

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 456**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3463 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2016 PCT/IL2016/051010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17122189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2016 E 16884828 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2022 EP 3347472**

54 Título: **Composiciones que comprenden polipéptidos de clado CYP76AD1 y usos de estos**

30 Prioridad:

10.09.2015 IL 24146215

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

13.12.2022

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
at the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**AHARONI, ASAPH y
POLTURAK, GUY**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 930 456 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden polipéptidos de clado CYP76AD1 y usos de estos

5 Campo de la invención

La invención proporciona polinucleótidos recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un gen CYP76AD6 o un gen relacionado y su uso para producir L-DOPA a partir de tirosina y tratar trastornos sensibles a la dopamina, tales como la enfermedad de Parkinson. La invención también proporciona polinucleótidos recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un CYP76AD1 y/o CYP76AD6, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), tal como DODA1 de *Beta vulgaris* y, en algunos casos, un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, tal como un gen de ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa* (cDOPA5GT), y su uso para producir betalaínas. Finalmente, la invención proporciona polipéptidos quiméricos, vectores de expresión, células, composiciones y organismos, lo que incluye plantas, y sus usos en diversos métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

Las betalaínas son pigmentos vegetales de color rojo púrpura y amarillo derivados de la tirosina que se encuentran en un solo grupo de angiospermas, el orden Caryophyllales, en el que se encuentran de manera mutuamente excluyente con los pigmentos de antocianina químicamente distintos y generalizados. La clase de las betalaínas contiene una amplia serie de compuestos, que se clasifican generalmente en dos grupos; las betacianinas rojo púrpura y las betaxantinas amarillas.

Una enzima clave en la biosíntesis de las betalaínas, la DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) convierte la L-DOPA en ácido betalámico, que constituye la cadena principal básica de todas las betalaínas (Figura 1). La conjugación espontánea de ácido betalámico con aminos o con derivados de L-DOPA, da como resultado la formación de betaxantinas amarillas o betacianinas rojo púrpura, respectivamente. La glucosiltransferasa relacionada con la betalaína también se ha caracterizado en varias especies de plantas Caryophyllales, donde cataliza la glucosilación 5-O de la ciclo-DOPA o, alternativamente, la glucosilación 5-O o 6-O de la betanidina. Se desconoce la enzima que cataliza la formación de L-DOPA a partir de la tirosina.

Debido a su alta estabilidad, independencia del pH y propiedades antioxidantes, las betalaínas pueden usarse como colorantes alimentarios naturales y suplementos dietéticos.

Si bien las fuentes potenciales de antocianinas en plantas comestibles son numerosas, las betalaínas se encuentran en muy pocas plantas comestibles, la remolacha roja es la única fuente importante para la extracción de betalaína en uso comercial en la actualidad. A pesar de su alto contenido en betacianina, el extracto de remolacha roja tiene varios inconvenientes como fuente de colorantes alimentarios; produce principalmente betanina y, por tanto, tiene una variabilidad de color limitada, tiene sabores terrosos adversos debido a la presencia de geosmina y diversas pirazinas, y conlleva el riesgo de transferencia de microbios transmitidos por el suelo. Actualmente no existen fuentes naturales para el uso a gran escala de las betaxantinas como colorantes alimentarios. La remolacha amarilla, por ejemplo, no se usa probablemente debido a los fenoles coexistentes que se oxidan fácilmente y enmascaran el tono amarillo de las betaxantinas. Evidentemente, es de interés desarrollar fuentes alternativas de betalaínas, particularmente betaxantinas, ya que actualmente no existen pigmentos solubles en agua amarillos naturales disponibles para uso comercial en la industria alimentaria. La producción heteróloga de betalaínas puede proporcionar numerosas nuevas fuentes viables para estos pigmentos, tales como plantas, cultivos de células vegetales, algas y levaduras.

Un intermediario de la vía de la betalaína, la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), es también un metabolito comercialmente valioso que se usa ampliamente para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno progresivo del sistema nervioso que afecta principalmente al sistema motor del cuerpo. Es el segundo trastorno neurodegenerativo más común y el trastorno del movimiento más común, que afecta a un estimado de 5 millones de personas en todo el mundo. Una característica principal de la enfermedad de Parkinson es la reducción de los niveles de dopamina, una molécula de señalización importante en el sistema nervioso. La terapia más efectiva para la enfermedad de Parkinson es la administración de L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina), que se convierte en dopamina en el cerebro. La L-DOPA es el fármaco más efectivo para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, ya que la dopamina no logra atravesar la barrera hematoencefálica.

La L-DOPA también se comercializa ampliamente como suplemento dietético y es un precursor de metabolitos adicionales de alto valor, lo que incluye, entre otros, catecolaminas (por ejemplo, dopamina, epinefrina), alcaloides de bencilisoquinolina (por ejemplo, morfina y otros opiáceos), pigmentos de betalaína y melanina.

Aunque la L-DOPA se produce en muchas especies de plantas y animales, rara vez se acumula en cantidades sustanciales. Esto se debe parcialmente al hecho de que la L-DOPA se forma universalmente por la enzima

tirosinasa, que cataliza la hidroxilación de la tirosina a L-DOPA pero también la convierte inmediatamente a su forma oxidada, la dopaquinona.

Actualmente, la L-DOPA para la industria farmacéutica se produce mediante el uso de uno de varios métodos, todos los cuales tienen graves limitaciones, ya que la síntesis química solo puede lograrse en un proceso costoso que implica muchas reacciones químicas y requiere el uso de sustratos costosos y condiciones rigurosas de producción. También se ha explorado la producción biotecnológica de L-DOPA mediante el uso de enzimas tirosinasa (también denominadas polifenol oxidasa- PPO). La reacción dual de la tirosinasa descrita anteriormente es muy problemática para la producción comercial de L-DOPA, ya que el producto de interés se metaboliza directamente a la dopaquinona comercialmente inútil y, por lo tanto, es un cuello de botella importante para su uso en la biosíntesis enzimática para la producción a gran escala de L-DOPA a partir de tirosina. Por tanto, existe una necesidad insatisfecha de un método más eficiente y menos costoso para preparar L-DOPA.

La biosíntesis de la betalaína es aún poco comprendida en comparación con las otras clases principales de pigmentos vegetales, específicamente, antocianinas y carotenoides, especialmente en lo que respecta a la enzima que cataliza la conversión de tirosina en L-DOPA en la vía sintética de la betalaína en Caryophyllales.

Resumen de la invención

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima implicada en la conversión de tirosina en L-DOPA, en donde dicha secuencia de ácido nucleico es un gen CYP76AD6 bajo el control de un promotor o un gen CYP76AD15 bajo el control de un promotor.

En una modalidad, la presente invención proporciona que la secuencia de ácido nucleico del gen CYP76AD6 es como se expone en SEQ ID NO: 31, o en donde la secuencia de ácido nucleico del gen CYP76AD15 es como se expone en SEQ ID NO: 35.

En una modalidad, la presente invención proporciona que el polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de selección, tal como el gen de la neomicina fosfotransferasa II (nptII).

En una modalidad, la presente invención proporciona que el promotor es un promotor constitutivo o es un promotor inducible.

En una modalidad, la presente invención proporciona que el promotor es un promotor 35S de CaMV, un promotor de ubiquitina 10, un promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum* (SIUb10), o un promotor de ubiquitina-10 de *Arabidopsis*, o en donde dicho promotor inducible es un promotor inducible por galactosa.

En una modalidad, la presente invención proporciona que el polinucleótido es el vector de expresión pDOPA1, que comprende el gen CYP76AD6 impulsado por el promotor 35S de CaMV; o el vector de expresión pDOPA2, que comprende el gen CYP76AD6 impulsado por el promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum*.

En una modalidad, la presente invención proporciona que el promotor es un promotor específico de frutas tal como el promotor E8, o es un promotor específico de flores tal como el promotor de la calcona sintasa (CHS) de *Petunia x hybrida*.

En una modalidad, la presente invención proporciona que el polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen que aumenta la disponibilidad de tirosina en una célula, por ejemplo, un AroG175, o una hidroxilasa de aminoácidos aromáticos (AAH), o una de sus combinaciones.

En una modalidad, la presente invención proporciona que la célula es una célula vegetal.

En una modalidad, la presente invención proporciona que el polinucleótido incluye además una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en donde dicha secuencia de ácido nucleico se inserta en el marco del polinucleótido.

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende el polinucleótido recombinante, o un vector de expresión que comprende el polinucleótido recombinante, o un polipéptido quimérico codificado por el polinucleótido recombinante.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir L-DOPA en una célula que comprende las etapas de: poner en contacto dicha célula con el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y expresar en dicha célula un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD6 o dicho gen CYP76AD15; lo que produce de esta manera L-DOPA.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método in vitro para producir L-DOPA a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina in vitro con un polipéptido recombinante sintetizado a partir de un gen CYP76AD6 o un gen CYP76AD15, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante naranja natural que comprende las etapas de poner en contacto una célula con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), un ácido nucleico; y expresar en dicha célula un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD6 o gen CYP76AD15, y un polipéptido recombinante a partir del gen que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD); en donde se producen betaxantinas en dicha célula, lo que produce de esta manera un colorante amarillo natural.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante naranja natural que comprende las etapas de poner en contacto una célula con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6 o CYP76AD15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina; y expresar en dicha célula un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD1, un polipéptido recombinante a partir del gen que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD6 o dicho gen CYP76AD15, y un polipéptido recombinante a partir del gen que codifica la glucosiltransferasa relacionada con la betalaina; en donde se produce una combinación de betacianina y betaxantina, lo que produce de esta manera un colorante naranja natural.

Breve descripción de los dibujos

El objeto considerado como la invención se señala particularmente y se reivindica claramente en la porción conclusiva de la descripción. La invención, sin embargo, tanto en organización como en método de operación, junto con objetivos, características y ventajas de esta, puede entenderse mejor por referencia a la descripción detallada siguiente cuando se lee con las figuras adjuntas en las que:

Figura 1. La vía biosintética de la betalaina. Los genes que participan en la vía se muestran en magenta. Reacciones enzimáticas: EI, hidroxilación de tirosina; EII, DOPA-4,5 dioxigenasa; EIII, oxidación de DOPA; EIV, glucosilación de ciclo-DOPA; EV, glucosilación de betanidina; EVI, glucosilación adicional de betacianinas; EVII, acilación de betacianinas. Reacciones espontáneas predichas: SI, condensación (formación de aldimina). Las reacciones enzimáticas EII y EIII van seguidas de una reacción de ciclación espontánea y, por lo tanto, están marcadas con un asterisco. La EV puede catalizarse alternativamente por una betanidin-6-O-glucosiltransferasa, lo que da lugar a la formación de gonfrenina en lugar de betanina. Las líneas discontinuas designan reacciones de una vía alternativa, que se demostró que se produce en *Mirabilis jalapa*, en la que la ciclo-DOPA se glucosila primero y después se condensa con ácido betalámico para formar betanina.

Figuras 2A-2G. Identificación de MjCYP76 (SEQ ID NO: 1) como un gen candidato relacionado con la betalaina. La expresión génica en *Mirabilis jalapa* se analizó en un conjunto de datos de transcriptoma derivado de 24 tejidos, lo que incluye cuatro tipos de órganos florales en cinco etapas de desarrollo, epidermis de tallo rojo o verde, y hojas rojas o verdes. Figura 2A: Pétalos. Figura 2B: Filamentos de estambre. Figura 2C: Epidermis del tallo del nudo o entrenudo. Figura 2D: Estigmas. Figura 2E: Anteras. Figura 2F: Hoja roja-joven o madura-verde. Figura 2G: Los genes ciclo-dopa-5-O-glucosiltransferasa relacionados con la betalaina (cDOPA5GT; SEQ ID NO: 2), DOPA 4,5-dioxigenasa (MjDOD; SEQ ID NO: 3) y el citocromo P450 CYP76AD3 (Núm. acceso a Genbank HQ656026.1; SEQ ID NO: 4) muestran patrones de expresión que son similares a la acumulación de pigmento. El gen MjCYP76 del citocromo P450 (SEQ ID NO: 1) se coexpresa altamente con cDOPA5GT (valor r de correlación de Pearson = 0,90) y en menor medida con MjDOD (valor r = 0,67).

Figura 3. Patrones de expresión génica de los supuestos genes que codifican la polifenol oxidasa MjPPO1 (SEQ ID NO: 5); MjPPO2 (SEQ ID NO: 6); MjPPO3 (SEQ ID NO: 7); y MjPPO4 (SEQ ID NO: 8) en el conjunto de datos de seq-ARN de *Mirabilis jalapa*.

Figura 4A. El análisis por qRT-PCR de cuatro parálogos de CYP76AD muestra una regulación negativa parcial después de la infección con vectores pTRV2:CYP76AD1 o pTRV2:CYP76AD1-CYP76AD6, lo que sugiere un silenciamiento fuera del objetivo. Se observó una regulación positiva de Bv20048 en tejidos infectados con pTRV2:CYP76AD1-CYP76AD6. Los valores de cuantificación relativa (RQ) indican la media de tres réplicas biológicas $\pm$ SE. Los asteriscos indican la significación estadística de la expresión diferencial en comparación con el tejido no silenciado. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Figura 4B. Árbol filogenético de máxima probabilidad de parálogos de CYP76AD en *B. vulgaris*. CYP76AD6 (Núm. de acceso a GenBank KT962274; SEQ ID NO: 30); CYP76AD1 (acceso AET43289.1; SEQ ID NO: 14); BvCYP76new (acceso KU041699; SEQ ID NO: 9); Bv20048 (acceso KU041700); Bv10427 (acceso KU041701); Bv31911 (acceso KU041702); Bv15899 (acceso KU041703); Bv15885 (acceso KU041704).

Figuras 5A-5C. El silenciamiento conjunto de CYP76AD1 y CYP76AD6 inhibe la producción de betalaina. Se usaron ensayos de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en remolacha roja para silenciar BvDOD1 o CYP76AD1. CYP76AD1 conjuntamente se silenció adicionalmente con cada uno de los dos nuevos candidatos BvCYP76new (SEQ ID NO: 9) y CYP76AD6. Mientras que el silenciamiento de CYP76AD1 solo o el silenciamiento conjunto con BvCYP76new bloquea la formación de betacianinas pero no de betaxantinas, el

silenciamiento conjunto de CYP76AD1 y CYP76AD6 impide la producción de ambos tipos de pigmentos, lo que da como resultado un fenotipo similar al que se obtiene al silenciar BvDODA1. La reducción de los niveles de betaxantina se observa mediante una disminución visible del color amarillo y la ausencia de fluorescencia bajo la luz azul, típica de las betaxantinas. En la Figura 5A, se presentan imágenes de la planta completa, 3,5 semanas después de la infiltración; en la Figura 5B, imágenes de una sola hoja, campo claro y en la Figura 5C, se muestran imágenes de una sola hoja, luz azul.

Figura 6A. Cuantificación relativa de betaxantina en hojas de remolacha con silenciamiento de VIGS. El contenido relativo de betaxantina se evaluó espectrofotométricamente mediante mediciones de absorción de luz a 475 nm y 600 nm. Los valores indican la media $\pm$ SEM de cuatro réplicas biológicas, cada una de las cuales consiste de tejido con genes silenciados de dos a tres plantas. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa con respecto a pTRV2:CYP76AD1. **, valor de $P < 0,01$. RQ, cuantificación relativa.

Figura 6B. Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real (qRT-PCR) de CYP76AD1 y CYP76AD6. CYP76AD1 está regulado negativamente en tejidos infectados con pTRV2:CYP76AD1 o pTRV2:CYP76AD1-CYP76AD6. CYP76AD6 está significativamente regulado negativamente después de la infección con pTRV2: CYP76AD1-CYP76AD6. Los valores de cuantificación relativa (RQ) indican la media de tres réplicas biológicas $\pm$ SE. Los asteriscos indican la significación estadística de la expresión diferencial en comparación con las plantas no infectadas. **, valor de $P < 0,01$.

Figuras 7A-7F. La expresión recombinante de CYP76AD1 o CYP76AD6 en hojas de *Nicotiana benthamiana* permite la producción de L-DOPA y betalaina. Figura 7A: La infiltración conjunta de agrobacterias que albergan plásmidos para la expresión de CYP76AD1 con cDOPA5GT (pAD1-GT) y BvDODA1 (pDODA) en hojas de *Nicotiana benthamiana* provoca una pigmentación roja. Figura 7B: El análisis por LC-MS del tejido pigmentado de rojo muestra la aparición de betanina e isobetanina. Figura 7C: La infiltración conjunta del vector de expresión CYP76AD6 (pAD6) y pDODA en hojas de *N. benthamiana* provoca una pigmentación amarilla. Figura 7D: La infiltración conjunta de pAD1-GT en hojas de *N. benthamiana* permite la producción de L-DOPA. No se detectó L-DOPA en el experimento de control, donde se expresa YFP (pYFP). Figura 7E: El análisis del tejido pigmentado de amarillo permite la identificación de varios compuestos de betaxantina, lo que incluye la indicaxantina. Figura 7F: La infiltración de pAD6 en hojas de *N. benthamiana* permite la producción de L-DOPA. No se detectó L-DOPA en el experimento de control (pDODA + pYFP). XIC, cromatograma de iones extraídos.

Figuras 8A-8C. Los citocromos P450 CYP76AD1 y CYP76AD6 difieren en actividad y filogenia.

Figura 8A: Expresión recombinante de CYP76AD1, CYP76AD6 y BvDODA1 en células de levadura. La imagen que se presenta es de un medio en el que se cultivaron las levaduras después de la inducción con galactosa durante la noche. Cada clon de levadura se transformó con tres vectores, para la expresión de CYP76AD1, CYP76AD6, BvDODA1 y beta-glucoronidasa (GUS) en diferentes combinaciones, y se cultivaron en medio SD estándar sin suplementación con L-DOPA. La expresión combinada de BvDODA1 y CYP76AD1 dio como resultado una pigmentación rojo púrpura de los medios de cultivo, mientras que la expresión de BvDODA1 junto con CYP76AD6 dio lugar a la formación de una pigmentación amarilla, lo que indica la diferencia en la actividad catalítica entre CYP76AD1 y CYP76AD6. La expresión de BvDODA1 con ambos citocromos P450S dio como resultado una pigmentación rojo-anaranjada del medio. No se observó pigmentación cuando cada uno de los citocromos P450s o BvDODA1 se expresó solo.

Figura 8B: El alineamiento de secuencias múltiples de secuencias de proteínas similares a CYP76AD1 de plantas Caryophyllales productoras de betalaina se procesó en un árbol filogenético de máxima probabilidad, lo que dio como resultado la formación de dos clados separados, previamente denominados clados alfa y beta (Brockington y otros, 2015). CYP76AD6 se encuentra en el clado β , mientras que CYP76AD1 se ubica en el clado α . En el clado CYP76AD1- β : *B. vulgaris*, *Beta vulgaris* (CYP76AD6; Núm de acceso a GenBank KT962274; SEQ ID NO: 30); *Bv. maritima*, *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (acceso AKI33834.1; SEQ ID NO: 10); *F. latifolia*, *Froelichia latifolia* (acceso AKI33838.1; SEQ ID NO: 11); *A. caracasana*, *Alternanthera caracasana* (acceso AKI33835.1; SEQ ID NO: 12); *A. ficoidea*, *Alternanthera ficoidea* (acceso AKI33831.1; SEQ ID NO: 13). En el clado CYP76AD1- α : *B. vulgaris*, *Beta vulgaris* (CYP76AD1; acceso AET43289.1; SEQ ID NO: 14); *A. cruentus*, *Amaranthus cruentus* (CYP76AD2; acceso AET43291.1; SEQ ID NO: 15); *M. jalapa*, *Mirabilis jalapa* (CYP76AD3; acceso AET43292.1; SEQ ID NO: 16); *C. cristata*, *Celosia cristata* (CYP76AD4; acceso AGI78466.1; SEQ ID NO: 17).

Figura 8C: El análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) de medios de levadura pigmentados reveló la aparición del cromóforo ácido betalámico cuando CYP76AD1, CYP76AD6 o ambos se expresaron con BvDODA1, además de varias betaxantinas, lo que incluye glutamina-betaxantina y valinabetaxantina (Tabla 2; no se muestra en el cromatograma). La aparición de las betacianinas betanidina e isobetanidina se observó solo donde se expresó CYP76AD1. No se encontraron picos correspondientes a compuestos de betalaina donde no se expresó BvDODA1. Los ejes Y (intensidad máxima) de los seis cromatogramas están enlazados. XIC, cromatogramas de iones extraídos de masas correspondientes al ácido betalámico [M + H = 212,05] e isómeros de betanidina [M + H = 389,10]. Tiempo, tiempo de retención (min).

Figura 9. El alineamiento de las secuencias de proteínas de CYP76AD1 (SEQ ID NO: 14) y CYP76AD6 (SEQ ID NO: 18) muestra una identidad del 72 por ciento entre ellas.

Figura 10. Esquema del vector de sobreexpresión pX11 (SEQ ID NO: 19). KanR, gen nptII que confiere resistencia a la kanamicina; DODA1, DOPA 4,5-dioxigenasa de *B. vulgaris*; CYP76AD1, citocromo P450 de *B. vulgaris*; cDOPA5GT, ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa*; nos, promotor/terminador de nopalina sintasa; 35S, promotor/terminador 35S de CaMV; Act2, terminador de actina 2 de Arabidopsis; Ub10, promotor de ubiquitina 10 de Arabidopsis;

Figuras 11A-11B. Producción de betalainas en múltiples especies vegetales naturalmente no productoras.

Figura 11A: La transformación mediada por agrobacterias del vector pX11, que sobreexpresa el citocromo P450 CYP76AD1, DOPA 4,5-dioxigenasa (BvDODA1) y ciclo-dopa 5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT), provoca el desarrollo de callos o brotes de color rojo púrpura en una variedad de especies vegetales de solanáceas, observadas típicamente dentro de 1-2 semanas de cultivo en cultivo de tejidos: *Solanum lycopersicum* (tomate),

Solanum tuberosum (papa), *Solanum melongena* (berenjena), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Nicotiana glauca* (tabaco de árbol), *Solanum nigrum* (Hierba mora negra europea), *Petunia x hybrida* (Petunia), *Nicotiana benthamiana*.
Figuras 11B1-11B2: Los callos de *Nicotiana glauca* (Figura 11B1) y *Nicotiana benthamiana* (Figura 11B2) se muestrearon y analizaron con cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), lo que permitió la identificación de las betacianinas betanina e isobetanina en ambas especies, además de un nuevo compuesto de betacianina no identificado, que se encuentra solo en el tejido de *N. glauca* (betacianina III; Tabla 2). XIC, cromatogramas de iones extraídos de masas correspondientes a la nueva betacianina [M + H = 593,10] e isómeros de betanina [M + H = 551,10]. Tiempo, tiempo de retención (min).

Figuras 12A-12C. Identificación y cuantificación de betacianina en especies manipuladas por ingeniería genética y productoras naturalmente.

Figura 12A: El análisis por LC-MS de las hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con el vector pX11 permitieron la identificación de la betanina, que exhibe la misma masa precisa, tiempo de retención, patrones de fragmentación y espectros de absorción UV-VIS que la betanina de extracto de hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*).

Figura 12B: La agroinfiltración de agrobacterias que albergan el vector pX11 en hojas de *N. benthamiana* da lugar a una pigmentación roja intensa en el área infiltrada, que se observa típicamente en 2-3 días.

Figura 12C: El contenido de betacianina de *N. benthamiana* agroinfiltrada con pX11 y *Nicotiana tabacum* transformada con pX11 se evaluó en comparación con varias especies productoras de betalaina. El contenido de betacianina se evaluó espectrofotométricamente mediante mediciones de la absorción de luz a 535 nm y 600 nm. Los valores indican la media $\pm$ SE de la media de cuatro réplicas biológicas, cada una de las cuales consiste de 100 mg de tejido (peso fresco).

Figuras 13A-13E. Fenotipos de pigmentación observados en plantas de tabaco transgénicas manipuladas por ingeniería genética para la producción de betalaina. Tres genes de la vía de la betalaina, específicamente, CYP76AD1, BvDODA1 y cDOPA5GT (en el vector binario pX11) se expresaron heterológicamente en *Nicotiana tabacum*, lo que dio como resultado pigmentación roja en diferentes órganos de la planta, lo que incluye hojas, tallos, raíces y flores. Figura 13A: Izquierda, tabaco de tipo silvestre; derecha, tabaco transformado con pX11. Figura 13B: Fila superior, flor de tabaco de tipo silvestre; fila inferior, flor con pX11. La acumulación de pigmento también fue evidente en las raíces con pX11 (Figura 13C), sección de la epidermis del tallo, con aumento x20 (Figura 13D) y tricomas glandulares de la hoja, con aumento x20 (Figura 13E).

Figuras 14A-14B. Producción de betalaina en cultivos alimentarios de tomate, papa y berenjena.

Figura 14A: La transformación del vector pX11 da como resultado la formación de plantas pigmentadas de rojo en papa (*Solanum tuberosum* var. Désirée, paneles superiores izquierdos), berenjena (*Solanum melongena* línea DR2, paneles inferiores izquierdos) y tomate (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom, paneles derechos).

Figura 14B: La betanina y la isobetanina se identificaron como las principales betacianinas en tubérculos de papa, frutos de tomate y frutos de berenjena por análisis de LC-MS. Se muestra el cromatograma de iones extraídos (XIC) de la masa correspondiente a betanina/isobetanina [M+H=551,1] y la absorción UV-VIS del pico de betanina para los tres tejidos.

