg tgcagggaga caccctcgtc aacaggatcg	1260
	agcttaaggg aatcgatttc aaggaggacg gaaacatcct cggccacaag ttggaataca	1320
35	actacaactc ccacaacgta tacatcatgg ccgacaagca aaagaacggc atcaaaagcca	1380
	acttcaagac ccgccaacaac atcgaagacg gggcggtgca actcgctgat cattatcaac	1440
	aaaatactoc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac ctgtccacac	1500
	aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt cttgagtttg	1560
40	taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaagctaga gctcgtttct	1620
	taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg	1680
	ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga	1740
45	ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaact	1800
	aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tggtactaga tcggggaatt c	1851

<210> 72

<211> 32

50 <212> DNA

<213> cebador

<400> 72

55 ccatggagat gaagtgggta acctttattt cc

32

<210> 73

60 <211> 30

<212> DNA

<213> cebador

65 <400> 73

ggatccttat aagcctaagg cagcttgact

30