Figura 15. Esquema de los vectores de sobreexpresión pX11 (SEQ ID NO: 19), pX11(E8) (SEQ ID NO: 20), pX11(CHS) (SEQ ID NO: 21), pX12 (SEQ ID NO: 22) y pX13 (SEQ ID NO: 23). KanR, gen nptII que confiere resistencia a la kanamicina; DODA1, DOPA 4,5-dioxigenasa de *B. vulgaris*; CYP76AD1/CYP76AD6, citocromo P450 de *B. vulgaris*; cDOPA5GT, ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa*; nos, promotor/terminador de nopalina sintasa; 35S, promotor/terminador 35S de CaMV; Act2, terminador de actina 2 de Arabidopsis; Ub10, promotor de ubiquitina 10 de Arabidopsis; E8, promotor de *S. lycopersicum* E8; CHS, promotor de la calcona sintasa de *Petunia x hybrida*.

Figuras 16A-16B. Acumulación de betalainas específicas de frutas en tomate.

Figura 16A: La introducción del vector pX11(E8) en tomate (*Solanum lycopersicum* var. M-82) da como resultado una pigmentación de betalaina que se restringe a la maduración y la fruta madura.

Figura 16B: Fruta entera y sección transversal de fruta de tomate de tipo silvestre y pX11(E8).

Figuras 17A-17B. La variación de color en las flores de tabaco transgénico que produce betalaina se determina al variar las relaciones de betacianina/betaxantina.

Figura 17A: La introducción de los vectores pX11, pX12 o pX13 en el tabaco da como resultado la formación de flores de diferentes colores. Visto desde arriba (fila superior) o aumentado y visto bajo un campo brillante (fila central) o luz azul (fila inferior), en el que las betaxantinas son típicamente fluorescentes.

Figura 17B: Análisis por LC-MS de pétalos de tabaco pX11, pX12 y pX13. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) de masas [M+H= 309,1, 331,1, 340,1, 551,1], correspondientes respectivamente a prolina-betaxantina, tiramina-betaxantina, glutamina-betaxantina y betanina/isobetanina. Los ejes verticales están enlazados.

Figuras 18A-18B. Producción de betalainas en células BY2 de tabaco.

Figura 18A: La introducción de pX11 o pX13 en células de la línea BY2 de tabaco da como resultado una pigmentación rojo-púrpura o amarilla-anaranjada, respectivamente.

Figura 18B: Análisis por LC-MS de células BY2 pX11 y pX13. Cromatogramas de iones extraídos (XIC) de masas [M+H= 283,1, 340,1, 551,1], correspondientes respectivamente a alanina-betaxantina, glutamina-betaxantina y betanina/isobetanina. Los ejes verticales están enlazados.

Figura 19. Esquema de los vectores de sobreexpresión de pDOPA1-pDOPA4 (SEQ ID NO: 24-27). nptII, gen que confiere resistencia a la kanamicina neomicina fosfotransferasa II; CYP76AD6, citocromo P450 de *B. vulgaris*; AroG, mutante AroG175 (DAHPS) de *E. coli*; AAH, hidroxilasa de aminoácidos aromáticos de *Physcomitrella patens*; 35S, promotor/terminador 35S de CaMV; Ub10, promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum*.

Figuras 20A-20C. Producción de L-DOPA en plantas de tabaco y células BY2. Figura 20A: Identificación de L-DOPA en extractos de hojas de plantas de tabaco que expresan pDOPA1 y pDOPA3 por análisis LC-MS. Figura 20B: La expresión de pDOPA2 y pDOPA4 en células BY2 provoca el ennegrecimiento de los callos en diversos grados, después de varias semanas de cultivo. Figura 20C: Cuantificación relativa de L-DOPA en células BY2 pDOPA2, pDOPA4 y de tipo silvestre por análisis LC-MS.

Figuras 21A-21B. Ensayos de germinación de semillas de tabaco productor de betalaína en condiciones de estrés osmótico y de salinidad. Figura 21A: Se fotografiaron plántulas de tabaco de tipo silvestre y pX11 cultivadas en condiciones de estrés por alta salinidad (NaCl 150 mM) y condiciones de control (MS) y se puntuaron las tasas de germinación de las semillas. Figura 21B: Se fotografiaron plántulas de tabaco de tipo silvestre y pX11 cultivadas en condiciones de estrés osmótico (manitol 400 mM) y condiciones de control (MS) y se puntuaron las tasas de germinación de las semillas.

Figuras 22A-22C. Ensayos de resistencia a *Botrytis cinerea* de plantas de tabaco productoras de betalaína. Figura 22A: Se infectaron hojas de plantas de tabaco de tipo silvestre y pX11 con gotitas de suspensión de *B. cinerea* y se fotografiaron 5 días después de la infección. Figura 22B: Plantas de tipo silvestre y pX11 infectadas con un total de aproximadamente 500 esporas de *B. cinerea* por planta se puntuaron según el tamaño de la lesión. Se muestran áreas de lesión promedio de aproximadamente 30 plantas por genotipo. Figura 22C: Las hojas infectadas de las plantas de tabaco de tipo silvestre mostraron mayores signos de necrosis en comparación con las hojas de las plantas pX11.

Figuras 23A-23D. La expresión recombinante de CYP76AD15 en *Nicotiana benthamiana* permite la producción de betaxantina y L-DOPA. Figura 23A: La coinfiltración de agrobacterias que albergan plásmidos para la expresión de CYP76AD15 y BvDODAL en hojas de *Nicotiana benthamiana* provocan una pigmentación amarilla en el área infiltrada. Figura 23B: El análisis por LC-MS del tejido pigmentado de amarillo muestra la aparición de varias betaxantinas, lo que incluye la dopamina-betaxantina [M+H=347,1] y la valina-betaxantina [M+H=311,1]. XIC, cromatograma de iones extraídos. Figura 23C: Absorción UV-VIS de picos que representan dopamina-betaxantina y valina-betaxantina en el tejido analizado. Figura 23D: Espectros de masas del pico de L-DOPA identificado en tejido foliar de *N. benthamiana* que expresan CYP76AD15 muestra fragmentos [M+H=181,05, 152,07] e ion molecular [M+H=198,07] típicos de L-DOPA.

Descripción detallada de la presente invención

En la siguiente descripción detallada se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una mejor comprensión de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención puede practicarse sin estos detalles específicos. En otros casos los métodos, procedimientos y componentes bien conocidos no se describen en detalle para no oscurecer la presente invención.

En una modalidad, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una enzima que cataliza la primera etapa en la síntesis de betalaína en Caryophyllales y usos de la enzima en ingeniería genética de plantas y para la producción de L-DOPA a partir de tirosina. En general, las tirosinasas son oxigenasas con promiscuidad de sustrato que exhiben una actividad de catecol oxidasa no deseada. Un estudio anterior demostró que el citocromo P450 CYP76AD1 de la planta exhibía esta promiscuidad característica y, a pesar de una estrategia de tamizaje para identificar mutaciones que aumentaban la especificidad y la actividad por el sustrato de la enzima, todavía producía productos secundarios no deseados (DeLoache y otros, 2015; Nat Chem Biol. Julio 2015;11(7):465-71). Por lo tanto, no se esperaba que un citocromo P450 de una planta diferente fuera específico de la tirosina y catalizara solo la reacción a L-DOPA, lo que evita de esta manera la acumulación de productos finales no deseados.

CYP76AD6

La presente invención proporciona un gen novedoso (perteneciente a la familia de genes del citocromo P450) que cataliza la hidroxilación de la tirosina para formar L-DOPA. Esta enzima tiene potencialmente una ventaja significativa sobre la enzima tirosinasa que se usa actualmente para la producción de L-DOPA; mientras que la tirosinasa cataliza la formación de L-DOPA a partir de tirosina e inmediatamente la oxida al metabolito no utilizable dopaquinona, la nueva enzima P450 solo cataliza la formación de L-DOPA sin su oxidación. Por lo tanto, esta enzima P450 puede usarse para un método más eficiente para la producción de L-DOPA que el uso de una enzima tirosinasa.

Por tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona una enzima novedosa que puede usarse para la producción biosintética de L-DOPA, un fármaco usado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y un precursor para los fármacos de importancia económica de alcaloides de bencilisoquinolina (por ejemplo, morfina). Esta enzima puede usarse potencialmente para la producción comercial de L-DOPA de varias formas; su gen

codificante puede expresarse en plantas o microorganismos para inducir la producción de L-DOPA *in vivo*, o, alternativamente, puede expresarse de forma recombinante y usarse para la catálisis enzimática *in vitro*.

Métodos para la producción de L-DOPA y betalaína

Producción a partir de proteínas

En una modalidad, los métodos de la presente invención se realizan *in vitro*, de manera que la tirosina y las enzimas necesarias para producir L-DOPA o betalaínas se proporcionan *in vitro*.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir L-DOPA a partir de tirosina que comprende la etapa de combinar una proteína del clado CYP76AD1- β y tirosina en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir L-DOPA a partir de tirosina que comprende la etapa de combinar CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones y tirosina en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir L-DOPA a partir de tirosina *in vitro* que comprende la etapa de combinar CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones y tirosina en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD1 o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas. En una modalidad, el método comprende además la etapa de poner en contacto la tirosina y CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, o una de sus combinaciones con una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD).

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con una proteína del clado CYP76AD1- β y una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, CYP76AD1, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, CYP76AD1, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una mezcla de betalaínas que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en condiciones suficientes para producir una combinación de betacianina y betaxantina, lo que produce de esta manera una mezcla de betalaínas.

En una modalidad, la producción de betalaína descrita en la presente invención se realiza sin proveer L-DOPA, lo que nunca antes se había logrado. En una modalidad, las betalaínas comprenden betacianina y betaxantina. En una modalidad, pueden usarse las betalaínas, la betacianina y la betaxantina como colorantes alimentarios u otros colorantes.

En una modalidad, las betacianinas producen un color rojo púrpura. En una modalidad, las betaxantinas producen un color amarillo. En una modalidad, una combinación de betacianina y betaxantina produce un color naranja. En una modalidad, una combinación de betacianina y betaxantina produce un color anaranjado-rosa.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante naranja que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en condiciones suficientes para producir una combinación de betacianina y betaxantina, lo que produce de esta manera un colorante naranja.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betaxantinas a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera betaxantinas.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante amarillo que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones y una enzima

DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera un colorante amarillo. En una modalidad, dicho colorante amarillo es un colorante alimentario.

En una modalidad, los métodos de la presente invención producen una o más betaxantinas. En una modalidad, la betaxantina comprende vulgaxantina I (glutamina-betaxantina). En otra modalidad, la betaxantina comprende indicaxantina (prolina-betaxantina). En otra modalidad, la betaxantina comprende dopaxantina-hexósido. En otra modalidad, la betaxantina comprende betaxantina I (desconocida), como se describe en la Tabla 2 en la presente descripción más abajo. En otra modalidad, la betaxantina comprende histamina-betaxantina. En otra modalidad, la betaxantina comprende alanina-betaxantina. En otra modalidad, la betaxantina comprende dopamina-betaxantina. En otra modalidad, la betaxantina comprende valina-betaxantina.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betacianinas a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD1, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera betacianinas.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante rojo púrpura que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD1, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera un colorante rojo púrpura. En una modalidad, dicho colorante rojo púrpura es un colorante alimentario.

En una modalidad, el método como se describe en la presente descripción proporciona una betalaína glicosilada (betanina) en lugar de una aglicona (betanidina). En una modalidad, existe una ventaja sustancial en que la betanina es más estable que la betanidina. La betanidina es un compuesto altamente lábil y debe añadirse ácido ascórbico para evitar su degradación. La betanidina es mucho más susceptible a la degradación oxidativa tanto enzimática como no enzimática. El extracto de betalaína usado para la coloración de alimentos comprende betanina. La betanidina no sería utilizable para la coloración de alimentos debido a su inestabilidad.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención producen una o más betacianinas. En una modalidad, las betacianinas comprenden betanina. En otra modalidad, las betacianinas comprenden isobetanina. En otra modalidad, las betacianinas comprenden betacianina I (desconocida) o betacianina II (desconocida), como se describe en la Tabla 2 en la presente descripción más abajo. En otra modalidad, los métodos de la presente invención producen uno o más fragmentos de betacianina, donde, en una modalidad, el fragmento de betacianina es betanidina.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un pigmento o colorante que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, y una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, CYP76AD1, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas, lo que produce de esta manera un pigmento o colorante.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar los niveles de una o más betalaínas en un organismo, planta o en una parte de una planta que comprende provocar o permitir la expresión de una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína y CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, o una de sus combinaciones, dentro de dicho organismo, planta o parte de la planta, lo que aumenta de esta manera los niveles de una o más betalaínas en dicho organismo, planta o parte de la planta. En una modalidad, dicha planta es una planta ornamental. En otra modalidad, dicha planta es un cultivo alimentario. En una modalidad, el organismo o la planta no produce naturalmente niveles detectables de betalaínas.

Producción a partir de ácidos nucleicos

En otra modalidad, los métodos de la presente invención se realizan *in vivo*. En una modalidad, la tirosina es endógena a la célula. En otra modalidad, la tirosina se proporciona a la célula. En otra modalidad, la célula se transforma con un gen que potencia la disponibilidad de tirosina. En una modalidad, el gen es *AroG175* (Tzin y otros, 2012 New Phytologist 194: 430-439; Núm. de acceso a Genbank JC233128.1, SEQ ID NO: 28), hidroxilasa de aminoácidos aromáticos (AAH) (Pribat y otros, 2010 Plant Cell 22: 3410-3422; Núm. de acceso a Genbank HQ003815.1, SEQ ID NO: 29), o una de sus combinaciones. En una modalidad, las enzimas necesarias para producir betalaínas se proporcionan a una célula mediante la transferencia de un polinucleótido que codifica las enzimas.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de L-DOPA que comprende la etapa de poner en contacto un organismo con un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1-β en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de L-DOPA que comprende la etapa de poner en contacto un organismo con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de L-DOPA que comprende la etapa de poner en contacto un organismo con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En una modalidad, el organismo es una planta. En una modalidad, la planta es una planta de tabaco.

10 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína que comprende la etapa de poner en contacto un organismo con un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β , un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- α , o una de sus combinaciones, en condiciones suficiente para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas.

15 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína que comprende la etapa de poner en contacto un organismo con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas.

20 En una modalidad, el método comprende además la etapa de poner en contacto el organismo que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD).

25 En una modalidad, los genes que codifican el ácido nucleico descrito en la presente invención, lo que incluye, entre otros, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, y DOD están presentes juntos en un solo polinucleótido recombinante, como se describe con más detalle en la presente descripción más abajo.

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína que comprende la etapa de poner en contacto un organismo con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas.

35 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante naranja que comprende la etapa de poner en contacto un organismo que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera colorante naranja.

40 En otra modalidad, la producción de betalaína descrita en la presente invención se realiza sin alimentación de sustrato.

45 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betaxantinas que comprende la etapa de poner en contacto un organismo que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera betaxantinas.

50 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante amarillo que comprende la etapa de poner en contacto un organismo que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera un colorante amarillo.

55 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betacianinas que comprende la etapa de poner en contacto un organismo que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera betacianinas. En una modalidad, el método para producir betacianinas es un método para producir predominantemente betacianinas.

60 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante rojo púrpura que comprende la etapa de poner en contacto un organismo que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que

codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera un colorante rojo púrpura.

5 En una modalidad, los métodos descritos anteriormente en la presente descripción proporcionan métodos para producir un colorante rojo púrpura natural. En otra modalidad, los métodos descritos anteriormente en la presente descripción proporcionan métodos para producir un colorante amarillo natural. En otra modalidad, los métodos descritos anteriormente en la presente descripción proporcionan métodos para producir un colorante naranja natural. En una modalidad, los colorantes pueden usarse para textiles.

10 En una modalidad, el organismo es una planta. En otra modalidad, el organismo es levadura. En otra modalidad, el organismo es una bacteria. En otra modalidad, el organismo es un alga.

15 En una modalidad, los métodos de la presente invención se llevan a cabo *in planta*. En una modalidad, el color del pigmento en la planta depende de otros pigmentos naturales o manipulados por ingeniería genética expresados en la planta. De esta forma, en una modalidad, el método de la presente invención produce un pigmento rojo, un pigmento amarillo, un pigmento naranja, un pigmento marrón y similares, o cualquiera de los colores de pigmentos que se conocen en la técnica.

20 También debe entenderse que al variar la proporción de CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y/o la expresión de CYP76AD1, también es posible cambiar el color del pigmento.

25 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método de producción de betalaína a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas.

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante naranja que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera un colorante naranja.

35 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betaxantinas a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera betaxantinas.

40 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante amarillo que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera un colorante amarillo.

45 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betacianinas a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera betacianinas.

50 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un colorante rojo púrpura que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera un colorante rojo púrpura.

55 En una modalidad, un colorante de la presente invención es un colorante alimentario. En una modalidad, los métodos de la presente invención para producir colorantes pueden aplicarse para producir pigmentos y similares.

60 En una modalidad, la presente invención proporciona un tinte, colorante o pigmento alimentario producido mediante los métodos de la presente invención o que comprende las composiciones de la presente invención.

65 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir L-DOPA en una célula que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir L-DOPA, lo que produce de esta manera L-DOPA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betalaínas, un colorante naranja o una de sus combinaciones en una célula que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas, un colorante naranja o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betaxantinas, un colorante amarillo o una de sus combinaciones en una célula que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en condiciones suficientes para producir betaxantinas, lo que produce de esta manera betaxantinas, un colorante amarillo o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir betacianinas, un colorante rojo púrpura o una de sus combinaciones en una célula que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en condiciones suficientes para producir betacianinas, lo que produce de esta manera betacianinas, un colorante rojo púrpura o una de sus combinaciones.

En una modalidad, la célula descrita anteriormente en la presente descripción forma parte de una línea celular.

En una modalidad, las betalaínas obtenidas mediante los métodos de la presente invención, lo que incluye betaxantinas, betacianinas o una de sus combinaciones, se producen en una línea celular. En una modalidad, la línea celular es una línea celular vegetal. En una modalidad, la línea celular vegetal es BY2 de tabaco o T87 de *arabidopsis*.

En otra modalidad, la L-DOPA obtenida mediante los métodos de la presente invención se produce en una línea celular. En una modalidad, la línea celular es una línea celular de tabaco. En una modalidad, la línea celular de tabaco es BY2.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un metabolito de L-DOPA que comprende la etapa de producir L-DOPA al poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir L-DOPA, y permitir la formación del metabolito de L-DOPA o poner en contacto adicionalmente dicha célula con un ácido nucleico que codifica una enzima que metaboliza L-DOPA, lo que produce de esta manera un metabolito de L-DOPA. En una modalidad, el metabolito de L-DOPA es una catecolamina, un alcaloide de bencilisoquinolina, betalaína, melanina o una de sus combinaciones. En una modalidad, la catecolamina es dopamina, norepinefrina o una de sus combinaciones. En una modalidad, el alcaloide de bencilisoquinolina es un opiáceo, que en una modalidad es morfina.

En una modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es una DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD). En otra modalidad, la enzima es CYP76AD1. En otra modalidad, la enzima es una glucosiltransferasa. En una modalidad, la glucosiltransferasa es ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa o betanidin-5-O-glucosiltransferasa. En una modalidad, la ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa es gen ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa* (cDOPA5GT).

En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la DOPA descarboxilasa. En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la dopamina beta-hidroxilasa. En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos. En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la catecol-O-metil transferasa. En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la feniletanolamina N-metiltransferasa.

En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la norcoclaurina sintetasa (NCS). En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT). En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la coclaurina-N-metiltransferasa (CNMT). En otra modalidad, la enzima que metaboliza la L-DOPA es la 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina 4'-O-metiltransferasa (4'OMT).

Métodos de transformación genética

En una modalidad, la presente invención proporciona métodos que comprenden la etapa de "poner en contacto" una célula con un polinucleótido o vector de expresión como se describe en la presente descripción.

En una modalidad, poner en contacto comprende transformar una célula con la molécula de ácido nucleico o constructo de la invención. Los métodos para transformar una célula vegetal con secuencias de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica. Como se usa en la presente, el término "transformación" o "transformar" puede referirse a un proceso mediante el cual un ADN extraño, tal como un constructo de ADN, lo que incluye un vector de expresión, ingresa y cambia una célula receptora en una célula transformada, manipulada por ingeniería genética o

transgénica. La transformación puede ser estable, en donde la secuencia de ácido nucleico se integra en el genoma de la planta y, como tal, representa un rasgo estable y heredado, o transitoria, en donde la secuencia de ácido nucleico se expresa en la célula transformada pero no se integra en el genoma, y como tal representa un rasgo transitorio.

En una modalidad, la presente invención proporciona una planta transgénica. En una modalidad, una planta transgénica de la presente invención se modifica genéticamente con genes extraños o heterólogos. En una modalidad, las plantas transgénicas de la presente invención se usan para biocombustible. En otra modalidad, las plantas transgénicas de la presente invención son plantas de cultivos alimentarios.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una planta cisgénica. En una modalidad, una planta cisgénica de la presente invención es genéticamente modificada, pero no contiene genes extraños o heterólogos. De acuerdo con este aspecto y en una modalidad, las enzimas de betalaínas pueden sobreexpresarse en plantas que ya comprenden enzimas de betalaínas, lo que cambia de esta manera la relación entre betacianinas y betaxantinas. En una modalidad, los cultivos alimentarios de la presente invención son cisgénicos.

Puede usarse cualquier método o sistema de suministro para el suministro y/o transformación (células vegetales)/transfección (células de algas) de los vectores de ácido nucleico que codifican CYP76AD6 y homólogos, parálogos, etc. en la célula huésped, por ejemplo, protoplasto vegetal. Los vectores pueden suministrarse a la célula huésped solos o en combinación con otros agentes. También pueden usarse sistemas de expresión transitoria. También puede usarse la recombinación homóloga.

En una modalidad, los polinucleótidos descritos en la presente descripción se proporcionan a una célula de la presente invención mediante transformación. La transformación puede lograrse por una amplia variedad de medios, como se conoce por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, transformación mediada por bombardeo de partículas (por ejemplo, Finer y otros, 1999, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 240:59), electroporación de protoplastos (por ejemplo, Bates, 1999, Methods Mol. Biol., 111:359), infección viral (por ejemplo, Porta y Lomonosoff, 1996, Mol. Biotechnol. 5:209), microinyección e inyección de liposomas. Otros sistemas de suministro ilustrativos que pueden usarse para facilitar la captación por una célula del ácido nucleico incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos del transporte intracelular, composiciones para microinyección y composiciones para recombinación homóloga (por ejemplo, para integrar un gen en una ubicación preseleccionada dentro del cromosoma de la célula). Los métodos alternativos pueden implicar, por ejemplo, el uso de liposomas, electroporación o productos químicos que aumentan la captación de ADN libre (o "desnudo"), la transformación mediante el uso de virus o polen y el uso de microproyección. Las técnicas estándar de biología molecular son comunes en la técnica (por ejemplo, Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

Transformación de plantas

Existen diversos métodos para introducir genes extraños tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas (Ver Potrykus I 1991. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42, 205-225; Shimamoto K. y otros, 1989. Nature 338, 274-276). Los métodos de transformación pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, el uso de liposomas, electroporación, productos químicos que aumentan la captación de ADN libre, inyección de ADN directamente en la planta, bombardeo con pistola de partículas, transformación mediante el uso de virus y microproyección.

En una modalidad, los polinucleótidos descritos en la presente descripción se proporcionan a una célula mediante agroinfiltración, en una modalidad, mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (por ejemplo, Komari y otros, 1998, Curr. Opin. Plant Biol., 1:161), lo que incluye la transformación por inmersión floral. En una modalidad, la agroinfiltración induce la expresión transitoria de genes en una planta para producir una proteína deseada, mediante la inyección de una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el gen o genes deseados en una hoja de planta. En una modalidad, la transformación puede realizarse por transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*. El sistema mediado por *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían en dependencia de la especie vegetal y del sistema de suministro de *Agrobacterium*. La transformación puede realizarse con cualquier explante de tejido adecuado que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de la planta completa (Ver Horsch y otros, 1988. Plant Molecular Biology Manual A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht).

Los métodos de transformación de plantas se describen completamente en las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos US 20110209247; US 20110113514; US 20100199371; US 20070079396; US 20080307541; US 20030028913; y US 20030196219; y las patentes de Estados Unidos US 5,015,580; US 5,550,318; US 5,538,880; US 6,160,208; US 6,399,861; US 6,403,865; US 5,635,055; US 5,824,877; US 5,591,616; US 5,981,840 y US 6,384,301.

Para el sistema de transformación de plantas basado en *Agrobacterium tumefaciens*, los elementos adicionales presentes en los constructos de transformación incluirán, en una modalidad, secuencias de los bordes izquierdo y derecho de ADN-T para facilitar la incorporación del polinucleótido recombinante en el genoma de la planta.

En una modalidad, la transformación puede realizarse mediante una captación directa de ADN. Existen diversos métodos de transferencia directa de ADN a las células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un fuerte campo eléctrico, lo que abre miniporos para permitir la entrada del ADN. En la microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente directamente en las células mediante el uso de micropipetas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles, tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente hacia las células o los tejidos vegetales.

En otra modalidad, los polinucleótidos descritos en la presente descripción se proporcionan a una célula mediante transformación viral (transducción) mediante el uso de un virus vegetal adecuado, mediante el uso de técnicas de pistola de genes o electroporación.

En una modalidad, los genes heterólogos del polinucleótido de la presente invención se integran en el cromosoma de la planta. En otra modalidad, los genes heterólogos del polinucleótido de la presente invención permanecen extracromosómicos. En una modalidad, los genes heterólogos están en un plásmido dentro de la célula. Los plásmidos útiles para cualquier de las aplicaciones se conocen por el experto en la técnica.

En una modalidad, el ADN se inserta aleatoriamente, es decir, en una ubicación no específica, en el genoma de una línea vegetal objetivo. En otra modalidad, la inserción de ADN tiene se dirige para lograr la integración específica del sitio, por ejemplo, para reemplazar un gen existente en el genoma, para usar un promotor existente en el genoma de la planta, o para insertar un polinucleótido recombinante en un sitio predeterminado que se conoce que es activo para la expresión génica. Existen varios sistemas de recombinación específicos de sitio que se conoce que funcionan en plantas, lo que incluye cre-lox y FLP-FRT.

En una modalidad, los métodos de transformación de esta invención se practican en cultivo de tejidos en medios y en un entorno controlado. "Medios" se refiere a las numerosas mezclas de nutrientes que se usan para hacer crecer las células *in vitro*, es decir, fuera del organismo vivo intacto. Los objetivos en las células receptoras incluyen, pero no se limitan a, células meristemáticas, callos, embriones inmaduros y células gaméticas tales como microsporas, polen, espermatozoides y óvulos. Se contempla que cualquier célula a partir de la cual pueda regenerarse una planta fértil sea útil como una célula receptora. El callo puede iniciarse a partir de fuentes de tejido, lo que incluye, pero no se limita a, embriones inmaduros, meristemos apicales de plántulas, microsporas y similares. Las células capaces de proliferar como callos también son células receptoras para la transformación genética. Se conocen en la técnica métodos y materiales de transformación prácticos para producir plantas genéticamente modificadas de esta invención, por ejemplo, diversos medios y células objetivo receptoras, transformación de embriones inmaduros y posterior regeneración de plantas genéticamente modificadas fértiles.

En otra modalidad en la que se introducen polinucleótidos en células vegetales, las betalaínas pueden expresarse o detectarse en cualquier órgano vegetal, lo que incluye hojas, tallos, raíces, flores, semillas, tubérculos o frutos, o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención pueden realizarse en una planta completa, de manera que la planta completa exprese las betalaínas como se describe en la presente descripción. Además y en una modalidad, las composiciones de la presente invención pueden describir una planta completa que se ha modificado genéticamente para expresar un polinucleótido o polipéptido de la presente invención.

Transformación de algas

En una modalidad, el método de transformación de algas comprende cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente descripción. En una modalidad, la transformación de algas se logra mediante el uso de transformación asistida por perlas de vidrio, transformación mediada por pistola de partículas (biolística), tratamiento con enzimas celulolíticas para debilitar sus paredes celulares o recombinación homóloga.

En otro aspecto, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden transformarse en algas. En una modalidad, el alga es un alga unicelular. En otra modalidad, el alga es un alga multicelular. En una modalidad, el alga es una cianobacteria, diatomea, clamidomona, dunaliella o hematococcus. Los genes pueden sobreexpresarse en algas. La betalaína, la DOPA o una de sus combinaciones pueden producirse a través de dichas algas transgénicas. Los métodos para la transformación de algas se conocen bien en la técnica y se describen completamente en las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos US 20150011008; US 20150004704; US 20130130389; US 20120094385; US 20120034698; US 20110300633; y US 20040133937.

En una modalidad, las algas genéticamente modificadas de la presente invención pueden usarse en la producción de biocombustibles.

Transformación de levaduras

En otro aspecto, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden transformarse en levadura. Los genes pueden sobreexpresarse en levadura. La betalaína, la DOPA o una de sus combinaciones pueden producirse a través de dicha levadura transgénica. Los métodos para la transformación de levaduras se describen más abajo en la presente descripción y se conocen bien en la técnica y se describen completamente en las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos US 20090264320; US 20010031724; US 20030049785; US 20050158861; US 20070264716; US 20090325247; y US 20100190223.

Transformación de virus

En otra modalidad, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden transformarse en un virus. En otra modalidad, los ácidos nucleicos pueden sobreexpresarse en un virus. La betalaína, colorantes, pigmentos, DOPA o una de sus combinaciones pueden producirse a través de dicha sobreexpresión viral.

Marcadores de transformación genética

En una modalidad, el ADN se introduce solo en un pequeño porcentaje de células objetivo en cualquier experimento.

En una modalidad, las células que comprenden el ADN exógeno transferido pueden identificarse mediante el color, como se describe en el Ejemplo 6 para la levadura. En una modalidad, las células que expresan CYP76AD1 y DODA son rojo púrpuras. En una modalidad, las células que expresan CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y DODA, son amarillas. En una modalidad, las células que expresan CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y DODA, son anaranjadas o rojo-anaranjadas.

En otra modalidad, se usan genes marcadores para proporcionar un sistema eficiente para la identificación de aquellas células que se transforman de manera estable al recibir e integrar un constructo de ADN genéticamente modificado en sus genomas.

En otra modalidad, los genes de selección proporcionan marcadores selectivos que confieren resistencia a un agente selectivo, tal como un antibiótico o un herbicida. Las células potencialmente transformadas se exponen al agente selectivo. En la población de células supervivientes estarán aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia se ha integrado y expresado a niveles suficientes para permitir la supervivencia celular. Las células pueden analizarse posteriormente para confirmar la integración estable del ADN exógeno.

Los genes marcadores selectivos útiles incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos tales como la kanamicina (nptII), higromicina B (aph IV), nptII, hpt, aadA y gentamicina (aac3 y aacC4) o resistencia a herbicidas tales como glufosinato (bar o pat) y glifosato (EPSPS). En otra modalidad, el gen de selección es un antimetabolito. En una modalidad, el antimetabolito es dhf.

También pueden emplearse marcadores detectables que proporcionan la capacidad de identificar visualmente a los transformantes, por ejemplo, un gen que expresa una proteína coloreada o fluorescente tal como una proteína cat, lacZ, uidA, luciferasa o proteína fluorescente verde (GFP) o un gen que expresa un gen beta-glucuronidasa o uidA (GUS) para el que se conocen diversos sustratos cromogénicos. También se contempla que serán útiles combinaciones de marcadores rastreables y seleccionables para la identificación de células transformadas.

En una modalidad, el gen de selección es un gen marcador seleccionable positivo que está condicionado a agentes no tóxicos que pueden ser sustratos para el crecimiento o que inducen el crecimiento y la diferenciación de los tejidos transformados.

En una modalidad, las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que se han puntuado como positivas en un ensayo de tamizaje, pueden cultivarse en un medio de regeneración y permitirse que maduren a plantas. Las plántulas en desarrollo pueden transferirse a una mezcla de crecimiento de plantas sin suelo y endurecerse, por ejemplo, en una cámara ambientalmente controlada a aproximadamente 85 % de humedad relativa, 600 ppm de CO₂, y 25-250 microeinsteins m⁻² s⁻¹ de luz, antes de transferirlas a un invernadero o cámara de crecimiento para su maduración. Las plantas se maduran preferentemente en una cámara de crecimiento o en un invernadero. Las plantas se regeneran de aproximadamente 6 semanas hasta 10 meses después de que se identifica un transformante, en dependencia del tejido inicial. Durante la regeneración, las células se hacen crecer a plantas en medios sólidos a aproximadamente 19 a 28 °C. Una vez que las plantas en regeneración han alcanzado la etapa del desarrollo de brotes y raíces, pueden transferirse a un invernadero para su posterior crecimiento y pruebas. Las plantas pueden polinizarse mediante el uso de métodos convencionales de cultivo de plantas conocidos por los expertos en la técnica y producirse semillas.

La progenie puede recuperarse a partir de plantas transformadas y analizarse para determinar la expresión del polinucleótido recombinante exógeno. Ensayos útiles incluyen, por ejemplo: ensayos de "biología molecular", tales como transferencia de Southern y Northern y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detección de la presencia de

ARN, por ejemplo, ARN bicatenario, o un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA e/o inmunoelectrotransferencias) o mediante la función enzimática; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces; y además, mediante el análisis del fenotipo de la planta regenerada completa.

- 5 Un experto en la técnica podrá seleccionar un vector apropiado para introducir la secuencia de ácido nucleico codificante en un estado relativamente intacto. Por tanto, cualquier vector que produzca una célula huésped, por ejemplo, un protoplasto vegetal, que porte el ácido nucleico codificante introducido debería ser suficiente. La selección del vector, o si usar un vector, se guía típicamente por el método de transformación seleccionado.

10 Promotores

En otro aspecto, pueden usarse promotores específicos de células, tejidos u órganos para transformar los genes de la invención y hacer que se expresen en una célula, tejido u órgano específico. Por ejemplo, puede usarse un promotor específico de frutas para transformar los genes de la invención en una planta (por ejemplo, tomate) o

15 célula vegetal para producir betalainas en frutas (por ejemplo, frutos de tomate).

En una modalidad, un polinucleótido recombinante de la presente invención comprende al menos un promotor. En una modalidad, un polinucleótido recombinante de la presente invención comprende un único promotor que controla la expresión de los ácidos nucleicos en tándem que están en el mismo marco de lectura. En otra modalidad, cada

20 ácido nucleico en el polinucleótido recombinante de la presente invención está bajo el control de un promotor separado.

En una modalidad, el promotor es un promotor constitutivo. En una modalidad, el promotor constitutivo es el promotor 35S de CaMV. En otra modalidad, el promotor constitutivo es un promotor de opina. En otra modalidad, el

25 promotor constitutivo es un promotor de monocotiledóneas. En otra modalidad, el promotor constitutivo es un promotor de ubiquitina vegetal (Ubi). En otra modalidad, el promotor constitutivo es el promotor de ubiquitina-10 de *Arabidopsis*. En otra modalidad, el promotor constitutivo es el promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum* (SIUb10). En otra modalidad, el promotor constitutivo es el promotor de actina 1 de arroz (Act-1). En otra modalidad, el promotor constitutivo es el promotor de alcohol deshidrogenasa 1 de maíz (Adh-1).

En otra modalidad, el promotor es un promotor inducible. En una modalidad, el promotor inducible es un promotor inducible por galactosa. En otra modalidad, el promotor inducible se selecciona de AlcR/AlcA (inducible por etanol); fusiones GR, GVG y pOp/LhGR (inducible por dexametasona); XVE/OlexA (inducible por beta-estradiol); e inducción por choque térmico. En otra modalidad, el promotor inducible se selecciona de promotores inducibles por tetraciclina, dexametasona, cobre, ácido salicílico y herbicidas. En otra modalidad, pueden usarse mGal4:VP16/UAS o

35 pOp/LhG4 para la transactivación, y pueden usarse los sistemas interruptor de alc, GVE/VGE y XVE para la inducción química. Estos métodos se conocen en la técnica.

En otra modalidad, el promotor es un promotor específico de tejido o específico de etapas del desarrollo. En otra

40 modalidad, el promotor es un promotor sintético, que se produce al reunir los elementos primarios de una región promotora de diversos orígenes.

En algunas modalidades, puede usarse un promotor específico de frutas para transformar los genes de la invención en combinación con uno o más otros genes (por ejemplo, genes de antocianina) en una planta (por ejemplo, tomate)

45 o célula vegetal para producir betalainas en frutas (por ejemplo, frutos de tomate). En una modalidad, los genes de la invención pueden transformarse en una planta transgénica (por ejemplo, una planta de tomate transgénica ya transformada con genes de antocianina recombinante) o una célula vegetal para producir betalainas en frutos (por ejemplo, frutos de tomate).

Por tanto, en una modalidad, un promotor para cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente descripción puede ser un promotor específico de frutas. En una modalidad, el promotor específico de frutas es el promotor E8. En otra modalidad, el promotor puede ser un promotor específico de flores. En una modalidad, el promotor específico de flores es un promotor de calcona sintasa (CHS). En una modalidad, el promotor de CHS es un

50 promotor CHS de *Petunia x hybrida*. En otra modalidad, el promotor puede ser un promotor específico de raíz. En otra modalidad, el promotor puede ser un promotor específico de tallo. En otra modalidad, el promotor puede ser un promotor específico de hojas. En otra modalidad, el promotor puede ser un promotor específico de semillas. En otra modalidad, el promotor puede ser un promotor específico de tubérculo.

En una modalidad, el promotor puede ser específico para una parte del tejido. Por ejemplo y en una modalidad, un

60 promotor puede ser específico del pétalo, estambre, antera, estigma o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, el mismo ácido nucleico puede expresarse bajo el control de diferentes secuencias promotoras no constitutivas para manipular por ingeniería genética un organismo que exhiba dos colores de pigmentación y/o que exprese tanto betacianinas como betaxantinas en diferentes órganos o en diferentes partes del mismo órgano. Por ejemplo, en una modalidad, CYP76AD6 o CYP76AD15 o un homólogo de estos puede expresarse bajo el

65 control de un promotor específico de la flor y CYP76AD1 puede expresarse bajo el control de un promotor específico

de la fruta para que la fruta sea de color rojo-púrpura debido a la presencia de tanto betacianinas como betaxantinas, y la flor es amarilla debido a la presencia de solamente betaxantinas. Además, los promotores inducibles pueden usarse para manipular por ingeniería genética un organismo que exhiba dos colores de pigmentación y/o exprese tanto betacianinas como betaxantinas en diferentes órganos o en diferentes partes del mismo órgano.

En otra modalidad, el promotor puede ser específico de una etapa del desarrollo. Por ejemplo y en una modalidad, un promotor puede ser específico de la Etapa 1, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 1 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 2, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 2 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 3, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 3 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 4, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 4 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 5, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 5-6 cm.

En una modalidad, el promotor puede ser específico para un tejido y una etapa del desarrollo. En una modalidad, el promotor E8 específico de fruta se expresa en maduración y en la fruta madura. En otra modalidad, el promotor de CHS específico de la flor se expresa en los pétalos durante la maduración de la flor.

Aplicaciones del silenciamiento de genes

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar o suprimir un trastorno sensible a la dopamina en un sujeto que comprende la etapa de administrar un cultivo alimentario, una célula o una línea celular que comprende altos niveles de un polipéptido del clado CYP76AD1- β , lo que proporciona de esta manera a dicho sujeto L-DOPA, lo que trata o inhibe de esta manera dicho trastorno sensible a la dopamina en dicho sujeto. En una modalidad, dicho cultivo alimentario, célula o línea celular produce endógenamente betalainas. En una modalidad, se ha suprimido la expresión de DOPA 4,5-dioxigenasa, ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa y un gen del clado CYP76AD1-alfa en dicho cultivo alimentario, célula o línea celular.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir partes de plantas amarillas en una planta que comprende betalainas, que comprende silenciar la expresión del gen CYP76AD1.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir partes de plantas verdes en una planta que comprende betalainas, que comprende silenciar la expresión génica de CYP76AD1 y CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones.

En una modalidad, las partes de la planta comprenden hojas, tallos, raíces, flores, tubérculos, frutos, semillas o una de sus combinaciones.

En una modalidad, el silenciamiento génico es la atenuación de genes, que en una modalidad es una expresión reducida del gen. En una modalidad, se usa el silenciamiento génico inducido por virus para silenciar los genes que codifican CYP76AD1 y/o CYP76AD6. En una modalidad, el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) es una tecnología que explota un mecanismo de defensa antiviral mediado por ARN. En plantas infectadas con virus no modificados, el mecanismo se dirige específicamente contra el genoma viral. Sin embargo, con vectores virales que portan insertos derivados de genes del huésped, el proceso puede dirigirse adicionalmente contra los ARNm correspondientes. Dichos métodos se ejemplifican en la presente descripción más abajo en los Ejemplos 1 y 3.

Otros métodos de silenciamiento génico que pueden usarse en la presente invención incluyen el silenciamiento génico con oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ARN de interferencia, tres regiones principales no traducidas/microARN. Dichos métodos se conocen bien en la técnica así como también se describen en el Ejemplo 1 en la presente descripción más abajo.

En otra modalidad, los genes que codifican CYP76AD1 y/o CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, se inactivan mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

En una modalidad, la planta comprende betalainas, que en una modalidad es una betacianina y en otra modalidad es una betaxantina.

En una modalidad, los métodos de silenciamiento génico se realizan en plantas que comprenden betalainas. En una modalidad, las plantas que comprenden betalainas son del orden de plantas Caryophyllales.

En una modalidad, los métodos de silenciamiento génico se realizan en Caryophyllales que comprende cactus, claveles, amarantos, plantas de hielo, remolachas y muchas plantas carnívoras. En otra modalidad, la planta es del suborden Caryophyllineae. En otra modalidad, la planta es del suborden Polygonineae. En otra modalidad, la planta es de una familia seleccionada de una de las siguientes familias del orden de plantas Caryophyllales: Achatocarpaceae; Aizoaceae; Amaranthaceae; Anacampserotaceae; Ancistrocladaceae; Asteropeiaceae;

Barbeuiaceae; Basellaceae; Cactaceae; Caryophyllaceae; Didiereaceae; Dioncophyllaceae; Droseraceae; Drosophyllaceae; Frankeniaceae; Gisekiaceae; Halophytaceae; Kewaceae; Limeaceae; Lophiocarpaceae; Macarthuraceae; Microteaceae; Molluginaceae; Montiaceae; Nepenthaceae; Nyctaginaceae; Physenaceae; Phytolaccaceae; Plumbaginaceae; Polygonaceae; Portulacaceae; Rhabdodendraceae; Sarcobataceae; Simmondsiaceae; Stegnospermataceae; Talinaceae; y Tamaricaceae.

En algunas modalidades, los polinucleótidos de la presente invención se preparan mediante el uso de técnicas de PCR mediante el uso de procedimientos y métodos conocidos por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el procedimiento implica la ligazón de dos secuencias de ADN diferentes (Ver, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel y otros, John Wiley & Sons, 1992).

Polinucleótidos

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6 comprende:

```
tcgatgtgtttcaagaagagcttgagcctacattctacaacaatatattgttcctctcttgcgcaattaaagccctaaacctgcaattatcttagaatttt
gggtttctaatttattctctcttfaattagctagctcttagattattcatattttccagcattttcaacaatggataacgcaacacttgctgtgatccttt
ccattttgtttgttttaccacattttcaaatcctttttaccaattcttcatctcgtaggttctctctgggtcccaaaccgtgccaaattttggcaacattt
tcgatcttggcgaaaagcctcatcgatcttttgccaatctatctaaaattcacggccctttgattagcctaaagttaggaagtgaacaactattgtgtt
tctcggcctctgtggccgaggaaatgttccttaaaaatgaccaagcacttgctaaccgaaccattctgactcgggttagggctggtgaccacga
caaatatccatgtcgtggttgectgtttcccaaaaatggagaaatatgagaaaaatctccgctgtccaattactctccaacaaaaacttgatgcta
gtcaacctcttagacaagctaaggtgaaacaacttttatcatagctacaagttgtccgaaaaaatgcaaccgctgatattggacggggccgcatt
tacaacgtcacttaatttattatcaaacacatttttctcaatcgaattagcaagtcataatctagtgttcccaagagtttaacaactcatgtggaata
ttatggaggaaaattggaaggcctaattatgctgatttttccctattcttggttacattgatccctttggtataagacgctgttggtggttactttgataa
actcattgatgttttccaagacattattctgtaaagacaaaagcttcgatcttctaattcttccggcgcaaaacaacaaatgacattcttgatactctt
cttaaacctcatgaagataatgagttgagtatgcctgaaatfaatcaccttctcgtggatatctttgacgcccgaacagacacaacagcaagcacat
tagaatgggcatgagccgaacttgtaaaaacccggaatgatgactaaagttcaaattgaaatgaacaagctcttgaaaaagattgcttagac
atacaagaatccgacatctcaaaactaccttatttacaagccattataaaagaaacgttacgtttacaccttctactgtgttttctgcctcgaag
gcagacaatgacgtagagttatatggctacgtttgtacaaagaatgtcgaagtcctgtcaatctttgggcaattggctgatccaaaggtatgga
aaaatccggaagtattttctcctgaaaggttttagattgcaatatcgattataaaggacgagatttcgaacttttaccttttggtgctggtagaaggat
atgccctggacttactttggcatatagaatgttgaaactgatgttggtactcttcttcaaaactacaattggaaactgaagatggatcaatcctaag
gatttagacatggatgagaaatttgggattacattgcaaaaggttaaacctcttcaagttattccagttccagaaactagctagtgggttgccgtt
gtgggctgtgggctgattgtgcacttttgttctcctaattgttgttgcaaaacttctctagaagggtattatctttgtataaataaagcgaaagctacatg
tcctattttaaattagtgatactatattaagtaagtatgagcatatagatccattattgttttgggtgaatcgtattaaactgataaatcaagtaaatgt
ctccaacctaaagcattcaattattctgttagtcataacatatgtagagggttaagtatgaagaatttaaacggcgtgatcatcctta (SEQ ID
NO: 30).
```

En otra modalidad, la secuencia codificante de CYP76AD6 comprende la siguiente secuencia:

atggataacgcaacacttgctgtgatcccttccatttgggtgtttaccacatttcaaatccttttcccaattcttcatctcgtaggc
 ttctctctgggtcccaaacccgtgccaatlttggcaacatttctgacttggcgaaaagcctcatcgatcttggccaatctatctaaaattcacggccc
 5 ttgattagcctaaaagtttaggaagtgaacaactattgttggctcggcctctgtggccgaggaaatgttccttaaaaatgaccaagcacttgctaa
 ccgaaccattcctgactcgggttagggctggtgaccacgacaaattatccatgtcgtggtgcctgttcccaaaaatggagaaatatgagaaaaat
 ctccgctgtccaattactcccaacaaaaacttgatgctagtcacactcttagacaagctaagggtgaaacaactttatcatagctacaagttgttc
 10 cgaaaaaalgcaacccgtcgatattggacggggccgcatltaaacgtcacttaatttattatcaaacacattttctcaatcgaattagcaagtcatga
 atctagtgtctccaagagtttaacaactcatgtggaatattatggaggaaattggaaggcctaattatgctgatttttccctattcttggttacattga
 tcccttgggtataagacgtcgttggctggttactttgataaactcattgatgtttccaagacattatcgtgaaagacaaaagcttcgatcttctaattct
 15 tccggcgcaaaacaacaaatgacattcttgatactcttctaaactccatgaagataatgagttgagtatgcctgaaattaatcacctctcgtggat
 atctttagcggcggaacagacacaacagcaagcacattagaatgggcaatggccgaacttgtaaaaacccggaaatgatgactaaagttcaa
 attgaaatcgacaagctcttgaaaagattgcttagacatacaagaatccgacatctcaaaactaccttattacaagccattataaaagaacggtt
 20 acgtttacacccctactgtgttttgcctcgaaaggcagacaatgacgtagagtatatggctacgttgtaaccaagaatgctcaagtcctgt
 caatcttgggcaattggctgtatccaaaggatggaaaaatccggaagtatttctcctgaaagggttttagattgcaatcgaattataaaggacg
 25 agatttgaacttttacccttgggtgctggtagaaggatagccctggacttactttggcatatagaatgtgaacttgatgttggtactcttctcaaa
 actacaattgaaactgaagatggtatcaatcctaaggatttagacatggatgagaaatttgggattacattgcaaaagggttaaacctcttcaagtt
 attccagttccagaaactag (SEQ ID NO: 31).

En una modalidad, el ácido nucleico que codifica CYP76AD6 es impulsado por el promotor 35S de CaMV (pDOPA1; Figura 19). En otra modalidad, el ácido nucleico que codifica CYP76AD6 es impulsado por el promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum* (SIUb10) (pDOPA2; Figura 19).

En una modalidad, el ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, se expresa junto con AroG175 e hidroxilasa de aminoácidos aromáticos (AAH).

En una modalidad, el polinucleótido que comprende el ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, también comprende el gen de neomicina fosfotransferasa II (nptII), que en una modalidad, confiere resistencia a la kanamicina.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- α . En una modalidad, el gen del clado CYP76AD1- α comprende CYP76AD1. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1 comprende:

tactaatgtgcaaatgcataaatttaatttcagatactctttttataaataattattatactgtgcattcttttaacccaaaaaaaaaactgtcttaatacacc
 atttaattcctttcttaggatccactatcacatgtagtatataataataatcctatacagttcacgttatcaaacaccaaaagcatcaaaagccttcaca

cttgtattatitgggtagtggattgttagcgtgtatitgtgagatcatcatggatcatgcaacattagcaatgatactagccatttgggtcatttcttttc
 attcataaaacttcttttagccaacaaactacaaactcttctcctcctgggtccaaaaccattgccaataattggaacatcttagaagttggttaaaaa
 5 accccatcggtcatttgcatacttgcataaattcacggcccttaatatcgttacgtctaggaagtgaacaactattgtgtatcatcagcagatgtag
 ctaaagaaatgttcttaaaaaaagaccacctcttctaacctgactattcctaattctgtcacggccgggtgaccaccataaaactcaccatgtcgtgg
 ttgccggttccgccaatggcggaatttctgaagattacagccgtccatttgccttctcctcaaagacttgatgcttgccaacaccttccgcatgcc
 10 aagggtgcaacagctttatgaatatgtacaagaatgtgcacaaaaaggccaagctgtgatattggcaaagctgcatttactacctcccttaatttgtta
 tctaaactattctttcagtggaaattagcccaccataaatcacacacttctcaagagttaaggaactaatatggaacattatggaagatattgggaaa
 15 cctaattatgctgattatcttctattttagcgtgtgtgatccatcaggtattcgtcgaagattagcatgtagttttgacaagttgattgcagttttcagg
 gtataatatgtgaaaggcttgcgcctgattcttcaactacaacaacacgacgactgatgatgtgctagacgttcttctcagctcttcaacaaaaat
 gagctcactatggcgagattaaccatttgcctcgtcagacattttagctgtggaacagacactacatcaagtaacttttagtggtgcatgacagagtt
 20 aattaggaatcctgaaatgatggaaaaggctcaagaagaattaagcaagattgggcaaaagataaacaattcaggaatcagacattattaacc
 taccttacttacaagccattatcaaagaaactttgcgactacatccaccaactgtatttctttgcctcgtaaagccgacactgatgttgaactatatgg
 25 ttatatgtgcctaaagatgcacaaacttgttaacttatgggctattggaagagatcctaataatgcatggcaaaatgctgatatttttgcggcgaaaga
 ttataggggtgtgaaattgatgtcaaaggaagagattttggactcttacctttggagccgggaagaaggatattgctctgggatgaatttggccattag
 aatgttaactttgatgctagctacttacttcaattcttcaatttgaagcttgaaggagacataagtcctaaagacttagacatggatgagaaatttgg
 30 gattgcgttcaaaaagacaaagcctttaaacttattccaatacctaggtattgaaattttagacttacgtacaacaattattattgtttgtggttgttt
 tgggttagcttctcgttcattgtttgtttgatgtgctcgttgaatttactacaatacaacgaactccaattatatttgcacttggagtaattggttggg
 35 tttctcatctgtcatctcttttgggttgctgtgcaagggagtgcagcttagcatccttcaagaagatttaattaataatatgtgtatgtgtatgtgt
 atgtgtggattgtatctcgtcattcattttgcttgttgaatgatttttagttaattattgtaattataaaggatttgatcctccttgtgttgaattatatataa
 tgtgtagcacgacaataaagtacagataacttatataatcttattttctatgaaatgtacagacttgccttgtgttttaaaaaaa (SEQ ID NO:
 40 32).

En otra modalidad, el gen del clado CYP76AD1- α comprende *A. cruentus*, *Amaranthus cruentus* (CYP76AD2, acceso AET43291.1; SEQ ID NO: 15); *M. jalapa*, *Mirabilis jalapa* (CYP76AD3, acceso AET43292.1; SEQ ID NO: 16); *C. cristata*, *Celosia cristata* (CYP76AD4, acceso AGI78466.1; SEQ ID NO: 17); o una de sus combinaciones.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD). En una modalidad, la DOD es DODA1 de *Beta vulgaris* (BvDODA1). En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica BvDODA1 comprende:

aaaacaagaagaaaaacaaacacacctttatataactagaaagcaacaaaaaaaagaatgaaatgatgaatggtgaagatgctaatgatca
 aatgatcaaagaagcttctcataacacatggaacccaatattacagtagaagacacacatccattaagaccttcttgaaacttgagagag
 50 aaaatcttttaagaacaaagcaattcttattttctggtcatgtggaaactgttaaacctactgttaatgctgtccatatcaatgatactatccat
 gatitgtagactatcctgctgtatgtaccagttcaagtatccagctcctgggaaccagaattggcaagaaaagtagaggaaattctgaaaaaat
 cgggttccgaaacggcggaactgatcaaaaacgtgggctgtatggtgcatggtgtaccttaagtgaatgtatcctgaggctgataaccag
 55 tatgtcagctctcagttcagccgcaatttagatggaacatacattacaacttaggacgagcattggctccttgaaaacgacggcgatataatcatt
 ggttcaggaaagtgaactcacccttggatgaaactcctcattttttagtgagttgcaccttgggcagctgccttgattcatggcttcgaaagct
 ctcaataatggaaggttgaagaagtgaatatatgaagcaaaagcaccacaaattggaatttagcacatccttccagaacattttatccattgat
 gttgttctggcgctgctgtgaaatggaagcagagcttattcatagcagttgggatcatggcaccttgtgcatggctctacaagttcacttc
 60 agcctagttttacttttaaacactatgtctacagctctatgttattgtatttgtaatttggtatgtgtgtgtttgttttattcttttgattgtattgtacttgga
 ttgtgtgttttcttattgtgtgcataattcttttagtctatatattgtattcttttgatgaggaataaatcgcgagctcgtatgaatgtttgttttattgtttc
 aaatctatcattatatatatatatattattataaaaaaattattgtgtactcgcaaaaaa (SEQ ID NO: 33). En una modalidad, la DOD no es
 DOD de *Mirabilis jalapa*.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica la glucosiltransferasa relacionada con la betalaina es la secuencia de ácido nucleico que

codifica la ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT). En una modalidad, la cDOPA5GT es de *Mirabilis Jalapa*. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica cDOPA5GT comprende:

cctcacctccataacaaagaaatgaccgccattaaaaatgaacaccaatggtgaagggtgaaacacaacataactaatgatacctttcatggcgca
 5 agggcatttacgtccttccctgagcttgctatgtttctatataaacgaagtcattgtatcattactcttctactaccccgctcaatgctgggttccctacg
 acatctccttcaccaccatagctattctagctcggggatcagaattgtcaggttacctttcaactcaaccaatcatggtcttccacctggcattgaaaa
 10 cactgataaacttacactcccacttgtagatcactttttcattcaaccatttctcttgaccctcaccttagagattatattcccgccatttctcccctgcg
 cgccctcctctgtgtgtcatacatgatgtgttccctgggtgggtgatcaagttgctaaagacgtgggctcaactggtgtgtttttactacgggtggc
 gcgatggtacaagcgcatatgtgtccatttgaatgatctgcctcaccagaattactctgatgatcaagagttccgcttctggttcccggagaa
 15 tcataaattccgacgttctcaacttcacgttctgaggtatgccgatggatcagatgattggtcgaaatatttccaaccgcaattgaggaatcaat
 gaagagttttggatggctatgtaattcagttgaggaaatcgaaacacttgggttagtatcctcaggaactacactaaactacccatttggggattg
 20 gaccgttgatagcttcacctgtacaacattcatctgataataacagtactggtgccgagttgttcaatggttgagcttgaagaaccagattctg
 tattatacatctcatttggatcacagaacacaatttcaccaaccagatgatggaactagcagccggttggagtgcaagtgagaagccgtttttgtg
 ggtgattcgagcaccatttgggttcgatcaatgaggaaatgagaccagaatggctaccagagggattcgaggagcgaatgaaggtgaaaaa
 25 acaaggaaagttggtgtataagttgggaccacagttggagatacttaacatgagtcatacggagggttcttaactcattgtgggtggaattcgatc
 cttagagtcacttcgagaaggtgtgcctatgttaggggtggccattggcagccgaacaagcttataatttgaagtatttggaggacgaaatgggggtt
 30 gcagtcgagttagcgaggggattggaaggagagataagtaagagaaagtgagagaattgtggagatgattttagagagaaatgaaggaag
 taaaggatgggaaatgaaaaatagagcagtagaaatggggaagaaacttaagacgctgtcaatgaggagaaggaactgaagggttcttctgt
 taaggcaatagatgatttcttagatgcggtcatgcaagctaagttggaaccttcttcaataataagatcgaatgttatctcgtctcagagactcaa
 35 acaattgactactaggatgatcagaaaagagagttatgttcagtgttctgttattatgcaagacttcaataataacagaaaaatctgtgattagattcata
 actt (SEQ ID NO: 2).

En una modalidad, varios ácidos nucleicos se combinan en un único polinucleótido recombinante como se describe en la presente descripción. En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica DOD. En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y un ácido nucleico que codifica DOD. En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y un ácido nucleico que codifica CYP76AD6. En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica DOD.

En otra modalidad, se incorporan varios ácidos nucleicos en una célula, pero cada ácido nucleico es un polinucleótido separado como se describe en la presente descripción.

En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOD. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOD. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOD y una secuencia de ácido nucleico

que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOD y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una

5 secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOD y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En otra modalidad, cualquiera de los polinucleótidos recombinantes descritos anteriormente en la presente descripción comprende además una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En una modalidad, la glucosiltransferasa relacionada con la betalaína es ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa o betanidin-5-O-glucosiltransferasa. En una modalidad, la ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa es gen ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa* (cDOPA5GT) (SEQ ID NO: 2).

10

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

15

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

20

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) expresados en tándem.

25

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, expresados en tándem.

30

En una modalidad, los polinucleótidos descritos en la presente descripción comprenden múltiples secuencias de ácidos nucleicos que se encuentran en el mismo marco de lectura. En una modalidad, los polinucleótidos descritos en la presente descripción comprenden múltiples secuencias de ácidos nucleicos que se expresan en tándem.

35

En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura. En una modalidad, el gen DOD está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen CYP76AD1 está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen de la glucosiltransferasa relacionado con la betalaína está bajo el control de un promotor de ubiquitina-10 de Arabidopsis. En una modalidad, el polinucleótido comprende además un gen de resistencia a la kanamicina. En una modalidad, el polinucleótido es el vector pX11, como se describe en el Ejemplo 8, más abajo en la presente descripción. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico del vector pX11 comprende (SEQ ID NO: 19).

40

En otra modalidad, el gen CYP76AD1 está bajo el control de un promotor E8 (pX11(E8), SEQ ID NO: 20; Figura 15). En otra modalidad, el gen CYP76AD1 está bajo el control de un promotor CHS (pX11(CHS) SEQ ID NO: 21; Figura 15).

50

En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura. En una modalidad, el gen DOD está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen de la glucosiltransferasa relacionado con la betalaína está bajo el control de un promotor de ubiquitina-10 de Arabidopsis. En una modalidad, el polinucleótido comprende además un gen de resistencia a la kanamicina. En una modalidad, el polinucleótido es el vector pX13, como se describe en el Ejemplo 14, más abajo en la presente descripción.

55

En otra modalidad, el gen CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, está bajo el control de un promotor E8. En otra modalidad, el gen CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, está bajo el control de un promotor CHS.

60

65

En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura. En una modalidad, el gen DOD está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen CYP76AD1 está bajo el control de un promotor 35S de CaMV. En una modalidad, el gen de la glucosiltransferasa relacionado con la betalaína está bajo el control de un promotor de ubiquitina-10 de Arabidopsis. En una modalidad, el polinucleótido comprende además un gen de resistencia a la kanamicina. En una modalidad, el polinucleótido es el vector pX12, como se describe en el Ejemplo 14, más abajo en la presente descripción.

En otra modalidad, el gen CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, está bajo el control de un promotor E8. En otra modalidad, el gen CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, está bajo el control de un promotor CHS. En otra modalidad, el gen CYP76AD1 está bajo el control de un promotor E8. En otra modalidad, el gen CYP76AD1 está bajo el control de un promotor CHS.

En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β bajo el control de un promotor. En una modalidad, el gen del clado CYP76AD1- β es CYP76AD6. En otra modalidad, el gen del clado CYP76AD1- β es CYP76AD15.

En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un gen del clado CYP76AD1- β de la remolacha roja. En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un gen del clado CYP76AD1- β que no procede de la remolacha azucarera. En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un gen del clado CYP76AD1- β pero que excluye la secuencia de ácido nucleico de los parálogos de CYP76AD1 de la remolacha azucarera

(DeLoache y otros, 2015), que no producen betaxantina cuando se transforman en levadura con DOD. En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un gen del clado CYP76AD1- β pero que excluye el ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 34.

En otra modalidad, el gen del clado CYP76AD1- β es un gen del clado CYP76AD1- β como se expone en Brockington y otros, 2015 (New Phytol. Sep 2015;207(4):1170-80). En una modalidad, el gen del clado CYP76AD1- β es un gen del clado CYP76AD1- β como se expone en la Figura 2 complementaria de Brockington y otros, 2015.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un gen CYP76AD6, un gen CYP76AD15, o una de sus combinaciones bajo el control de un promotor.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en donde dichos ácidos nucleicos se insertan en el polinucleótido en marco. En una modalidad, el polinucleótido comprende además un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En una modalidad, el ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β es *Bv. maritima*, *Beta vulgaris* ssp. marítima (Núm de acceso a GenBank AKI33834.1; SEQ ID NO: 10); *F. latifolia*, *Froelichia latifolia* (acceso AKI33838.1; SEQ ID NO: 11); *A. caracasana*, *Alternanthera caracasana* (acceso AKI33835.1; SEQ ID NO: 12); *A. ficoidea*, *Alternanthera ficoidea* (acceso AKI33831.1; SEQ ID NO: 13), o una de sus combinaciones.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un gen CYP76AD6, un gen CYP76AD15, o una de sus combinaciones y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en donde dichos ácidos nucleicos se insertan en el polinucleótido en marco. En una modalidad, el polinucleótido comprende además un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En otra modalidad, la presente invención comprende ácidos nucleicos adicionales que codifican polipéptidos que modifican la estructura de la betalaína. En una modalidad, el polipéptido es una enzima glicosilante. En otra modalidad, el polipéptido es una enzima acilante. En otra modalidad, los ácidos nucleicos adicionales codifican polipéptidos implicados en el transporte subcelular. En otra modalidad, los ácidos nucleicos adicionales codifican polipéptidos implicados en la desintoxicación.

Homólogos y variantes

En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es homólogo a una secuencia expuesta en la presente descripción, ya sea expresamente o por referencia a una entrada de GenBank.

Los términos "homología", "homólogo", etcétera, cuando hacen referencia a cualquier aminoácido o ácido nucleico, se refieren, en una modalidad, a un porcentaje de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido o polinucleótido natural correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso de ser necesario, para lograr el por ciento máximo de homología, y sin considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los métodos y programas de computadora para el alineamiento se conocen bien en la técnica tales como, por ejemplo, los paquetes BLAST, DOMAIN, BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility), GENPEPT y TREMBL.

En una modalidad, puede usarse un homólogo de CYP76AD1 en lugar de CYP76AD1 de acuerdo con las composiciones y métodos de la presente invención.

En otra modalidad, puede usarse un homólogo de CYP76AD6 en lugar de CYP76AD6, de acuerdo con las composiciones y métodos de la presente invención.

En otra modalidad, puede usarse un homólogo de la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) en lugar de la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), de acuerdo con las composiciones y métodos de la presente invención.

La homología puede ser a nivel de secuencia de nucleótidos y/o secuencia de aminoácidos codificada. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos comparte al menos aproximadamente 50 %, o 60 %, o 70 %, u 80 % de homología. En otra modalidad, la secuencia de ácidos nucleicos y/o aminoácidos comparte al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología con una secuencia de la presente invención. La homología puede ser a nivel de secuencia de nucleótidos y/o secuencia de aminoácidos codificada. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos comparte al menos aproximadamente 72 % de homología. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos comparte al menos aproximadamente 75 % de homología.

En otra modalidad, la homología se determina mediante la determinación de la hibridación de las secuencias candidatas, cuyos métodos se describen bien en la técnica (Ver, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook y otros, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel y otros, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

En una modalidad, el homólogo se aísla de otra planta Caryophyllales. En una modalidad, el homólogo se aísla de un cactus, un clavel, un amaranto, una planta de hielo, una remolacha, una planta carnívora o una de sus combinaciones. En una modalidad, la planta carnívora es una Dionocophyllaceae tal como Triphyophyllum, una Droseraceae, tal como Aldrovanda (planta de rueda de agua), Dionaea (venus atrapamoscas), Drosera (rocío de sol), una Drosophyllaceae tal como Drosophyllum (pino rocío o rocío de sol portugués), o una Nepenthaceae tal como planta jarra tropical o copa de mono.

En una modalidad, el homólogo se aísla basado en la expresión temporal. En una modalidad, el homólogo se aísla basado en la etapa del desarrollo. En una modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 1, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 1 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 2, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 2 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 3, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 3 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 4, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 4 cm. En otra modalidad, la etapa del desarrollo es la Etapa 5, que, en una modalidad, es cuando la longitud de la flor es de aproximadamente 5-6 cm.

En otra modalidad, el homólogo se aísla basado en la expresión tisular. En una modalidad, la expresión tisular de un homólogo de CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, o DOD es en un tejido floral. En una modalidad, el tejido floral es un pétalo. En otra modalidad, el tejido floral es un estambre. En otra modalidad, el tejido floral es una antera. En otra modalidad, el tejido floral es un estigma.

En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es una variante de una secuencia expuesta en la presente descripción. En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es una isoforma de una secuencia expuesta en la presente descripción. En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es un fragmento de una secuencia expuesta en la presente descripción. En una modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es una variante funcional de una secuencia expuesta en la presente descripción. En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es una isoforma funcional de una secuencia expuesta en la presente descripción. En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es un fragmento funcional de una secuencia expuesta en la presente descripción. En otra modalidad, un polinucleótido o polipéptido recombinante de la presente invención es un homólogo funcional de una secuencia expuesta en la presente descripción.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se describe en la presente descripción.

En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6 es como se expone en SEQ ID NO: 30.

En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico de CYP76AD6 es como se expone en SEQ ID NO: 30. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 30. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 30. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 30. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 30. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 30.

Como se demuestra en el Ejemplo 19, CYP76AD15, un ortólogo de CYP76AD6 en *Mirabilis jalapa*, tuvo la misma actividad que CYP76AD6 durante la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. En otra modalidad, CYP76AD15 o un homólogo, isoforma o variante de este, puede usarse en lugar de CYP76AD6 en las composiciones y métodos de la presente invención. En una modalidad, el producto génico CYP76AD15 de *Mirabilis jalapa* tiene una función similar al producto génico CYP76AD6 de *Beta vulgaris*. En una modalidad, CYP76AD15 de *Mirabilis jalapa* es el gen que codifica una enzima implicada en la conversión de tirosina en L-DOPA.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD15. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD15 comprende:

```

ttgtctattattggtcctaaatccctctctctatctttttgtaaaagaaaatagttgttcaacttagggaattattgatatttcattatggaaaacacaatgtt
aggtgttatcctagcaaccatttccctcacttttcacataatgaagatgttatttagtcctccaaggttaactacccccgggtccgagaccattgccca
attattggtaatatctcgcagcttggggataaaccacatcgttctttgcaaacttcgcaaaattcacggtccttttagtactttgaaactcgggagtg
aaccactattgtggttctctctgaagtgtctaaagaaatgttttgaaaaatgaccaacctttggcaaatctaccatacctgactcagtaagagc
aggtaacatgacaaactatcaatgtcgtggtgcctgtatcacccaaatggcgaaatctagaagatttcagccgtccaattgtctcactcaa
cgacttgatgcaagtaagctcatagacaagctaaaatcaaacaacttattgagtacgtaaaaaatgcagtaaaatcgccaatacgtcgtatatt
ggccaagttgcattcactacatcacttaatttactatcaaacacattcttttcaaaagaactagcatcatttgattcagataatgcacaagagttcaaac
aactaatgtggtgcattatggaagaaattggtaggcctaattatgccgattatttcctatcttgggttatgtcgtatccattcgggtgctagacgtcactt
tctcgttacttcgatcaactaattgaagtattcaagtgtatttcgtgagagacttacacatgataataattgtgggtaataacaatgatgttttagct
acgttgctcgtatcttataaacaacagagtaactatggatgaaatcaaccatttactagtgacatttttgatgctggtacggatacaacagcaagt
acactagaatgggcaatgtcagagctcataaaaaatccacacataatggccaaagctcaagaggaggtccggcgagccaccatgtctcacgg
cggagctacgggtggcggaatacaagaatcgatataatcttccatacatacaatctattataaagaaacacttcgtttacaccaccaact
gtgttttacttctagaaaagctgacgtggatgtccaattattcggctatgtgttccccaaaaatgctcaagtcctagtcatttatgggccattggtc
gtgacccaaatgtgtggcccgacccggaagttttttagtcccgaaagatttatggattgtgagattgatgtcaagggctcgtattttgagctattgcctt
tcggggcgggtcgtcggattgtccggattgtcttggcttatcggatgcttaatttgatgttggttaatatggtacattcttttgattggaaattaccc
gggtgttgaaaatggatccgggtcggaatggatagtttgatagatgagaaatttggtatcactttgcaaaaggttcaacccttaaggttattcc
tgtctcaaggaaatagatttttgaagatcgtggtgggagataatcatattgttttaattattgttggtgtattttattgtattattggggacaattttat
aataaaagataataaagttcctaattgtgatttatattgtgaattttctagttaataataatacatatgaatatttatgatgaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaagg (SEQ ID NO: 35).

```

En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica BvCYP76new, como se describe en el Ejemplo 3. En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica MjCYP76 de *M. jalapa* (SEQ ID NO: 1). En una modalidad, pueden usarse CYP76AD15, BvCYP76new o MjCYP76 en las composiciones y métodos de la presente

invención. En otra modalidad, en las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse otros genes que codifican el citocromo P450 coexpresados con uno o más de los genes relacionados con la betalaína conocidos usados como cebos. En una modalidad, un similar a CYP82G1 (SEQ ID NO: 36), similar a CYP78A9 (SEQ ID NO: 37), similar a CYP86B1 (SEQ ID NO: 38) o una de sus combinaciones puede usarse en las composiciones y métodos de la presente invención. En una modalidad, puede usarse en lugar de CYP76AD6.

En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1. En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico de CYP76AD1 es como se expone en SEQ ID NO: 32. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 32. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 32. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 32. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 32. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 32.

En otra modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD3 (SEQ ID NO: 4), como se describe en el Ejemplo 9. En una modalidad, puede usarse CYP76AD3 en lugar de CYP76AD1 en las composiciones y métodos de la presente invención.

En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica DODA1 de *Beta vulgaris* (BvDODA1). En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica BvDODA1. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico de BvDODA1 es como se expone en SEQ ID NO: 33. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 33. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 33. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 33. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 33. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 33.

En otra modalidad, la enzima DOD es PgDOD de *Portulaca grandiflora* (Núm. acceso AJ580598; SEQ ID NO: 39), MjDOD de *Mirabilis jalapa* (Núm. acceso AB435372; SEQ ID NO: 3), BgDOD de *Bougainvillea glabra* (Núm. acceso AB435373; SEQ ID NO: 40), o AmDOD de *Amanita muscaria* (Núm. acceso P87064; SEQ ID NO: 41).

En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT). En una modalidad, un polinucleótido de la presente invención comprende opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica cDOPA5GT. En una modalidad, la secuencia de ácido nucleico de cDOPA5GT es como se expone en SEQ ID NO: 2. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 2. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 2. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 2. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 2. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 2.

En una modalidad, "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos (o en otras modalidades, un organismo o tejido) que es diferente de la mayoría de la población pero todavía es lo suficientemente similar al modo común para considerarse como una de ellas, por ejemplo, variantes de empalme. En una modalidad, la variante puede ser una variante conservativa de secuencia, mientras que en otra modalidad, la variante puede ser una variante conservativa funcional. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución de 1 aminoácido. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación, sustitución o sus combinaciones, de 2 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 3 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 4 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 5 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 7 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 10 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 2-15 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 3-20 aminoácidos. En una modalidad, una variante puede comprender una adición, eliminación o sustitución, o sus combinaciones, de 4-25 aminoácidos.

En una modalidad, el término "fragmento" se usa en la presente descripción para referirse a una proteína o polipéptido que es más corto o comprende menor cantidad de aminoácidos que la proteína o el polipéptido de longitud completa. En otra modalidad, un fragmento se refiere a un ácido nucleico que es más corto o comprende menor cantidad de nucleótidos que el ácido nucleico de longitud completa. En otra modalidad, el fragmento es un fragmento N-terminal. En otra modalidad, el fragmento es un fragmento C-terminal. En una modalidad, el fragmento es una sección intrasecuencial de la proteína, péptido, o ácido nucleico. En otra modalidad, el fragmento es una sección funcional dentro de la proteína, péptido o ácido nucleico.

En una modalidad, "isoforma" se refiere a una isoforma de proteína o una isoforma de gen. En una modalidad, una isoforma de proteína es una forma diferente de una proteína codificada por el mismo gen, o una proteína de un gen diferente con similitudes de secuencia de aminoácidos y funcionales. En una modalidad, una isoforma de gen es un ARNm que se produce a partir del mismo locus pero que tiene diferentes sitios de inicio de la transcripción (TSS), secuencias de ADN que codifican proteínas (CDS) y/o regiones no traducidas (UTR). En una modalidad, la isoforma del gen tiene actividad alterada, mientras que en otra modalidad, la isoforma del gen no tiene actividad alterada. De esta forma, en una modalidad, una isoforma es una versión alternativa de una molécula, por ejemplo, una proteína, que tiene la misma función que la primera molécula pero que puede tener pequeñas diferencias en su estructura o secuencia. En una modalidad, las isoformas pueden producirse a partir de genes diferentes pero relacionados, o en otra modalidad, pueden surgir del mismo gen mediante procesos de corte y empalme alternativos. En otra modalidad, las isoformas se producen por polimorfismos de nucleótidos simples.

En una modalidad, "funcional" dentro del significado de la invención, se usa en la presente descripción para referirse a la capacidad innata de una proteína, péptido, ácido nucleico, fragmento o una variante de estos para mostrar una actividad o función biológicas. En una modalidad, dicha función biológica es su propiedad de unión a una pareja de interacción, por ejemplo, un receptor asociado a la membrana, y en otra modalidad, su propiedad de trimerización. En el caso de los fragmentos funcionales y las variantes funcionales de la invención, estas funciones biológicas de hecho pueden cambiar, por ejemplo, con respecto a su especificidad o selectividad, pero con retención de la función biológica básica.

En la técnica relacionada se conocen numerosos métodos para medir la actividad biológica de una proteína, polipéptido o molécula, por ejemplo, ensayos de proteínas, que utilizan sustratos marcados, análisis de sustratos mediante métodos cromatográficos, tales como HPLC o cromatografía de capa fina, métodos espectrofotométricos, etc. (ver, por ejemplo, Maniatis y otros (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Vectores de expresión

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) expresados en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, expresados en tándem.

En una modalidad, los polinucleótidos de la presente invención se insertan en vectores de expresión (es decir, un constructo de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en procariotas. En otra modalidad, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en eucariotas. En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención incluye un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación y la integración tanto en procariotas como en eucariotas. En algunas modalidades, los vectores de clonación comprenden secuencias de inicio de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

En una modalidad, puede usarse una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión en un huésped para expresar los polipéptidos de la presente invención. En algunas modalidades, estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vector de expresión de ADN cósmido que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión recombinante en levaduras que contienen la secuencia codificante del polipéptido; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinantes en virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes, tales como el plásmido Ti, que contiene la secuencia codificante del polipéptido.

En una modalidad, los vectores virales de la presente invención sobreexpresan los genes de la vía descritos en la presente descripción. En otra modalidad, la infección viral de células que expresan los genes de la vía descritos en la presente descripción induce a las células a sobreexpresar los genes de la vía.

En algunas modalidades, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo, sistemas de expresión en mamíferos, tales como células CHO) para expresar los polipéptidos de la presente invención. En una modalidad, el vector de expresión usado para expresar los polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a la neomicina.

En algunas modalidades, en los sistemas bacterianos de la presente invención, puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión en dependencia del uso previsto para el polipéptido expresado. En una modalidad, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una modalidad, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado hacia el periplasma de las bacterias o el medio de cultivo donde el producto proteico se purifica fácilmente. En una modalidad, ciertas proteínas de fusión se manipulan por ingeniería genética con un sitio de escisión específico para ayudar a recuperar el polipéptido. En una modalidad, los vectores que pueden adaptarse a dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, la serie pET de los vectores de expresión de *E. coli* (Studier y otros, *Methods in Enzymol.* 185:60-89 1990).

En una modalidad, se usan sistemas de expresión en levaduras. En una modalidad, una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles puede usarse en levaduras como se describe en la patente de Estados Unidos Núm.: 5,932,447. En otra modalidad, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN extraño en el cromosoma de levadura.

En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención puede incluir además secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un único ARNm tal como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica del promotor-polipéptido quimérico.

En algunas modalidades, los vectores de expresión para mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcADN3.(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Strategene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

En algunas modalidades, en la presente invención se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus de eucariotas tales como retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas modalidades, los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Bar incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que han demostrado su efectividad para la expresión en células eucariotas.

En algunas modalidades, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de los polipéptidos de la presente invención ya que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de direccionamiento. En una modalidad, la infección lateral es inherente al ciclo de vida de, por ejemplo, retrovirus y es el proceso mediante el cual una sola célula infectada produce muchos viriones de progenie que brotan e infectan células vecinas. En una modalidad, el resultado es que una gran área se infecta rápidamente, la mayor parte de la cual no estaba inicialmente infectada por las partículas virales originales. En una modalidad, se producen vectores virales que no pueden propagarse lateralmente. En una modalidad, esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen específico solo en un número localizado de células objetivo.

En una modalidad, pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en las células. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes.

En algunas modalidades, la introducción de ácido nucleico por infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como la lipofección y la electroporación, ya que puede obtenerse una mayor eficiencia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

En una modalidad, se apreciará que los polipéptidos de la presente invención también pueden expresarse a partir de un constructo de ácido nucleico administrado al individuo mediante el empleo de cualquier modo de administración adecuado, descrito anteriormente en la presente descripción (es decir, terapia génica *in vivo*). En una modalidad, el constructo de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada mediante un vehículo/método de suministro de genes apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y después las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex-vivo*).

En una modalidad, se usan vectores de expresión de plantas. En una modalidad, la expresión de una secuencia codificante de polipéptido está impulsada por una serie de promotores. En algunas modalidades, se usan promotores virales tales como los promotores ARN 35S y ARN 19S de CaMV [Brisson y otros, *Nature* 310:511-514 (1984)], o el promotor de la proteína de cubierta a TMV [Takamatsu y otros, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]. En otra modalidad se usan promotores de plantas tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi y otros, *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); y Brogli y otros, *Science* 224:838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, por ejemplo, *hsp17,5-E* o *hsp17,3-B* de soya [Gurley y otros, *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)]. En una modalidad, los constructos se introducen en células vegetales mediante el uso de plásmido Ti, plásmido Ri, vectores virales de plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por el experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Weissbach y Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463 (1988)]. La presente invención también puede usar otros sistemas de expresión tales como sistemas de células huésped de insectos y mamíferos, que se conocen bien en la técnica.

Se apreciará que aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica al polipéptido), el constructo de expresión de la presente invención puede incluir, además, secuencias manipuladas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, la producción, la purificación, el rendimiento o la actividad del polipéptido expresado.

Pueden usarse diversos métodos, en algunas modalidades, para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema de la célula huésped. En algunas modalidades, dichos métodos se describen generalmente en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang y otros, *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega y otros, *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa y otros [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, ver las patentes de Estados Unidos Núms. 5,464,764 y 5,487,992 para los métodos de selección positiva-negativa.

En algunas modalidades, las células transformadas se cultivan en condiciones efectivas, que permiten la expresión de grandes cantidades de polipéptidos recombinantes. En algunas modalidades, las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, condiciones del biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan la producción de proteínas. En una modalidad, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el cual se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En algunas modalidades, un medio típicamente incluye una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes adecuados, tales como las vitaminas. En algunas modalidades, las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas Petri. En algunas modalidades, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno adecuados para una célula recombinante. En algunas modalidades, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

En algunas modalidades, en dependencia del sistema de vector y huésped usado para la producción, los polipéptidos resultantes de la presente invención o bien permanecen dentro de la célula recombinante, se secretan hacia el medio de fermentación, se secretan hacia un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplasmático en *E. coli*; o son retenidos en la superficie externa de una membrana celular o viral.

Composiciones

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende uno o más polinucleótidos recombinantes como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende ácidos nucleicos recombinantes como se describe en la presente descripción.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y,

opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) expresados en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) expresados en tándem.

En una modalidad, se proporciona una composición que comprende un polinucleótido recombinante o un polipéptido químico de la presente invención. En una modalidad, los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo *per se*.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de expresión o un polinucleótido recombinante como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una célula como se describe en la presente descripción.

Células

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido recombinante como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de expresión como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) expresados en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, expresados en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichos ácidos nucleicos están en el mismo marco de lectura.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) expresados en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, expresados en tándem.

En una modalidad, cuando los genes de la invención pueden transformarse en una célula vegetal, puede producirse un cultivo en suspensión de células vegetales. En una modalidad, la célula vegetal es una célula madre vegetal. La betalaína, la L-DOPA o una de sus combinaciones pueden aislarse a partir de cultivos en suspensión de plantas. Los métodos para fabricar cultivos en suspensión de células vegetales se conocen bien en la técnica y se describen completamente en las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos US 2014/0051135; US 2011/0251408; US 2010/0159545; y US 2007/0026506.

En una modalidad, las células vegetales se seleccionan de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco de árbol (*Nicotiana glauca*), hierba mora negra europea (*Solanum nigrum*), Petunia (*Petunia x hybrida*) y *Nicotiana benthamiana*. En otra modalidad, las células vegetales proceden de cualquiera de las plantas que se describen más abajo en la presente descripción.

En una modalidad en la que se introducen polinucleótidos en células vegetales, las células vegetales pueden derivarse de cualquier órgano vegetal de interés, como se describe más abajo en la presente descripción. En una modalidad, el polinucleótido se introduce en una porción de un órgano de la planta. En una modalidad, el polinucleótido se introduce en una porción de una flor. En una modalidad, la porción de la flor es el pétalo, el estambre, la antera, el estigma o una de sus combinaciones.

Esta invención también proporciona métodos para fabricar semillas transgénicas que pueden usarse para producir un cultivo de plantas transgénicas con un rasgo potenciado resultante de la expresión de un constructo de ADN recombinante integrado de forma estable.

En otra modalidad, las células de la presente invención son células de un microorganismo. En otra modalidad, la célula es una célula de levadura. En una modalidad, la célula de levadura es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*. En otra modalidad, la célula de la presente invención es una célula bacteriana. En una modalidad, la célula bacteriana es una célula de *Escherichia coli*. En otra modalidad, la célula es una célula de *Acremonium rutilum*, *Aspergillus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Bacillus* sp. JPJ, *Brevundimonas* sp. SGJ, *E. herbicola*, *Citrobacter freundii*, *Symbiobacterium*, o *Pseudomonas aeruginosa*. En otra modalidad, la célula bacteriana procede de una bacteria implicada en la fermentación de productos lácteos. En una modalidad, la bacteria es *Streptococcus lactis*. En otra modalidad, la bacteria es un *Lactobacillus*. En una modalidad, el *Lactobacillus* es *Lactobacillus bulgaricus*. En otra modalidad, la bacteria es un *Lactococcus* o un *Leuconostoc*.

Plantas y partes de plantas

En otra modalidad, la presente invención proporciona una planta o parte de esta producida mediante un método para aumentar los niveles de una o más betalaínas o L-DOPA en una planta o en una parte de la planta que comprende provocar o permitir la expresión de una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, o una de sus combinaciones, dentro de dicha planta o parte de la planta. En una modalidad, una planta que expresa DOD y CYP76AD1 y no CYP76AD6 o CYP76AD15, también expresa una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En una modalidad, la planta no produce naturalmente betalaínas. En otra modalidad, la planta produce bajos niveles de betalaínas. En otra modalidad, la planta no produce naturalmente niveles detectables de betalaínas.

En otra modalidad, las plantas o partes de plantas como se describe en la presente descripción producen naturalmente betalaínas; sin embargo, la planta o partes de plantas genéticamente modificadas tienen un nivel alterado de betalaínas o de una betalaína en particular, lo que altera de esta manera el color y/o las propiedades de la planta genéticamente modificada. En una modalidad, los niveles alterados de betalaínas son niveles aumentados. En otra modalidad, los niveles alterados de betalaínas son niveles reducidos.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una planta o parte de esta que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, las betalaínas o la L-DOPA se producen como se describe en la presente descripción en una planta completa. En una modalidad, una semilla se modifica genéticamente de manera que se producen betalaínas o L-DOPA en una planta completa. En otra modalidad, las betalaínas o la L-DOPA se producen en un órgano particular de una planta. En otra modalidad, las betalaínas o la L-DOPA se producen en una sección de un órgano de una planta. Por ejemplo, las betalaínas o la L-DOPA pueden producirse en algunas células vegetales en la hoja u otro órgano de una planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una planta ornamental producida mediante un método para aumentar los niveles de una o más betalaínas en una planta o en una parte de esta que comprende provocar o permitir la expresión de una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus

combinaciones, CYP76AD1, o una de sus combinaciones, dentro de dicha planta o parte de la planta. En una modalidad, si la planta ornamental expresa CYP76AD1 y DOD y no CYP76AD6 o CYP76AD15, expresa además una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina.

- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona una planta ornamental que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD).

- 10 En una modalidad, diferentes partes u órganos de un organismo de la presente invención comprenden una pigmentación diferente debido a la expresión de múltiples citocromos P450 (por ejemplo, CYP76AD6, CYP76AD1) bajo el control de diferentes secuencias promotoras no constitutivas (por ejemplo, específicas de frutas, específicas de flores o promotores inducibles). En una modalidad, el organismo es una planta y las diferentes pigmentaciones se encuentran en diferentes partes de la planta. En una modalidad, la planta es una planta ornamental.

- 15 En otra modalidad, la presente invención proporciona un cultivo alimentario producido mediante un método para aumentar los niveles de una o más betalainas en una planta o parte de esta que sirve como cultivo alimentario que comprende provocar o permitir la expresión de una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, o una de sus combinaciones, dentro de dicha planta o parte de esta. En una modalidad, si el cultivo alimentario expresa CYP76AD1 y DOD y no CYP76AD6 o CYP76AD15, expresa además una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina.

- 20 En otra modalidad, la presente invención proporciona una planta o parte de esta que sirve como cultivo alimentario que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD).

- 25 En una modalidad, las composiciones y el método de la presente invención comprenden una o más partes de la planta. En una modalidad, una parte de la planta como se describe en la presente descripción es un órgano de la planta. En una modalidad, la parte de la planta es una hoja, tallo, raíz, flor, semilla, tubérculo o fruto. En una modalidad, la parte de la planta es la porción comestible de la planta. En una modalidad, las composiciones y el método de la presente invención comprenden una o más porciones de una o más partes de plantas. En una modalidad, la porción de la parte de la planta es una porción de una flor. En una modalidad, la porción de la flor es el pétalo, el estambre, la antera o el estigma.

- 35 En una modalidad, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y otros genes de la invención descritos en la presente descripción pueden transformarse en una planta o una célula vegetal. El término "planta", como se usa en la presente, puede referirse a cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea. Los ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, maíz, trigo, arroz, caña de azúcar y plátano. Los ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, soya, frijoles, guisantes, lentejas, cacahuets, tomates, papas, algodón y árboles frutales perennes, lo que incluye uvas, manzanas y naranjas.

- 40 En una modalidad, la planta es tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco de árbol (*Nicotiana glauca*), hierba mora negra europea (*Solanum nigrum*), Petunia (*Petunia x hybrida*) o *Nicotiana benthamiana*. En otra modalidad, la planta es *B. vulgaris*. En otra modalidad, la planta es *Mirabilis jalapa*.

- 45 En una modalidad, una planta de la presente invención es una planta de cultivo. En una modalidad, la planta de cultivo es *Solanum tuberosum* (Papa). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Zea mays* (Maíz). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Oryza sativa* (Arroz). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Manihot esculenta* (Yuca). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Hordeum vulgare* (Cebada). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Triticum aestivum* (Trigo). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Sorghum bicolor*. En otra modalidad, la planta de cultivo es *Brassica napus* (Colza). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Ricinus communis* (Castor). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Phaseolus vulgaris* (Frijol). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Gossypium hirsutum* (Algodón). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Glycine max* (Soya). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Beta vulgaris* (Remolacha). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Musa acuminata* (Banana). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Capsicum annuum* (Pimientos dulces y chiles). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Cicer arietinum* (Garbanzo). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Solanum lycopersicum* (Tomate). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Elaeis guineensis* (Palma aceitera africana). En otra modalidad, la planta de cultivo es *Setaria italic* (Mijo cola de zorra).

- 60 En otra modalidad, una planta de la presente invención es un bambú, que en una modalidad es caña de río (*Arundinaria gigantea*) y caña pequeña (*Arundinaria tecta*). En otra modalidad, la planta es una *Lemna*.

- En otra modalidad, una planta de la presente invención es un musgo. En una modalidad, el musgo es un *Sphagnum*. En una modalidad, la especie *Sphagnum* es *crustatum* o *subnitens*. En una modalidad, el musgo se usa para turba. En una modalidad, la turba se usa como combustible, como un aditivo para suelos hortícolas y como malta ahumada en la producción de whisky escocés. En otra modalidad, el musgo se usa con fines decorativos, tal como en jardines

y en el comercio de floristería. En otra modalidad, el musgo se usa como aislante. En otra modalidad, el musgo se usa como absorbente de líquidos. En otra modalidad, el musgo se usa para apósitos de primeros auxilios, para pañales o servilletas. En otra modalidad, el musgo es un *Physcomitrella patens*. En otra modalidad, el musgo es un *Fontinalis antipyretica* que, en una modalidad, se usa para sofocar incendios.

Las plantas incluidas en la invención son cualquier planta susceptible de técnicas de transformación, lo que incluye gimnospermas y angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.

Los ejemplos de angiospermas monocotiledóneas incluyen, pero no se limitan a, espárrago, maíz dulce y de campo, cebada, trigo, arroz, sorgo, cebolla, mijo perla, centeno y avena y otros granos de cereales.

Los ejemplos de angiospermas dicotiledóneas incluyen, pero no se limitan a tomate, tabaco, algodón, semilla de colza, habas, soya, pimientos, lechugas, guisantes, alfalfa, trébol, cultivos de coles o Brassica oleracea (por ejemplo, repollo, brócoli, coliflor, coles de Bruselas), rábano, zanahoria, remolacha, berenjena, espinaca, pepino, calabacín, melones, melón cantalupo, girasol y diversas plantas ornamentales.

En otra modalidad, puede usarse cualquier especie de planta leñosa, ornamental o decorativa, cultivo o cereal, fruta o verdura, y algas (por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*) en las composiciones y métodos proporcionados en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de plantas incluyen plantas del género Arabidopsis o del género Oryza. Otros ejemplos incluyen plantas de los géneros Acorus, Aegilops, Allium, Amborella, Antirrhinum, Apium, Arachis, Beta, Betula, Brassica, Capsicum, Ceratopteris, Citrus, Cryptomeria, Cycas, Descurainia, Eschscholzia, Eucalyptus, Glycine, Gossypium, Hedyotis, Helianthus, Hordeum, Ipomoea, Lactuca, Linum, Liriodendron, Lotus, Lupinus, Lycopersicon, Medicago, Mesembryanthemum, Nicotiana, Nuphar, Pennisetum, Peryea, Phaseolus, Physcomitrella, Picea, Pinus, Poncirus, Populus, Prunus, Robinia, Rosa, Saccharum, Schedonorus, Secale, Sesamum, Solanum, Sorghum, Stevia, Thellungiella, Theobroma, Triphysaria, Triticum, Vitis, Zea o Zinnia.

Ejemplos de especies leñosas incluyen álamos, pinos, secuoyas, cedros, robles, etc.

En ciertas modalidades, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, papas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, yuca, cebada, guisantes y otros cultivos de raíces, tubérculos o semillas). Los cultivos de cereales ilustrativos usados en las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cualquier especie de hierba o planta de grano (por ejemplo, cebada, maíz, avena, arroz, arroz salvaje, centeno, trigo, mijo, sorgo, triticale, etc.), plantas no herbáceas (por ejemplo, lino de trigo sarraceno, legumbres o soya, etc.). Las plantas de granos que proporcionan semillas de interés incluyen plantas de semillas oleaginosas y plantas leguminosas. Otras semillas de interés incluyen semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno, etcétera. Las plantas de semillas oleaginosas incluyen algodón, soya, cártamo, girasol, Brassica, maíz, alfalfa, palma, coco, etcétera. Otros cultivos de semilla importantes son la colza, la remolacha azucarera, el maíz, el girasol, la soya y el sorgo. Las plantas leguminosas incluyen frijoles y guisantes. Los frijoles incluyen guar, algarrobo, fenogreco, soya, frijoles de jardín, caupí, frijol mungo, frijol lima, frijol fava, lentejas, garbanzos, etc.

Las plantas hortícolas a las que puede aplicarse la presente invención pueden incluir lechuga, escarola y brasicáceas vegetales lo que incluye col, brócoli y coliflor, y claveles y geranios. La presente invención también puede aplicarse al tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, girasol, tomate, pimiento, crisantemo, álamo, eucalipto y pino.

La presente invención puede usarse para la transformación de otras especies de plantas, lo que incluye, pero no se limita a, canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), alfalfa (*Medicago sativa*), centeno (*Secale cereales*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*), tabaco de árbol (*Nicotiana glauca*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), Coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), aceituna (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), marañón (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*), hierba mora negra europea (*Solanum nigrum*), Petunia (*Petunia x hybrida*), avena, cebada, mijo, frutas, verduras, plantas ornamentales, césped y coníferas.

Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie autopolinizada o híbrida y descendientes, y cualquier parte de cualquiera de estos, tales como esquejes, semillas. La invención proporciona cualquier propágulo vegetal que es cualquier parte que puede usarse en la reproducción o propagación, sexual o asexual, lo que incluye esquejes, semillas y así sucesivamente. Se abarca además por la invención una planta que es un vástago, clon o descendiente de una planta propagado sexual o asexualmente de una planta o cualquier parte o propágulo de dicha planta, vástago, clon o descendiente de ese tipo. También se proporcionan extractos de plantas y derivados.

A lo largo de esta solicitud, una planta, parte de planta, semilla o célula vegetal transformada con, o transformada de manera intercambiable por, un constructo o transformada con o por un ácido nucleico debe entenderse como que significa una planta, parte de planta, semilla o célula vegetal que porta dicho constructo o dicho ácido nucleico como un transgén debido al resultado de una introducción de dicho constructo o dicho ácido nucleico por medios biotecnológicos. La planta, parte de la planta, semilla o célula vegetal comprende por lo tanto dicho constructo recombinante o dicho ácido nucleico recombinante. Cualquier planta, parte de planta, semilla o célula vegetal que ya no contenga dicho constructo recombinante o dicho ácido nucleico recombinante después de su introducción en el pasado, se denomina segregante nulo, nulizigoto o control nulo, pero no se considera una planta, parte de planta, semilla o célula vegetal transformada con dicho constructo o con dicho ácido nucleico en el sentido de esta solicitud.

En una modalidad, la tirosina es endógena a un organismo o parte de un organismo de la presente invención. En otra modalidad, un organismo o parte de un organismo de la presente invención sintetiza tirosina. En otra modalidad, un organismo o parte de un organismo de la presente invención se modifica genéticamente para producir tirosina. En otra modalidad, un organismo o parte de un organismo de la presente invención se proporciona o alimenta con tirosina. En otra modalidad, un organismo o parte de un organismo que comprende tirosina endógena se modifica genéticamente como se describe en la presente descripción para producir mayores cantidades de tirosina, lo que aumenta de esta manera la producción de L-DOPA o betalaína. En otra modalidad, se alimenta tirosina a un organismo o parte de un organismo que comprende tirosina endógena para tener mayores cantidades de tirosina disponible, lo que aumenta de esta manera la producción de L-DOPA o betalaína.

Métodos de extracción de L-DOPA y betalaínas

En una modalidad, los métodos de la presente invención proporcionan además métodos de extracción de L-DOPA o betalaínas como se describe más abajo en la presente descripción en el Ejemplo 1, así como también mediante el uso de otros métodos de extracción de L-DOPA o betalaína conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, Misra y Wagner (Indian J Biochem Biophys. 2007 Feb;44(1):56-60).

En otra modalidad, la L-DOPA o las betalaínas se extraen de cultivos de algas, levaduras o bacterias mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para recolectar L-DOPA o betalaínas que comprende las etapas de producir L-DOPA o betalaínas como se describe en la presente descripción y que comprende además la etapa de extraer dicha L-DOPA o dicha betalaína de la planta, parte de la planta, colonia, órgano, tejido o células que producen dicha L-DOPA o dicha betalaína. En una modalidad, la parte de la planta es una hoja, tallo, raíz, flor, semilla, tubérculo o fruto.

En una modalidad, la L-DOPA o betalaína se extrae de la raíz de una planta. En una modalidad, la L-DOPA o betalaína se secreta a través de las raíces de una planta a un líquido u otro medio y después se recolecta del líquido u otro medio. En otra modalidad, la L-DOPA o betalaína se extrae del medio de una suspensión de células vegetales, tal como tabaco BY2.

En otra modalidad, se extrae L-DOPA o betalaína de una planta de agua. En una modalidad, la planta de agua es una Lemna. En una modalidad, la Lemna es *Lemna aequinoctialis*; *Lemna perpusilla*; *Lemna*; *Lemna gibba*; *Lemna minor*; *Lemna trisulca* *Uninerves*; *Lemna minuta*; *Lemna valdiviana*; *Lemna japonica*; *Lemna obscura*; *Lemna tenera*; *Lemna turionifera*; *Lemna yungensis*, o una de sus combinaciones.

Polipéptidos

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico codificado por un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD6. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6 comprende:

MDNATLAVILSFVYHIFKSFFTNSSSRRLPPGPKPVPIFGNIFDLGEKPHRSFANLSKIHG
 PLISLKLGSVTTIVVSSASVAEEMFLKNDQALANRTIPDSVRAGDHDKLSMSWLPVSQKW
 5 RNMRKISAVQLLSNQKLDASQPLRQAKVKQLLSYVQVCSEKMQPVDIGRAAFTTSLNLLS
 NTFFSIELASHESASQEFKQLMWNIMEEIGRPNYADFFPILGYIDPFGIRRRLAGYFDKLID
 VFQDIIRERQKLRSSNSSGAKQTNDILDITLLKLHEDNELSMPEINHLLVDIFDAGTDTTAST
 10 LEWAMAELVKNPEMMTKVQIEIEQALGKDCLDIQESDISKLPLYLQAIKETLRLHPPTVFLL
 PRKADNDVELYGYVVPKNAQVLVNLWAIGRDPKVKWKNPEVFSERFLDCNIDYKGRDFE
 LLPFGAGRRICPGLTLAYRMLNMLATLLQNYNWKLEDGINPKDLDMDDEKFGITLQKVK
 15 PLQVIPVPRN (SEQ ID NO: 18).

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico codificado por un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1 comprende:

MDHATLAMILAIWFISFHFIKLLFSQQTTKLLPPGPKPLPIIGNILEVGKKPHRSFANLAKIH
 GPLISLRLGSVTTIVVSSADVAKEMFLKKDHPLSNRTIPNSVTAGDHHKLTMSWLPVSPK
 25 WRNFRKITAVHLLSPQRLDACQTFRHAKVQQLYEYVQECAQKGQAVDIGKAAFTTSLNL
 LSKLFFSVELAHHKSHTSQEFKELIWNIMEDIGKPNYADYFPILGCVDPSGIRRRRLACSFDK
 30 LIAVFQGIICERLAPDSSTTTTTTTTTDDVLDVLLQLFKQNELTMGEINHLLVDIFDAGTDTTSS
 TFEWVMTELIRNPEMMEKAQEEIKQVLGKDKQIQESDIINLPYLQAIKETLRLHPPTVFLL
 PRKADTDVELYGYIVPKDAQILVNLWAIGRDPNAWQNADIFSPERFIGCEIDVKGRDFGLL
 35 PFGAGRRICPGMNLAIRMLTLMLATLLQFFNWKLEGDISPKDLDMDDEKFGIALQKTKPLK
 LIPIPRY (SEQ ID NO: 14).

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico codificado por un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD). En una modalidad, la enzima DOD es DODA1 de *Beta vulgaris* (BvDODA1). En una modalidad, la secuencia de aminoácidos que codifica BvDODA1 comprende:

MKMMNGEDANDQMIKESFFITHGNPILTVEDTHPLRPFFETWREKIFSKKPKAILIISGHWE
 TVKPTVNAVHINDTIHDFDDYPAAMYQFKYPAPGEPELARKVEEILKKSGFETAETDQKR
 GLDHGAWVPLMLMYPEADIPVCQLSVQPHLDGTYHYNLGRALAPLKNLGVLIIGSGSAT
 50 HPLDETPHYFDGVAPWAAAFDSWLRKALINGRFEENVNIYESKAPNWKLAHPFPEHFYPLH
 VVLGAAGEKWKAELIHSSWDHGTLCCHGSYKFTSA (SEQ ID NO: 42).

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico codificado por un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT). En una modalidad, la secuencia de aminoácidos que codifica cDOPA5GT comprende:

MTAIKMNTNGETQHILMIPFMAQGHLRPFLELAMFLYKRSHVITLLTTPLNAGFLRHL
 LHHHSYSSSGRIVELPFNSTNHGLPPGIENTDKLTLPVSLFHSTISLDPHLRDYISRHFSP
 5 ARPPLCVIHDVFLGWVDQVAKDVGSTGVVFTTGGAYGTSAYVSIWNDLPHQNYSDDEQEF
 PLPGFPENHKFRRSQLHRFLRYADGSDDWSKYFQPQLRQSMKSFGWLCNSVEEIETLGFISI
 10 LRNYTKLPWIGIGPLIASPVQHSSDNNSTGAEFVQWLSLKEPDSVLYISFGSQNTISPTQM
 MELAAGLESSEKPFLWVIRAPFGFDINEEMRPEWLPEGFEERMKVKKQGKLVYKLGPKLE
 ILNHESIGGFLTHCGWNSILESLREGVPMLGWPLAAEQAYNLKYLEDEMGVAVELARGLE
 15 GEISKEKVKRIVEMILERNEGSKGWEMKNRAVEMGKKLKDAVNEEKELKGSSVKAIDDF
 LDAVMQAKLEPSLQ (SEQ ID NO: 43).

En una modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, y una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, y una secuencia de aminoácidos que codifica una enzima DOD. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1 y una secuencia de aminoácidos que codifica una enzima DOD. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1 y una secuencia de aminoácidos que codifica una enzima DOD. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1 y una secuencia de aminoácidos que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, una secuencia de aminoácidos que codifica una enzima DOD y una secuencia de aminoácidos que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1, una secuencia de aminoácidos que codifica una enzima DOD y una secuencia de aminoácidos que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En otra modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD1, una secuencia de aminoácidos que codifica una enzima DOD y una secuencia de aminoácidos que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En otra modalidad, cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente en la presente descripción comprende además una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína. En una modalidad, la glucosiltransferasa relacionada con la betalaína es ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa o betanidin-5-O-glucosiltransferasa. En una modalidad, la ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa es gen ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa* (cDOPA5GT) (SEQ ID NO: 43).

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico codificado por un polinucleótido recombinante como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, o una de sus combinaciones, en donde dichas proteínas se expresan en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende CYP76AD1, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichas proteínas se expresan en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en donde dichas proteínas se expresan en tándem.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, CYP76AD1, o una de sus combinaciones, una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y, opcionalmente, una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína, en donde dichas proteínas se expresan en tándem.

En una modalidad, un polipéptido o proteína "quimérico" o de "fusión" es un polipéptido o proteína creado mediante la unión de dos o más genes que originalmente codificaban proteínas separadas.

Debe entenderse que de acuerdo con la presente invención, los polipéptidos CYP76AD6 y similares a CYP76AD6 de plantas distintas de *Beta vulgaris* pueden usarse en lugar de CYP76AD6 de *Beta vulgaris* en las composiciones y métodos descritos en la presente descripción. En una modalidad, el polipéptido similar a CYP76AD6 es de Caryophyllales. En una modalidad, el polipéptido similar a CYP76AD6 es un homólogo dentro del clado CYP76AD1-beta, como se describe en Brockington y otros, (2015) (New Phytol. 2015 Sep;207(4):1170-80).

En una modalidad, puede usarse CYP76AD15 o un homólogo, isoforma o variante de este en lugar de CYP76AD6 en las composiciones y métodos de la presente invención. CYP76AD15 de *Mirabilis jalapa* tiene una función similar al CYP76AD6 de *Beta vulgaris*. En una modalidad, CYP76AD15 es una enzima implicada en la conversión de tirosina en L-DOPA. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de CYP76AD15 comprende:

```
MENTMLGVILATIFLTFHIMKMLFSPSKVKLPPGPRPLPIIGNILELGDKPHRSFANLAKIHG
PLVTLKLGSVTTIVVSSEVAKEMFLKNDQPLANRTIPDSVRAGNHDKLSMSWLPVSPKW
RNLRKISAVQLLSTQRLDASQAHRQAKIKQLIEYVKKCSKIGQYVDIGQVAFTTSLNLLSN
TFFSKELASFSDNAQEFKQLMWCIMEEIGRPNYADYFPILGYVDPFGARRRLSR YFDQLI
EVFQVIIRERLTHDNNIVGNNNDVLATLLDLYKQNELTMDEINHLLVDIFDAGTDTTASTL
EWAMSELIKNPHIMAKAQEEVRRATMSHGGATVAEIQESDINNLPYIQSIKETLRLHPPTV
FLLPRKADVDVQLFGYVVPKNAQVLVNLWAIGRDPNVWPDPEVFSPEFMDCEIDVKGR
DFELLPGAGRRICPGLSLAYRMLNMLANMVHSFDWKLPGVENGSGSEMDSLDMDEKF
GITLQKVQPLKVIPVSRK (SEQ ID NO: 44).
```

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, u otro polipéptido como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido no natural que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, u otro polipéptido como se describe en la presente descripción. En una modalidad, la secuencia CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, es una secuencia modificada. En una modalidad, es una secuencia potenciada. En una modalidad, es una secuencia optimizada.

En una modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende opcionalmente CYP76AD6. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de CYP76AD6 es como se expone en SEQ ID NO: 18. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 18. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 18. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 18. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 18. En otra modalidad, el CYP76AD6 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende opcionalmente CYP76AD15. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de CYP76AD15 es como se expone en SEQ ID NO: 44. En otra modalidad, el CYP76AD15 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 44. En otra modalidad, el CYP76AD15 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 44. En otra modalidad, el CYP76AD15 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 44. En otra modalidad, el CYP76AD15 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 44.

En otra modalidad, el CYP76AD15 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 44.

En una modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende opcionalmente CYP76AD1. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de CYP76AD1 es como se expone en SEQ ID NO: 14. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 14. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 14. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es

un fragmento de SEQ ID NO: 14. En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 14.

5 En otra modalidad, el CYP76AD1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 14.

10 En una modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende opcionalmente BvDODAI. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de BvDODAI es como se expone en SEQ ID NO: 42. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 42. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 42. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 42. En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 42.

15 En otra modalidad, el BVDODA1 usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 42.

20 En una modalidad, un polipéptido de la presente invención comprende opcionalmente cDOPA5GT. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos de cDOPA5GT es como se expone en SEQ ID NO: 43. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 43. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es una variante de SEQ ID NO: 43. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es un fragmento de SEQ ID NO: 43. En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es una isoforma de SEQ ID NO: 43.

25 En otra modalidad, el cDOPA5GT usado en métodos y composiciones de la presente invención es un homólogo funcional, una variante funcional, un fragmento funcional o una isoforma funcional de SEQ ID NO: 43.

30 En algunas modalidades, "polipéptido", "polipéptido manipulado por ingeniería genética" o "proteína" como se usa en la presente, abarca polipéptidos naturales (productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como también peptoides y semipeptoides que son análogos de polipéptidos, que tienen, en algunas modalidades, modificaciones que hacen que los polipéptidos sean incluso más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar a las células.

35 En algunas modalidades, las modificaciones incluyen, pero no se limitan a modificación del extremo C terminal, modificación de enlaces polipeptídicos, lo que incluye, pero no se limita a, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la cadena principal, y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos se conocen bien en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). A continuación se proporcionan más detalles al respecto.

45 En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido se sustituyen. En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces cetometileno (-CO-CH₂-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces tioamida (-CS-NH-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por dobles enlaces olefinicos (-CH=CH-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces retro amida (-NH-CO-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por derivados polipeptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", presente naturalmente en el átomo de carbono. En algunas modalidades, estas modificaciones se producen en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica y en una modalidad en varios (2-3 enlaces) al mismo tiempo.

60 En algunas modalidades, los aminoácidos aromáticos naturales del polipéptido tales como Trp, Tyr y Phe, se sustituyen por ácidos sintéticos no naturales tales como fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados de Phe metilados en el anillo, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr. En algunas modalidades, los péptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, etcétera).

65 En una modalidad, "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos naturales; los aminoácidos frecuentemente modificados postraduccionalmente *in vivo*, lo que incluye, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales, lo que incluye, pero no se limita a, ácido

2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. En una modalidad, "aminoácido" incluye D- y L-aminoácidos.

En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención se usan en agentes terapéuticos que requieren que los polipéptidos estén en una forma soluble. En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos polares naturales o no naturales, que incluyen, pero no se limita a, serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

En algunas modalidades, el polipéptido manipulado por ingeniería genética de la presente invención se usa en una forma lineal, aunque un experto en la técnica apreciará que en los casos en los que la ciclación no interfiere severamente con las características de los polipéptidos manipulados por ingeniería genética, también pueden usarse las formas cíclicas de los polipéptidos manipulados por ingeniería genética.

En algunas modalidades, los polipéptidos manipulados por ingeniería genética de la presente invención se sintetizan bioquímicamente tal como mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. En algunas modalidades, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, o síntesis clásica en solución.

En algunas modalidades, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar los polipéptidos manipulados por ingeniería genética de la presente invención. En algunas modalidades, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, más largos que 18-25 aminoácidos). En algunas modalidades, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de grandes cantidades de los polipéptidos manipulados por ingeniería genética de la presente invención. En algunas modalidades, las técnicas recombinantes se describen por Bitter y otros, (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier y otros (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson y otros (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu y otros (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi y otros (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli y otros, (1984) *Science* 224:838-843, Gurley y otros, (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido del clado CYP76AD1-β. En una modalidad, el polipéptido del clado CYP76AD1-β es CYP76AD6. En otra modalidad, el polipéptido del clado CYP76AD1-β es CYP76AD15. En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido del clado CYP76AD1-β pero que excluye la secuencia de aminoácidos de los parálogos de CYP76AD1 de la remolacha azucarera conocidos como Bv9_228610_yqeq o Bv9_228860_ickx, que no producen betaxantina cuando se transforman en levadura con DOD. En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido del clado CYP76AD1-β pero que excluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
MDNATLAVILSFVYHIFKSFFTNSRRRLPPGPKPVPIFGNIFDLGEKPHRSFANLSKIHG
PLISLKLGSVTTIVVSSASVAEEMFLKNDQALANRTIPDSVRAGDHDKLSMSWLPVSQKW
RNM RKISAVQLLSNQKLDASQPLRQTKVKQLLSYVQDCSKKMQPDIGRAAFTTSLNLLS
NTFFSIELASHESSASQEFKQLMWNIMEEIGRPNYADFFPILGYIDPFGIRRLAGYFDKLI
VFQDIIRERQKLRSSNSSGAKQTNDILD TLLKLHEDNELSMPEINHLLVDIFDAGTDTTAST
LEWAMAELVKNPEMMTKVQIEIEQALGKDCLDIQESDISKLPLYLQGIKETLRLHPPTVFL
PRKADNDVELYGYVVPKNAQVLVNLWAIGRDPKVWKNPEVFSRFLDCNIDYKGRDFE
LLPFGAGRRICPGLTLAYRMLNLMLATLLQNYNWKLEDGINPKDLDMDEKFGITLQKVK
PLQVIPVPRN (SEQ ID NO: 34).
```

En una modalidad, la presente invención proporciona métodos que comprenden la etapa de "poner en contacto" la tirosina con uno o más polipéptidos como se describe en la presente descripción. En una modalidad, dicha etapa de poner contacto se realiza in vitro en condiciones que permiten la producción de L-DOPA o betalainas, como se describe en la presente descripción.

Recuperación de polipéptidos

En una modalidad, los métodos de la presente invención proporcionan además métodos de extracción de betalainas o L-DOPA a partir de plantas como se describe más abajo en la presente descripción en el Ejemplo 1, así como también el uso de otros métodos de extracción de betalainas conocidos en la técnica. En otra modalidad, las

betalaínas se extraen de cultivos de algas, levaduras o bacterias mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En una modalidad, el cultivo de algas, levaduras o bacterias se modifica genéticamente para expresar betalaínas o L-DOPA.

5 En una modalidad, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación de un polipéptido.

En una modalidad, la frase "recuperar el polipéptido" usada en la presente descripción se refiere a recolectar todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no necesariamente implica etapas adicionales de separación o purificación.

10 En una modalidad, los polipéptidos de la presente invención se purifican mediante el uso de una variedad de técnicas estándar de purificación de proteínas, tales como, pero no se limita a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía por interacciones hidrofóbicas, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatografía de enfoque y solubilización diferencial.

15 En una modalidad, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede manipularse por ingeniería genética para codificar el polipéptido de la presente invención y un resto escindible fusionado. En una modalidad, una proteína de fusión puede diseñarse de manera que el polipéptido se pueda aislar fácilmente mediante cromatografía de afinidad; por ejemplo, mediante inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una modalidad, un sitio de escisión se manipula por ingeniería genética entre el polipéptido genéticamente modificado y el resto escindible y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica mediante el tratamiento con una enzima o agente adecuados que escinden específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, ver Booth y otros, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); y Gardella y otros, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

20 En una modalidad, el polipéptido de la presente invención se recupera en una forma "sustancialmente pura".

30 En una modalidad, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso efectivo de la proteína en las aplicaciones descritas en la presente descripción.

En una modalidad, el polipéptido de la presente invención puede sintetizarse, además, mediante el uso de sistemas de expresión *in vitro*. En una modalidad, los métodos de síntesis *in vitro* se conocen bien en la técnica y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

35 Los métodos de producción de betaxantinas *in vitro* mediante el uso de una enzima DOD con su sustrato L-DOPA y la adición de aminoácidos se describieron en Sekiguchi y otros, (2010) (Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 12504-12509). En una modalidad, el presente método de síntesis *in vitro* de betalaínas es como se describió en Sekiguchi y otros pero con la etapa adicional de sintetizar L-DOPA a partir de tirosina en lugar de proporcionar L-DOPA como se describió en Sekiguchi y otros.

40 En una modalidad, la producción *in vitro* de betalaínas rojo púrpura (betacianinas) se realiza mediante el uso de las mismas o similares condiciones que para la producción de betaxantinas, excepto que la enzima CYP76AD1 se proporciona junto con la enzima DOD y el sustrato puede ser tirosina o L-DOPA. En una modalidad, se puede añadir el cofactor NADPH para activar la enzima CYP76AD1.

45 En algunas modalidades, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y purifican; su eficacia terapéutica puede analizarse *in vivo* o *in vitro*.

50 Composiciones Farmacéuticas

En otra modalidad, proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido recombinante o un polipéptido quimérico de la presente invención. En una modalidad, los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

55 En una modalidad, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente descripción con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

60 En una modalidad, "ingrediente activo" se refiere al polinucleótido recombinante o al polipéptido quimérico, que es responsable del efecto biológico o bioquímico.

65 En otras modalidades, la composición comprende componentes adicionales. En una modalidad, dichos componentes adicionales pueden comprender portadores o diluyentes lo que incluye, pero no se limita a, una goma,

un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco, o mezclas de estos.

En otras modalidades, los portadores farmacéuticamente aceptables para las formulaciones líquidas son soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen una solución salina y medios tamponados. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino, o un lípido de la leche o de huevos.

En otra modalidad, los vehículos parenterales (para la inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactato y aceites no volátiles. Los vehículos para administración intravenosa incluyen reabastecedores de fluido y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un surfactante y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino, o un lípido de la leche o de huevos.

En otras modalidades, las composiciones pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasas, surfactantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), potenciadores de la permeabilidad, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilén glicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato de sodio), adyuvantes de flujo (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato de sodio), recubrimientos de polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes. Cada uno de los excipientes anteriores representa una modalidad separada de la presente invención.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el antígeno se libera durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipofílicos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra modalidad, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir una composición en la que todo el antígeno se libera inmediatamente después de la administración.

En otra modalidad, la composición farmacéutica se suministra en un sistema de liberación controlada. En otra modalidad, el agente se administra mediante el uso de infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En otra modalidad, se usa una bomba (ver Langer, más arriba; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald y otros, Surgery 88:507 (1980); Saudek y otros, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra modalidad, se usan materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas en o un implante.

Las composiciones también incluyen, en otra modalidad, la incorporación del material activo dentro o sobre las preparaciones de partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, eritrocitos fantasmas, o esferoplastos). Dichas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo*.

También se incluyen en la presente invención las composiciones de partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra los receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplado a ligandos de los receptores específicos de tejido.

La invención comprende además compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. Se conoce que los compuestos modificados exhiben semividas en sangre sustancialmente más largas después de una inyección intravenosa respecto a los compuestos no modificados correspondientes (Abuchowski y otros, 1981; Newmark y otros, 1982; y Katre y otros, 1987). Dichas modificaciones aumentan además, en otra modalidad, la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, potenciar la estabilidad física y química del compuesto, y reducir grandemente la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra modalidad, la actividad biológica *in vivo* deseada se logra mediante la administración de dichos aductos de polímero-compuesto con menos frecuencia o en dosis más bajas que con el compuesto sin modificar.

La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulado, o conformación de tabletas, se entiende bien en la técnica. Un componente activo, en otra modalidad, se formula dentro de la composición como formas de sales farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas (formadas con los grupos amino libres de la molécula de polipéptido o anticuerpo), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas de los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

Cada uno de los aditivos, excipientes, formulaciones y métodos de administración anteriores representa una modalidad separada de la presente invención.

En una modalidad, los métodos de la presente invención comprenden administrar un polinucleótido o polipéptido de la presente invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el polipéptido, en otra modalidad, pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como por vía parenteral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal o intravaginal. En otra modalidad, las composiciones de la presente invención se administran mediante inyección epidérmica, en otra modalidad, inyección intramuscular, en otra modalidad, inyección subcutánea, y en otra modalidad, inyección en la mucosa intrarrespiratoria.

En otra modalidad, de los métodos y composiciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral, y por tanto se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, granulados, gránulos y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad, de la presente invención, la composición se formula en una cápsula. En otra modalidad, las composiciones de la presente invención comprenden una cápsula de gelatina dura.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y por tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies corporales y por tanto se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares.

En otra modalidad, la composición farmacéutica se administra como un supositorio, por ejemplo, un supositorio rectal o un supositorio uretral. En otra modalidad, la composición farmacéutica se administra por implantación subcutánea de un gránulo. En otra modalidad, el gránulo proporciona la liberación controlada de un agente antigénico durante un período de tiempo.

En otra modalidad, la composición farmacéutica se suministra en una vesícula, por ejemplo, un liposoma.

Regeneración de plantas

En una modalidad, una planta transgénica de la presente invención se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión del constructo o constructos de ADN recombinante. La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a

partir de transformantes de protoplastos de una sola planta o de diversos explantes transformados se conoce bien en la técnica (ver Weissbach y Weissbach, En.: *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), 1988 Academic Press, Inc., San Diego, California.). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye típicamente las etapas de selección de células transformadas, cultivo de esas células individualizadas a través de las etapas habituales de desarrollo embrionario hasta la etapa de plántula enraizada. Los embriones y semillas transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan después en un medio de crecimiento de plantas apropiado tal como suelo.

Después de la transformación, las células vegetales transformadas con un vector de expresión vegetal pueden regenerarse, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido calloso o discos foliares de acuerdo con técnicas estándar de cultivo de tejido vegetal. Casi cualquier planta puede regenerarse completamente a partir de células, tejidos y órganos de la planta mediante el uso de métodos que se conocen en la técnica.

A continuación, las plantas transformadas pueden cultivarse y polinizarse con la misma cepa transformada o diferentes cepas, y el híbrido resultante tiene la expresión de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantenga y se herede de manera estable y después se cosechan las semillas para garantizar que se haya logrado la expresión de la característica fenotípica deseada.

En una modalidad, se regenera una célula vegetal para obtener una planta completa a partir del proceso de transformación. El término "cultivo" o "regeneración", como se usa en la presente descripción, significa cultivar una planta completa a partir de una célula vegetal, un grupo de células vegetales, una parte de una planta (lo que incluye las semillas) o una pieza de la planta (por ejemplo, a partir de un protoplasto, callo o parte del tejido).

La regeneración a partir de protoplastos varía de una especie a otra de plantas, pero generalmente se hace primero una suspensión de protoplastos. En ciertas especies, se puede inducir después la formación de embriones a partir de la suspensión de protoplastos. En una modalidad, los medios de cultivo contendrán diversos aminoácidos y hormonas, necesarios para el crecimiento y la regeneración. Los ejemplos de hormonas usadas incluyen auxinas y citoquininas. La regeneración eficiente dependerá del medio, del genotipo y de la historia del cultivo. Si se controlan estas variables, la regeneración es reproducible. La regeneración también se produce a partir de callos, explantes, órganos o partes de plantas.

En los cultivos de propagación de manera vegetativa, las plantas genéticamente modificadas maduras se propagan mediante el uso de esquejes o técnicas de cultivo de tejidos para producir múltiples plantas idénticas. Se realiza la selección de plantas genéticamente modificadas convenientes y se obtienen nuevas variedades y se propagan de manera vegetativa para su uso comercial.

En los cultivos propagados por semillas, las plantas genéticamente modificadas maduras pueden autocruzarse para producir una planta endogámica homocigótica. La planta endogámica resultante produce semillas que contienen la mutación genética. Estas semillas pueden cultivarse para producir plantas que produzcan el fenotipo seleccionado, por ejemplo, mayor crecimiento de raíces laterales, captación de nutrientes, crecimiento general de la planta y/o rendimientos vegetativos o reproductivos.

Las partes obtenidas de la planta regenerada, tales como flores, semillas, hojas, ramas, frutos y similares, se incluyen en la invención, siempre y cuando estas partes comprendan células que comprenden el ácido nucleico aislado de la presente invención. La progenie y variantes y mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen dentro del alcance de la invención, siempre y cuando estas partes comprendan las secuencias de ácido nucleico introducidas. En una modalidad, las plantas genéticamente modificadas que expresan un marcador seleccionable pueden examinarse para detectar la transmisión del ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, mediante técnicas estándar de inmunoelectrotransferencia y detección de ADN. En otra modalidad, las células vegetales genéticamente modificadas pueden evaluarse en los niveles de expresión del ácido nucleico genéticamente modificado. La expresión a nivel de ARN puede determinarse inicialmente para identificar y cuantificar las plantas con expresión positiva. Pueden emplearse técnicas estándar para el análisis de ARN e incluyen ensayos de amplificación por PCR mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar solo las plantillas de ARN genéticamente modificadas y ensayos de hibridación en solución mediante el uso de sondas específicas de ácido nucleico genéticamente modificadas. A continuación, las plantas positivas para el ARN pueden analizarse para determinar la expresión de proteínas mediante análisis de inmunoelectrotransferencia mediante el uso de los anticuerpos específicamente reactivos de la presente invención. Además, la hibridación *in situ* y la inmunocitoquímica de acuerdo con protocolos estándar pueden realizarse mediante el uso de sondas de polinucleótidos específicos de ácido nucleico modificados genéticamente y anticuerpos, respectivamente, para localizar sitios de expresión dentro del tejido genéticamente modificado. En una modalidad, se analizan varias líneas genéticamente modificadas para detectar el ácido nucleico incorporado para identificar y seleccionar las plantas con los perfiles de expresión más apropiados.

En una modalidad, la presente invención proporciona una planta genéticamente modificada que es homocigótica para el ácido nucleico introducido; es decir, una planta genéticamente modificada que contiene dos secuencias de

ácido nucleico añadidas, un gen en el mismo locus en cada cromosoma de un par de cromosomas. Una planta genéticamente modificada homocigótica puede obtenerse mediante el apareamiento sexual (autofecundación) de una planta genéticamente modificada heterocigótica que contiene un solo ácido nucleico genéticamente modificado añadido, la germinación de algunas de las semillas producidas y el análisis de las plantas resultantes producidas para determinar la expresión alterada de un polinucleótido de la presente invención con relación a una planta de control (es decir, natural, no modificada genéticamente). También se contemplan el retrocruzamiento con una planta original y el cruzamiento exogámico con una planta no modificada genéticamente.

Las células vegetales transformadas que se obtienen mediante cualquiera de las técnicas de transformación anteriores pueden cultivarse para regenerar una planta completa que posee el genotipo transformado. En una modalidad, dichas técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejidos.

Las plantas regeneradas que contienen el gen exógeno extraño que codifica una proteína de interés pueden propagarse posteriormente como se conoce bien en la técnica. El método particular de propagación dependerá del tejido vegetal inicial y de la especie de planta particular que se va a propagar.

En una modalidad, las plantas transformadas generadas se propagan clonalmente. En otra modalidad, las plantas transformadas generadas se propagan mediante técnicas de reproducción clásicas. En una modalidad particular, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. De cualquier otra manera, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas cultivadas con semillas de líneas agrónomicamente importantes, o el polen de plantas de estas líneas importantes se usa para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polipéptido deseado se cultiva mediante el uso de métodos bien conocidos para un experto en la técnica.

Productos de plantas genéticamente modificadas

En una modalidad, la presente invención proporciona un cultivo alimentario que comprende betalaínas. En una modalidad, el cultivo alimentario no comprende de forma endógena betalaínas. En otra modalidad, el cultivo alimentario comprende de forma endógena betalaínas y los métodos de la presente invención sirven para aumentar o potenciar la cantidad de betalaínas presentes en el cultivo alimentario.

En una modalidad, se potencia nutricionalmente un cultivo alimentario que comprende betalaínas o cantidades potenciadas de betalaínas. En una modalidad, un cultivo alimentario que comprende betalaínas o cantidades potenciadas de betalaínas comprende propiedades antioxidantes. En una modalidad, el consumo de un cultivo alimentario que comprende betalaínas o cantidades potenciadas de betalaínas protege a un sujeto de enfermedades o afecciones degenerativas. En una modalidad, el consumo de betalaínas o cultivos alimentarios que contienen betalaínas puede proteger a un sujeto del cáncer (por ejemplo, de piel, pulmón, cuello uterino, ovario y vejiga), cardiopatía o enfermedades neurodegenerativas. Las betalaínas también pueden inhibir la peroxidación de lípidos y la descomposición del hemo; prevenir la hemólisis oxidativa de los glóbulos rojos; y se unen a las lipoproteínas de baja densidad humanas lo que aumenta su resistencia a la oxidación.

En una modalidad, la presente invención proporciona frutas que comprende betalaínas de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona vegetales que comprenden betalaínas de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona órganos subterráneos, tales como papas, que comprenden betalaínas de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona jugos derivados de frutas o vegetales que comprenden betalaínas de la presente invención.

En una modalidad, los órganos de la planta o derivados de estos (tal como el jugo) comprenden, además de las betalaínas de la presente invención, antocianinas, carotenos naturales o manipulados por ingeniería genética, o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un suplemento dietético que comprende una betalaína producida mediante los métodos como se describe en la presente descripción o una planta o parte de una planta como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un aleloquímico que comprende L-DOPA producido mediante los métodos como se describen en la presente descripción o una planta o parte de una planta como se describe en la presente descripción.

Usos adicionales

La producción heteróloga de betalaínas permite la biofortificación y potenciación de las cualidades nutricionales de alimentos esenciales, así como también el desarrollo de nuevas variedades de plantas ornamentales. La vía biosintética simple de estos pigmentos, que se inicia desde el precursor ubicuo tirosina y requiere la expresión de dos o tres genes, permite la producción de estos pigmentos en numerosas especies de plantas u otras especies.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una planta ornamental, que comprende la etapa de: poner en contacto una célula vegetal con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y en condiciones suficientes para producir betalainas, en donde si dicha célula se pone en contacto con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y DOD y no con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6 o CYP76AD15, entonces dicha célula se pone en contacto con una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, lo que produce de esta manera una planta ornamental. En una modalidad, la planta no es una planta que expresa betalaina naturalmente. En una modalidad, la planta no es una planta Caryophyllales. En una modalidad, la especie de planta es: *Syngonium Podophyllum*, *Nephrolepis Exaltata 'Bostoniensis'*, *Phoenix Canariensis*, *Aglaonema*, *Asplenium Nidus*, *Rhapis Excelsa*, *Aspidistra Elatior*, *Nertera Granadensis*, *Pteris Cretica*, *Dieffenbachia Amoena*, *Chamaerops Humilis*, *Epipremnum Aureum*, *Codiaeum Variegatum*, *Alocasia Amazonica*, *Fiddle Leaf Fig - Ficus Lyrata*, *Alocasia Micholitziana*, *Philodendron Scandens*, *Dracaena Braunii*, *Adiantum Raddianum*, *Chamaedorea Elegans*, *Howea Forsteriana*, *Dracaena Marginata*, *Pachira Aquatica*, *Calathea Makoyana*, *Davallia Fejeensis*, *Calathea Roseopicta*, *Cycas Revoluta*, *Dracaena Reflexa*, *Calathea Lancifolia*, *Ficus Elastica*, *Howea Belmoreana*, *Planta araña-Chlorophytum comosum*, *Dionaea Muscipula*, *Peperomia Argyra*, *Aphelandra Squarrosa*, *Zamioculcas Zamiifolia*, *Tradescantia*, *Ficus Benjamina*, *Calathea Zebrina*, o un cactus.

En una modalidad, cambiar el color de una planta, y en particular el color de una flor de una planta, afectará a la polinización de la planta. En una modalidad, los métodos de la presente invención aumentarán o potenciarán la polinización de una planta. En otra modalidad, los métodos de la presente invención disminuirán la polinización de una planta. En otra modalidad, los métodos de la presente invención cambiarán los organismos que son atraídos por la planta, lo que cambia de esta manera la polinización de una planta. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar la polinización de una planta que comprende la etapa de insertar un polinucleótido recombinante o uno o más ácidos nucleicos de la presente invención en al menos una célula de dicha planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar la polinización de una planta, que comprende la etapa de: poner en contacto una planta con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que cambia de esta manera el color de la planta, lo que aumenta de esta manera la polinización de una planta. En una modalidad, la planta no es una planta que expresa betalaina naturalmente. En una modalidad, la planta no es una planta Caryophyllales.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención proporcionan métodos para cambiar el color de un organismo. En una modalidad, el organismo es un pez.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención proporcionan un método para producir un organismo en el que una o más partes de dicho organismo son de color rojo púrpura que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de dicho organismo con un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, en donde dichos ácidos nucleicos se insertan en el marco del polinucleótido.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención proporcionan un método para producir un organismo en el que una o más partes de dicho organismo son amarillas y comprende la etapa de poner en contacto una o más células de dicho organismo con un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un CYP76AD6 y un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en donde dichos ácidos nucleicos se insertan en el polinucleótido en marco.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención proporcionan un método para producir un organismo en el que una o más partes de dicho organismo son de color naranja, que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de dicho organismo con un polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica a CYP76AD6, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, en donde dichos ácidos nucleicos se insertan en el polinucleótido en marco.

En una modalidad, el organismo es un pez. En una modalidad, el pez es un pez ornamental.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un pez ornamental que comprende poner en contacto una célula de un pez con un polinucleótido que codifica un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, un ácido nucleico que codifica CYP76AD15, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en donde si dicha célula se pone en contacto con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y un ácido nucleico que codifica DOD y no un ácido

nucleico que codifica CYP76AD6 o un ácido nucleico que codifica CYP76AD15, dicha célula también se pone en contacto con un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una planta que expresa una betalaína, que comprende la etapa de: poner en contacto una o más células de dicha planta con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), examinar dicha una o más células para identificar células que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico y regenerar plantas o partes de plantas a partir de dichas células, lo que produce de esta manera una planta que expresa una betalaína.

En una modalidad, la planta no expresa naturalmente una betalaína. En otra modalidad, la planta expresa una betalaína y los métodos de la presente invención se usan para aumentar la cantidad de una o más betalaínas que se expresa por la planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un cultivo alimentario que expresa una betalaína, que comprende la etapa de: poner en contacto una o más células de una planta de cultivo alimentario con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, y una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), examinar dicha una o más células para identificar células que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico, y regenerar plantas o partes de plantas a partir de dichas células, lo que produce de esta manera un cultivo alimentario que expresa una betalaína.

En una modalidad, un "cultivo alimentario" o un "cultivo agrícola" es una planta cultivada intencionalmente con el propósito principal de ser consumida por seres humanos o animales. En una modalidad, el cultivo alimentario es plátano, ñame, sorgo, boniato, soya, yuca, arroz, trigo o maíz. En otra modalidad, el cultivo alimentario es berenjena, pimiento, brócoli, calabresa, trigo sarraceno, maíz, cebada, uvas, bayas, tomates, pepinos, alcachofa, cebolla, ruibarbo, moras, arándanos, calabacín, rábanos, zanahorias, coles de Bruselas, lechuga, melones, frijoles, guisantes, granos, maní, caña de azúcar, sandía, papaya, manzana, pera, durazno, cereza, fresa o calabaza.

En una modalidad, la fuerte actividad antioxidante de las betalaínas es beneficiosa para la salud humana.

Se han estudiado ampliamente por sus posibles propiedades promotoras de la salud, lo que incluye las actividades anticancerígenas, hipolipídicas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras y antidiabéticas. Por tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar o suprimir el cáncer, la hiperlipidemia, la inflamación, la enfermedad hepática y la diabetes que comprende la etapa de alimentar a un sujeto que lo necesita con una planta o parte de la planta de la presente invención, que expresa betalaínas, betacianinas y/o betaxantinas, lo que trata o suprime de esta manera el cáncer, la hiperlipidemia, la inflamación, la enfermedad hepática o la diabetes en dicho sujeto.

En una modalidad, la ingestión por un sujeto de un cultivo alimentario de la presente invención que comprende betalaínas o cantidades potenciadas de betalaínas protege a los sujetos contra lesiones inflamatorias-inmunes (lo que incluye, pero no se limita a, glomerulonefritis, vasculitis, enfermedad autoinmune, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria del intestino, pancreatitis); cáncer (lo que incluye, pero no se limita a, cáncer inducido por radiación, carcinoma de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, promotores de la carcinogénesis, cáncer en la enfermedad inflamatoria del intestino); isquemia/reoxigenación (lo que incluye, pero no se limita a, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, trasplante de órganos (corazón, pulmón, piel, córnea, riñón), preservación de órganos, reinserción de extremidades amputadas, congelación, contractura de Dupuytren, choque hemorrágico, choque endotóxico, lesión por aplastamiento); sobrecarga de metales (lo que incluye, pero no se limita a, hemocromatosis, talasemia, kwashiorkor, quimioterapia para leucemias, insuficiencia hepática fulminante, enfermedad de Wilson, sobrecarga de hierro inducida por alcohol, carcinogénesis inducida por níquel, envenenamiento por plomo); toxinas (lo que incluye, pero no se limita a, fármacos hemolíticos, plomo, hidrocarburos halogenados, ozono, óxidos de nitrógeno, amianto, otros polvos minerales, dióxido de azufre, paraquat, aluminio, humo de cigarrillo, fármacos diabetogénicos, habas (agentes hemolíticos), antraciclinas (cardiotoxicidad), metales pesados (nefrotoxicidad), medicamentos fotosensibilizantes, dermatitis por contacto); trastornos oculares (lo que incluye, pero no se limita a, desarrollo de cataratas, deterioro después de una hemorragia ocular, daño fotoquímico de la retina, retinopatía del prematuro (fibroplasia retrolental)); enfermedad congénita (lo que incluye, pero no se limita a, porfirias, anemia de células falciformes, anemia de Fanconi, lipofuscinosis cerioide neuronal, talasemia); protección antioxidante insuficiente (lo que incluye, pero no se limita a, enfermedad de Keshan (deficiencia severa de selenio), enfermedad hemolítica del prematuro, retinopatía del prematuro, displasia broncopulmonar, hemorragia intracraneal, degeneración neurológica debido a deficiencia severa de vitamina E (en errores congénitos que afectan la absorción de grasa intestinal), síndrome de inmunodeficiencia adquirida); trastornos del cerebro y del sistema nervioso central (lo que incluye, pero no se limita a, accidente cerebrovascular, traumatismos, neurotoxicidades (por ejemplo, del aluminio), efectos del oxígeno hiperbárico, enfermedad de Parkinson, potenciación de lesiones traumáticas, paludismo cerebral).

En otra modalidad, la presente invención proporciona nuevas formas de producir betalaínas en especies que no expresan betalaínas naturalmente, en las que las betalaínas pueden usarse como un colorante alimentario natural. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un colorante alimentario natural que comprende betalaínas producidas como se describe en la presente descripción. En una modalidad, las betalaínas se extraen de plantas que expresan betalaína como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, las betalaínas se producen in vitro en una línea celular. La producción heteróloga de betalaínas permite la biofortificación y potenciación de las cualidades nutricionales de los alimentos esenciales.

En otra modalidad, los métodos de la presente invención pueden usarse para potenciar la calidad estética de un cultivo o producto alimentario al cambiar su color mediante la manipulación por ingeniería genética de una planta para expresar una o más betalaínas.

Por tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona métodos para tratar o suprimir las enfermedades, los trastornos y las afecciones mencionadas anteriormente que comprenden la etapa de proporcionar a un sujeto un cultivo alimentario que se ha modificado genéticamente para expresar betalaínas, como se describe en la presente descripción. En otra modalidad, la presente invención proporciona usos de polinucleótidos, ácidos nucleicos y otras composiciones descritas en la presente descripción en la preparación de una composición para tratar o suprimir las enfermedades, los trastornos y las afecciones mencionadas anteriormente. En una modalidad preferida, la composición es una composición farmacéutica. En otra modalidad, la presente invención proporciona polinucleótidos, ácidos nucleicos y otras composiciones descritas en la presente descripción para su uso en el tratamiento o supresión de las enfermedades, los trastornos y las afecciones mencionadas anteriormente en la presente descripción.

En otra modalidad, un cultivo alimentario que comprende betalaínas o cantidades potenciadas de betalaínas tiene una mayor vida útil en comparación con el mismo cultivo alimentario que carece de betalaínas o que tiene un nivel más bajo de betalaínas. En otra modalidad, un cultivo alimentario que comprende betalaínas o cantidades potenciadas de betalaínas tiene mayor resistencia a enfermedades fúngicas en comparación con el mismo cultivo alimentario que carece de betalaínas o que tiene un nivel más bajo de betalaínas.

En otra modalidad, las betalaínas producidas mediante los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para la conservación de alimentos.

Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona métodos para aumentar la vida útil de un cultivo alimentario que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de una planta de cultivo alimentario que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas y aumenta la vida útil de dicho cultivo alimentario.

Dentro del reino vegetal, las betalaínas se encuentran en un solo grupo de angiospermas, las Caryophyllales. En este orden, las betalaínas y las antocianinas se presentan de forma mutuamente excluyente, es decir, ninguna especie vegetal produce ambos tipos de pigmentos. Una de las características más destacadas del orden Caryophyllales es su dominancia en regiones áridas y semiáridas, y su asentamiento en suelos salinos y alcalinos. Si bien algunas familias dentro de los Caryophyllales se distribuyen en todo el mundo en una variedad de hábitats, los miembros de varias familias están particularmente adaptados a las regiones áridas o salinas, lo que incluye las Aizoaceae (familia de las plantas de hielo), Portulacaceae (familia de las verdolagas) y, en particular, las Cactaceae (familia de los cactus; www.britannica.com/plant/Caryophyllales). Más abajo en la presente descripción, se usó la producción de betalaína heteróloga en plantas para estudiar las funciones de estos pigmentos en conferir tolerancia a diferentes señales de estrés abiótico que están asociadas con regiones áridas tales como sequía, alta radiación ultravioleta, exceso de luz y alta salinidad y como compuestos de defensa de las plantas que actúan contra hongos patógenos.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para aumentar la resistencia de un organismo o parte de un organismo a uno o más factores de estrés que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células de dicho organismo con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalaínas, lo que produce de esta manera betalaínas y aumenta la resistencia de dicho organismo o dicha parte de un organismo a dichos uno o más factores de estrés. En una modalidad, el organismo es una planta. En una modalidad, el organismo comprende tirosina. En una modalidad, el factor de estrés es un factor de estrés abiótico. En otra modalidad, el factor de estrés es una presión osmótica alta, un estado de salinidad alta o una de sus combinaciones. En otra modalidad, el factor de estrés es la sequía. En otra modalidad, el factor de estrés es el exceso de luz. En una modalidad, la parte de la planta es una semilla. En una modalidad, la planta es un cultivo alimentario.

En una modalidad, el método comprende la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para aumentar la resistencia de una planta o parte de una planta a una presión osmótica alta que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que produce de esta manera betalainas y aumenta la resistencia de dicha planta o parte de la planta a una presión osmótica alta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para aumentar la resistencia de una planta o parte de una planta a condiciones de alta salinidad que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta que comprende tirosina con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que produce de esta manera betalainas y aumenta la resistencia de dicha planta o parte de la planta a condiciones de alta salinidad.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar las tasas de germinación de semillas en una planta que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta con un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica DODA1 y un ácido nucleico que codifica cDOPA5GT, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que aumenta de esta manera las tasas de germinación de las semillas en dicha planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para aumentar la resistencia de un organismo o parte de un organismo a una o más enfermedades fúngicas que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células de dicho organismo con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que produce de esta manera betalainas y aumenta la resistencia de dicho organismo o dicha parte de un organismo a dichas una o más enfermedades fúngicas. En una modalidad, el organismo comprende tirosina. En una modalidad, el organismo es una planta. En una modalidad, la planta es un cultivo alimentario.

En una modalidad, el hongo que provoca dicha enfermedad fúngica es un hongo fitopatógeno. En una modalidad, el hongo que provoca dicha enfermedad fúngica es *Botrytis cinerea*. En una modalidad, la planta es una planta de tabaco. En una modalidad, la parte de la planta es la hoja.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para aumentar la resistencia de una planta o parte de una planta a una o más enfermedades fúngicas que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que produce de esta manera betalainas y aumenta la resistencia de dicha planta o parte de la planta a una o más enfermedades fúngicas. En una modalidad, la planta es un cultivo alimentario.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para disminuir el área de la lesión debido a una enfermedad fúngica en una planta o parte de una planta que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de dicha planta o parte de la planta con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que produce de esta manera betalainas y reduce de esta manera dicha área de lesión debido a una enfermedad fúngica en dicha planta o parte de la planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para disminuir la necrosis debida a una enfermedad fúngica en una planta o parte de una planta que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de dicha planta o parte de la planta con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, en condiciones suficientes para producir betalainas, lo que produce de esta manera betalainas y disminuye de esta manera la necrosis debida a una enfermedad fúngica en dicha planta o parte de la planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de especies de plantas cerca de una primera planta o parte de una planta que comprende la etapa de poner en contacto una o más células de dicha primera planta o parte de una planta con un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β , en condiciones suficientes para producir y secretar L-DOPA, lo que inhibe de esta manera el crecimiento de especies de plantas cercanas a dicha primera planta o parte de la planta. En una modalidad, la especie de planta es una especie de planta heteróloga a la primera planta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos de crecimiento alelopático de un organismo que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células de un organismo o parte de este con un ácido

nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β , en condiciones suficientes para que dicho organismo o parte de este produzca y secrete L-DOPA, lo que permite de esta manera el crecimiento alelopático de dicho organismo.

5 En una modalidad, la alelopatía es un fenómeno biológico mediante el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en la germinación, el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de otros organismos.

10 En otra modalidad, la presente invención proporciona métodos para el control de malezas que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta con un ácido nucleico que codifica un gen del clado CYP76AD1- β , en condiciones suficientes para que dicha planta o parte de la planta produzca y secrete L-DOPA, lo que inhibe de esta manera el crecimiento de malezas cerca de dicha planta o parte de la planta.

15 En una modalidad, la etapa de poner en contacto una o más células de una planta o parte de una planta con un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus combinaciones, en condiciones suficientes para producir betalainas comprende poner en contacto dichas una o más células con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, un ácido nucleico que codifica una DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), y un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina. En una modalidad, la DOD es DODA1 de *Beta vulgaris*. En una modalidad, la glucosiltransferasa relacionada con la betalaina es ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa o betanidin-5-O-glucosiltransferasa. En una
20 modalidad, la ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa es gen ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa de *M. jalapa* (cDOPA5GT).

25 En una modalidad, un polinucleótido comprende los ácidos nucleicos. En una modalidad, el polinucleótido es pX11. En otra modalidad, el polinucleótido es pX12. En otra modalidad, el polinucleótido es pX13.

En una modalidad, las especies que expresan pX11 exhibieron un color predominantemente rojo púrpura debido a la producción de mayores cantidades de betacianinas que de betaxantinas.

30 La invención descrita en la presente descripción tiene numerosas aplicaciones en varias industrias diversas, lo que incluye, por ejemplo, pero no se limita a, la agricultura, los alimentos y bebidas, los productos farmacéuticos, los cosméticos, los textiles y los productos de consumo.

35 En una modalidad, las aplicaciones de la presente invención incluyen la producción de betalainas y/o L-DOPA para alimentos para peces. En otra modalidad, la producción de betalainas y/o L-DOPA es para su inclusión en un suplemento alimenticio. En una modalidad, el suplemento alimenticio es para seres humanos. En otra modalidad, el suplemento alimenticio es para animales no humanos. En otra modalidad, el suplemento alimenticio es para uso veterinario. En otra modalidad, el suplemento alimenticio es para acuicultura. En otra modalidad, el suplemento alimenticio se presenta en forma de una vitamina. En otra modalidad, el suplemento alimenticio se añade a la leche u otros productos lácteos.

40 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para aumentar una o más betalainas en un producto lácteo que comprende las etapas de a) poner en contacto una célula bacteriana con un polinucleótido que codifica un ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD) y un ácido nucleico que codifica CYP76AD6, un ácido nucleico que codifica CYP76AD15, un ácido nucleico que codifica CYP76AD1, o una de sus
45 combinaciones, en donde si dicha célula se pone en contacto con un ácido nucleico que codifica CYP76AD1 y un ácido nucleico que codifica DOD y no un ácido nucleico que codifica CYP76AD6 o un ácido nucleico que codifica CYP76AD15, dicha célula también se pone en contacto con un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina, y b) fermentar un producto lácteo con bacterias cultivadas a partir de dicha célula, lo que aumenta de esta manera una o más betalainas en dicho producto lácteo. En una modalidad, la bacteria es una
50 bacteria usada en la fermentación para la preparación de productos lácteos. En una modalidad, la bacteria es un *Lactobacillus*.

55 En otro aspecto, los genes de la invención pueden transformarse en una planta o una célula vegetal para proteger contra uno o más factores de estrés biótico tales como, por ejemplo, pero no se limita a, hongos, bacterias y virus y/o uno o más factores de estrés biótico tales como, por ejemplo, pero no se limita a, calor, frío, sal, sequía y exposición ultravioleta.

60 En una modalidad, un órgano vegetal que expresa un polinucleótido o polipéptido de la presente invención puede servir como tinte, colorante o pigmento alimentario. En otra modalidad, un producto derivado de un órgano vegetal que expresa un polinucleótido o polipéptido de la presente invención puede servir como tinte, colorante o pigmento alimentario.

65 En otra modalidad, el jugo de la fruta transformada puede extraerse de dicha fruta para hacer bebidas. En otra modalidad, el jugo u otro extracto de un órgano vegetal que expresa un polinucleótido o polipéptido de la presente invención puede servir como tinte, colorante o pigmento alimentario. En una modalidad, dicho jugo puede usarse

para teñir yogur, dulces, chicles, helados y similares. Dicho colorante o agente colorante también puede usarse en la industria textil para teñir ropas.

En otra modalidad, un extracto de una planta o célula vegetal transgénica como se describe en la presente descripción puede rociarse sobre plantas vulnerables para protegerlas del estrés biótico y abiótico, como se describió anteriormente en la presente descripción. Por tanto, la presente invención incluye tanto un extracto de una planta o cultivo alimentario como se describe en la presente descripción, así como también un método para proteger una planta del estrés biótico, estrés abiótico o una de sus combinaciones que comprende poner en contacto dicha planta con una planta o extracto vegetal producido mediante los métodos de la presente invención como se describe en la presente descripción.

En otra modalidad, la producción de betalaínas y/o L-DOPA es para usos cosméticos. En una modalidad, la producción de betalaínas y/o L-DOPA es para su inclusión en protectores solares. En otra modalidad, se producen en levadura betalaínas y/o L-DOPA para su uso en protectores solares.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar, inhibir, suprimir o prevenir un trastorno sensible a la dopamina en un sujeto que comprende la etapa de administrar un cultivo alimentario, célula o línea celular que comprende altos niveles de un polipéptido del clado CYP76AD1- β , lo que proporciona de esta manera a dicho sujeto L-DOPA, lo que trata, inhibe, suprime o previene de esta manera el trastorno sensible a la dopamina en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona el uso de un gen del clado CYP76AD1- β o un cultivo alimentario, célula o línea celular que comprende altos niveles de dicho gen del clado CYP76AD1- β en la preparación de una composición para tratar o inhibir un trastorno sensible a la dopamina en un sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un gen del clado CYP76AD1- β o un cultivo alimentario, célula o línea celular que comprende altos niveles de dicho gen del clado CYP76AD1- β para tratar o inhibir un trastorno sensible a la dopamina en un sujeto.

En una modalidad, el polipéptido del clado CYP76AD1- β es CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones. En una modalidad, dicho trastorno sensible a la dopamina es la enfermedad de Parkinson, la distonía sensible a la dopamina o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar, inhibir, suprimir o prevenir la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en un sujeto, que comprende proporcionar a dicho sujeto una planta que expresa tirosina o una parte de la planta genéticamente modificada para expresar CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, lo que proporciona de esta manera a dicho sujeto L-DOPA, lo que trata, inhibe, suprime o previene de esta manera la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar, inhibir, suprimir o prevenir la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en un sujeto, que comprende administrar una enzima CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, a dicho sujeto, opcionalmente con fenilalanina o tirosina, lo que produce de esta manera L-DOPA a partir de tirosina, lo que trata, inhibe, suprime o previene de esta manera la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para suprimir los síntomas, estabilizar los síntomas, retrasar el inicio y/o ralentizar la progresión de la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en un sujeto, que comprende proporcionar a dicho sujeto una planta o parte de la planta genéticamente modificada que expresa tirosina para expresar CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, lo que proporciona de esta manera a dicho sujeto L-DOPA, lo que de esta manera suprime los síntomas, estabiliza los síntomas, retrasa el inicio y/o ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en dicho sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para suprimir los síntomas, estabilizar los síntomas, retrasar el inicio y/o ralentizar la progresión de la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en un sujeto, que comprende administrar una enzima CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones, a dicho sujeto, opcionalmente con fenilalanina o tirosina, lo que produce de esta manera L-DOPA a partir de tirosina, lo que de esta manera suprime los síntomas, estabiliza los síntomas, retrasa el inicio y/o ralentiza la progresión de la enfermedad de Parkinson o la distonía sensible a la dopamina en dicho sujeto.

En una modalidad, la enfermedad de Parkinson es enfermedad de Parkinson idiopática, parkinsonismo postencefalítico o parkinsonismo sintomático.

En una modalidad, al sujeto se le administra adicionalmente un inhibidor de la DOPA descarboxilasa periférica (DDCI). En una modalidad, el DDCI es carbidopa, una benserazida o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, al sujeto se le administra adicionalmente piridoxina.

En una modalidad, la administración de la enzima CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, y/o la L-DOPA producida por la enzima CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, como se describe en la presente descripción, es mediante la administración oral. En otra modalidad, la administración es mediante un catéter. En otra modalidad, la enzima se administra por vía epidural, intracerebral o intracerebroventricular. Más abajo en la presente descripción se describen otros métodos de administración adecuados.

De acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención y en una modalidad, el sujeto es un ser humano. En otra modalidad, el sujeto es murino, que en una modalidad es un ratón, y, en otra modalidad, es una rata. En otra modalidad, el sujeto es canino, felino, bovino, ovino o porcino. En otra modalidad, el sujeto es un mamífero. En otra modalidad, el sujeto es cualquier organismo susceptible a la enfermedad de Parkinson.

En una modalidad, los métodos de la presente invención se emplean en medicina veterinaria. En una modalidad, la presente invención proporciona el tratamiento de mamíferos domésticos que se mantienen como compañeros de los humanos (por ejemplo, perros, gatos, caballos), que tienen un valor comercial significativo (por ejemplo, vacas lecheras, ganado vacuno, animales deportivos), que tienen un valor científico significativo (por ejemplo, especímenes cautivos o libres de especies en peligro de extinción), o que tienen valor de cualquier otra manera.

En una modalidad, los métodos de la presente invención incluyen el uso de las composiciones para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno o afección. En una modalidad, los métodos de la presente invención incluyen tanto un tratamiento terapéutico como medidas preventivas o profilácticas, en donde el objetivo es prevenir o aliviar la afección o trastorno patológico objetivo como se describió anteriormente en la presente descripción. Por tanto, en una modalidad, los métodos de la presente invención pueden incluir directamente afectar o curar, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad de, retrasar el inicio de, reducir los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección, o una de sus combinaciones. Por tanto, en una modalidad, "tratar" se refiere, entre otros, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de, o disminuir la resistencia a agentes terapéuticos alternativos, o una de sus combinaciones. En una modalidad, "prevenir" se refiere, entre otros, a retrasar el inicio de los síntomas, prevenir la recaída a una enfermedad, disminuir el número o frecuencia de los episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o una de sus combinaciones. En una modalidad, "suprimir" o "inhibir", se refiere, entre otros, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir la cantidad de síntomas, reducir la incidencia de los síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, aliviar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una de sus combinaciones.

En una modalidad, los síntomas son primarios, mientras que en otra modalidad, los síntomas son secundarios. En una modalidad, "primario" se refiere a un síntoma que es un resultado directo de la enfermedad, trastorno o afección, mientras que en una modalidad, "secundario" se refiere a un síntoma que se deriva o es consecuencia de una causa primaria. En una modalidad, los polinucleótidos, polipéptidos, composiciones, células y su uso en la presente invención tratan o inhiben síntomas primarios o secundarios o complicaciones secundarias relacionadas con la enfermedad de Parkinson.

En otra modalidad, "síntomas" pueden ser cualquier manifestación de la enfermedad de Parkinson, que comprende temblores, bradicinesia, músculos rígidos, postura y equilibrio alterados, pérdida de movimientos automáticos, cambios en el habla, cambios en la escritura o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para marcar una transformación genética que comprende la etapa de poner en contacto una célula con un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica a) CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, o una de sus combinaciones, b) una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD); y c) una secuencia de ácido nucleico adicional de interés, en condiciones suficientes para producir betalainas en dicha célula, en donde el color producido por la producción de betalaina en dicha célula marca de esta manera dicha transformación genética en dicha célula. En una modalidad, la etapa de poner en contacto comprende además poner en contacto una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina.

En una modalidad, el método comprende además poner en contacto un medio de cultivo con ácido ascórbico como agente reductor para prevenir la oxidación espontánea de betanidina, que provoca que el pigmento se polimerice y pierda su color violeta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para identificar genes relacionados con betalainas en un organismo que comprende la etapa de buscar en una base de datos de genomas de plantas los genes con patrones de expresión que se correlacionan altamente con los de los genes relacionados con betalainas descritos en la presente descripción. En una modalidad, el gen es MjDOD, cDOPA5GT, CYP76AD3 o una de sus combinaciones. En otra modalidad, el gen es CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15 o una de sus combinaciones.

Combinaciones

En una modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden administrarse o proporcionarse por sí mismas. En otra modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden administrarse o proporcionarse junto con un suplemento dietético adicional. En otra modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden administrarse o proporcionarse junto con un terpeno, que en una modalidad es una astaxantina. En otra modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden administrarse o proporcionarse junto con antocianinas, carotenoides o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden producirse junto con un componente adicional, que en una modalidad puede servir como un suplemento dietético. En otra modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden producirse junto con un terpeno, que en una modalidad es una astaxantina. En otra modalidad, las betalainas producidas mediante el uso de composiciones y métodos de la presente invención pueden producirse junto con antocianinas, carotenoides o una de sus combinaciones.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un cultivo alimentario que comprende un polinucleótido de la presente invención. En una modalidad, el cultivo alimentario que comprende un polinucleótido de la presente invención comprende además antocianina, caroteno o una de sus combinaciones. En una modalidad, el cultivo alimentario que comprende un polinucleótido de la presente invención se modifica genéticamente para comprender antocianina, caroteno o una de sus combinaciones. En una modalidad, el cultivo alimentario son tomates de antocianina púrpuras.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las modalidades preferidas de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y Métodos (1)

Material vegetal y condiciones de cultivo

Las plantas de *Mirabilis jalapa* se cultivaron en suelo en un invernadero con condiciones de luz de día largo (25 °C). Las plantas de *Beta vulgaris* y *Nicotiana benthamiana* se cultivaron en suelo en cuartos climatizados (22 °C; 70 % de humedad; 18/6 horas de luz/oscuridad). El material vegetal para la secuenciación del ARN de *M. jalapa* se recolectó de flores rojas en cinco etapas del desarrollo (etapa 1- longitud de la flor aprox. 1 cm; etapa 2- 2 cm; etapa 3- 3 cm; etapa 4- 4 cm; etapa 5- 5-6 cm), hojas rojo-joven o verde-madura y epidermis de las áreas del nudo del tallo (rojo) o del entrenudo (verde). El material vegetal para la secuenciación del ARN de *B. vulgaris* se recolectó de hipocótilos de plántulas de 10 días de edad de tres variedades (remolacha roja, remolacha dorada Burpees y remolacha 'rayada' Chioggia). El tejido recolectado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80 °C hasta su procesamiento.

Secuenciación, ensamblaje y análisis del transcriptoma

Las bibliotecas de *M. jalapa* y *B. vulgaris* para Seq-ARN específicas de cadena de alto rendimiento de Illumina se prepararon de la siguiente manera: el ARN total se extrajo de las muestras de tejidos con el método TRIzol basado en el manual del usuario del reactivo TRI (Sigma-Aldrich). Se usaron cinco µg de ARN total de cada muestra para la preparación de bibliotecas para seq-ARN mediante el uso de métodos conocidos en la técnica con modificaciones menores. Brevemente: el ARN poli(A) se aisló del ARN total mediante el uso de Dynabeads Oligo (dT)25 (Invitrogen), se fragmentó a 94 °C durante 5 minutos y se eluyó. El ADNc de la primera cadena se sintetizó mediante el uso de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) con cebadores aleatorios y dNTP, y el ADNc de la segunda cadena se generó mediante el uso de ADN polimerasa I (Enzymatics) y dUTP. Después de la reparación de extremos (Enzymatics), la adición de cola dA con Klenow 3'-5' (Enzymatics) y la ligazón del adaptador (ligasa de ADN de T4 Quick, NEB), la segunda cadena que contenía dUTP se digirió por uracil ADN glicosilasa (Enzymatics). El ADNc ligado al adaptador de la primera cadena resultante se usó durante 13-15 ciclos de enriquecimiento de PCR con mezcla maestra de PCR de alta fidelidad NEBNext (NEB). Las bibliotecas indexadas se combinaron y secuenciaron con un instrumento Illumina HiSeq2000. El ensamblaje de novo y el cálculo de valores de recuentos normalizados para el conjunto de datos de *M. jalapa* se realizó con el software Trinity versión Trinityrnaseq_r2013-02-25 y se siguió el procedimiento estándar. Las anotaciones de cóntigos se asignaron mediante el uso de Blast2GO. El ensamblaje de novo guiado por el genoma del conjunto de datos de *B. vulgaris* se realizó con la versión de Trinity Trinityrnaseq_r2014-07-17, mediante el uso del recurso del genoma de *B. vulgaris*

(remolacha azucarera) como referencia (<http://bvseq.molgen.mpg.de>). La anotación de genes se obtuvo con el módulo Trinotate inclusivo.

Generación de constructos de ADN

Secuencias de genes usadas en este estudio; cDOPA5GT (Núm. de acceso a GenBank AB182643.1; SEQ ID NO: 2), DODA1 (acceso HQ656027.1; SEQ ID NO: 33), CYP76AD1 (acceso HQ656023.1; SEQ ID NO: 32). Otras secuencias se proporcionan en Materiales y Métodos. CYP76AD6 se nombró por el Dr. David R. Nelson, Universidad de Tennessee, Memphis, Estados Unidos, para mantener la consistencia en la nomenclatura. Los transcritos cDOPA5GT de *M. jalapa* y CYP76AD1, BvDODAI, BvCYP76new y CYP76AD6 de *B. vulgaris* se amplificaron a partir de bibliotecas de ADNc de pétalo rojo de *M. jalapa* y de hipocótilo rojo de *B. vulgaris*, que se prepararon mediante el uso de un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies). La amplificación por PCR se realizó mediante el uso de la ADN polimerasa 'Phusion' (Finnzyme) y los oligonucleótidos especificados en la Tabla 1. Para el ensayo de VIGS, todos los fragmentos de genes se clonaron en un vector pTRV2 mediante el uso de restricción XhoI y SacI. Los vectores para el silenciamiento conjunto se construyeron mediante la clonación de un fragmento CYP76AD1 en pTRV2: BvCYP76new y pTRV2:CYP76AD6 mediante el uso de restricción EcoRI y BamHI. Los constructos de ADN usados para la agroinfiltración de *N. benthamiana* y la transformación de plantas mediada por agrobacterias se construyeron con clonación Goldenbrai. CYP76AD1, BvDODAI, CYP76AD6 y cDOPA5GT se clonaron en un vector pUPD mediante el uso de los oligonucleótidos especificados en la Tabla 1. pDODA, pAD1-GT, pYFP, pAD6 y pX11 son respectivamente los vectores 2a2, 2Q2, 2a1, 2a1 y 3a1, todos los cuales se basan en una cadena principal de pCAMBIA.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en este estudio

SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido PCR cuantitativa en tiempo real	Secuencia (5' a 3')
45	CYP76AD1 qPCR Dir	TGTGCTAGACGTTCTTCTTCAGCT
46	CYP76AD1 qPCR Inv	AAAATGTCGACGAGCAAATG
47	CYP76AD6 qPCR Dir	CTTCATCTCGTAGGCTTCCTCC
48	CYP76AD6 qPCR Inv	GATGAGGCTTTTCGCCAAGA
49	Bv15885 qPCR Dir	CCTGTATCGGCTAAATGGCG
50	Bv15885 qPCR Inv	CAATTGCACAGCGGAGATTTT
51	Bv20048 qPCR Dir	TTGATGCTGTTTGCGCAGTC
52	Bv20048 qPCR Inv	TGCGAAGATTTTCGCCATTTT
53	BvGAPDH qPCR Dir	TGGTGCTGATTTTCGTCGTAGAG
54	BvGAPDH qPCR Inv	TGGCACCACCCCTTCAAGTG
55	Bv10427 qPCR Dir	TAAAGCTCCCTCCTGGTCCA
56	Bv10427 qPCR Dir	CCGCAGAACGATGAGGTTTG
57	BvCYP76new qPCR Dir	TCAAACCTCGGAAGCATCACTACA
58	BvCYP76new qPCR Inv	GGGCTAAGTCGTGCTCGAGG
clonación pTRV2		
59	BvDODAI Dir + XhoI	AAAAACTCGAGGTTAAACCTACTGTTA
60	BvDODAI Inv + SacI	ATGCTGTC
61	CYP76AD1 Dir + XhoI	AAAAAGAGCTCGCTGCCCAAGGTGCAA
62	CYP76AD1 Inv + SacI	CTCC
63	CYP76AD1 Dir + BamHI	AAAAACTCGAGGCTAATCTTGCTAAAA
64	CYP76AD1 Inv + EcoRI	TTCACGG
65	BvCYP76new Dir + XhoI	AAAAAGAGCTCTTATGGTGGGCTAATT
66	BvCYP76new Inv + SacI	CCACTG
67	CYP76AD6 Dir + XhoI	AAAAAGGATCCGCTAATCTTGCTAAAA
68	CYP76AD6 Inv + SacI	TTCACGG
		AAAAAGAATTCTTATGGTGGGCTAATT
		CCACTG
		AAAAACTCGAGCTGCAAGAGTCAATGA
		TCTCA
		AAAAAGAGCTCTCATCTGGGAATTGGA
		ATTGCT
		AAAAACTCGAGCACACAGCAAGCAC
		TTAGA
		AAAAAGAGCTCAGTCCAGGGCATATCC
		TTCTAC

ES 2 930 456 T3

SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido PCR cuantitativa en tiempo real	Secuencia (5' a 3')
Clonación Goldenbraid		
5	69	BvDODAI Dir GCGCCGTCTCGCTCGAATGAAAATGATG
	70	BvDODAI Inv AATGGTGAAGATG GCGCCGTCTCGCTCGAAGCCTAGGCTGA
10	71	CYP76AD1 Dir AGTGAACCTTGTA GCGCCGTCTCGCTCGAATGGATCATGCA
	72	CYP76AD1 Inv ACATTAGCAATG GCGCCGTCTCGCTCGAAGCTCAATACCT
15	73	CYP76AD6 Dir1 AGGTATTGGAATAAG GCGCCGTCTCGCTCGAATGGATAACGCA
	74	CYP76AD6 Inv 1 ACACTTGCT GCGCCGTCTCGTTGCCATTCTAATGTG
20	75	CYP76AD6 Dir2 CTTG GCGCCGTCTCGGCAATGGCCGAACCTGT
	76	CYP76AD6 Inv2 GAA GCGCCGTCTCGCTCGAAGCCTAGTTTCT
25	77	cDOPA5GT Dir1 GGGAACTGGAAT GCGCCGTCTCGCTCGAATGACCGCCATT
30	78	cDOPA5GT Inv1 AAAATGAACAC GCGCCGTCTCGGCCTCATTTCCTCATTG
	79	cDOPA5GT Dir2 ATATC GCGCCGTCTCGAGGCCAGAATGGCTACC
35	80	cDOPA5GT Inv2 AGA GCGCCGTCTCGCTCGAAGCTTATTGAAG
40		AGAAGGTTCCAACCT
Clonación Gateway para la expresión en levaduras		
	81	BvDODAI Dir ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGAAAAT
45	82	BvDODAI Inv GATGAATGGTGAAGAT ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcCTAGGCTGA
	83	CYP76AD1 Dir AGTGAACCTTG TAGGAG ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGATCA
50	84	CYP76AD1 Inv TGCAACATTAGCAA ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTCAATACCT
55	85	CYP76AD6 Dir AGGTATTGGAATAAGTTT ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGATAA
	86	CYP76AD6 Inv CGCAACACTTGCTGTGATCC ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcCTAGTTTCT
60		GGGAACTGGAATAACTTGAAGAG
65	Silenciamiento de genes inducido por virus en <i>Beta vulgaris</i>	

Se clonaron fragmentos de BvDODAI (407 pb), CYP76AD1 (418 pb), BvCYP76new (471 pb) y CYP76AD6 (420 pb) en un vector pTRV2, se transformaron en la cepa de agrobacteria GV3101 y se introdujeron en plántulas de 10 días de edad de la variedad 'sangre de toro' de *B. vulgaris* mediante el uso del método de infiltración al vacío descrito previamente. Las agrobacterias se llevaron a una D.O.600 de 2,0 en tampón de infiltración VIGS (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 200 µM), se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas y se mezclaron en una relación 1:1 con agrobacterias portadoras de pTRV1 antes de la infiltración. Para cada experimento, se infectaron 48 plántulas. En los experimentos que dieron como resultado fenotipos visibles, se observaron típicamente manchas de despigmentación en más de la mitad de las plántulas infectadas dentro de 2-3 semanas. Se tomaron muestras de tejidos para el análisis espectrofotométrico 3,5 semanas después de la infección.

Análisis de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

El análisis qRT-PCR se llevó a cabo en plantas de remolacha roja infectadas con VIGS. Se analizaron tres réplicas biológicas de cada experimento, donde cada réplica consiste en tejido de hojas de dos a tres plantas, muestreadas 3,5 semanas después de la infección. El ARN se extrajo con el método TRIzol (de acuerdo con el manual de usuario de Sigma-Aldrich para el reactivo TRI), se trató con ADNasa y se transcribió inversamente a ADNc con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los oligonucleótidos se diseñaron mediante el uso del software PRIMEREXPRESS (Applied Biosystems) (Tabla 1). La qRT-PCR se realizó con el reactivo Fast SYBR Green y un instrumento StepOnePlus (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: etapa inicial en el termociclador durante 20 s a 95 °C, seguido de amplificación por PCR durante 40 ciclos de 3 s a 95 °C y 30 s a 59 °C, y finalmente análisis de disociación para confirmar la especificidad de los productos de PCR. Cada reacción consiste de un volumen total de 10 µl, que contenía 2,5 µM de cada cebador. Los niveles relativos de transcritos se calcularon de acuerdo con el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001), mediante el uso del gen GAPDH de 'mantenimiento' como referencia.

Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Los ensayos de expresión génica transitoria en *N. benthamiana* con los vectores pDODA, pAD1-GT, pYFP, pAD6 y pX11 se basaron en un método de agroinfiltración descrito previamente. Todos los constructos se transformaron en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, excluyendo pX11 que se transformó en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. En todos los casos, las agrobacterias se cultivaron durante la noche en medio LB y se llevaron a una D.O.600 final de 0,2 en tampón de infiltración. Cuando se infiltraron conjuntamente, las agrobacterias que portaban constructos separados se llevaron cada una a D.O.600 de 0,2 y se mezclaron en una relación 1:1 antes de la infiltración. Las muestras de tejidos usadas para el análisis de LC-MS subsecuente se tomaron de las hojas 7 días después de la infiltración. Para el análisis de LC-MS de L-DOPA y betalainas, se tomaron muestras de 3-4 réplicas biológicas para cada experimento, cada una de las cuales consiste de tejidos infiltrados de 2-3 hojas diferentes.

Extracción y análisis de metabolitos

Para el análisis de betalaina, se añadió solución de extracción (80 % de etanol y 0,1 % de ácido fórmico en DDW) a tejido vegetal triturado y congelado (0,1-0,25 g) en una relación de 200 µl 0,1 g⁻¹ de tejido. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min seguido de sonicación durante 5 min, centrifugación por 5 min y filtración a través de filtros PVDF de 0,22 µm (Millipore). Las muestras diluidas 3 veces en DDW se analizaron mediante el uso de un sistema UPLC/PDA-qTOF de alta resolución que comprende un UPLC (Waters Acquity) conectado en línea a un detector Acquity PDA (200-700 nm) y un detector qTOF (espectrómetro de masas cuadrupolo/tiempo de vuelo en tándem, XEVO, Waters) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). Se usó ESI en modo de ionización positiva en el intervalo m/z de 50 a 1600 Da. Se usaron los siguientes ajustes: capilar - 1 kV, cono - 27 V, energía de colisión - 6 eV. Para las corridas de MS/MS o MSE, se usó una rampa de energía de colisión de 15 a 40 eV. La separación de los compuestos se realizó en una columna UPLC HSS T3 (Waters Acquity, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm) mediante el uso de los eluyentes A (1 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) y B (100 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) de la siguiente manera: los primeros 3 min - elución isocrática al 100 % de A; 3,0-22,0 min - un gradiente lineal al 75 % de A, 22,0-22,5 min - un gradiente lineal al 100 % de B, 22,5-25,5 min - lavado al 100 % de B, 25,5-26,0 min - retorno al 100 % de A y 26,0-28,0 min - equilibrio al 100 % de A. La temperatura de la columna se ajustó a 35 °C, flujo - 0,3 ml/min. La betanina y la isobetanina se asignaron mediante el uso de extracto de hoja de remolacha roja como referencia. Se identificaron supuestamente otros compuestos de betalaina basado en la masa precisa, los espectros UV-VIS y la fragmentación MS/MS o MSE (detallada en la Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos de betalaina identificados mediante el análisis LC-MS.

Núm.	Nombre		Composición elemental	[M+H] ⁺ , Da	Error de masa, ppm	Rt, min	MS fragmentos	UV/VI S, nm
5	Betacianinas							
1	Betanina ^{a,c,d,e,f}		C24H26N2O13	551,1513	0	8,31	389,10 [M+H-Hex] 345,11 [M+H-Hex-COO]- 343,0 [M+H-Hex-H2COO] 297,09 [M+H-Hex-2H2COO] 194,05 150,1 [M+H-Hex-H2COO-C9H7NO4]	534
10	2	Isobetanina ^{a,c,d,e,f}	C24H26N2O13	551,1502	2	9,06	389,10 [M+H-Hex] 343,0 [M+H-Hex-H2COO] 150,1 [M+H-Hex-H2COO-C9H7NO4]	534
15	3	Betacianina (desconocida)	I ^C C31H31N3O14	670,189	0,9	12,67	626,20 [M+H-COO] 582,21 [M+H-2xCOO] 538,22 [M+H-3xCOO] 389,10 [M+H-281,0902 (C13H15NO6)] 345,11 [M+H-281-COO] 301,11 [M+H-281-2xCOO] 282,09 [M+H-389,10 (Betanidina)] 264,09 [M+H-389,1 (Betanidina)-H2O] 257,13 [M+H-281-3xCOO] 247,08 180,10 138,06	532
20	4	Betacianina (desconocida)	II ^C C31H30N2O14	655,1771	0,8	15,68	389,10 [M+H-266,0790 (C13H14O6)] 345,10 [M+H-266-COO] 343,10 [M+H-266-H2COO] 301,12 [M+H-266-2xCOO] 299,10 [M+H-266-H2COO-COO] 196,06 [M+H-C9H7NO4] 194,04 [M+H-C9H9NO4] 150,05 [M+H-266,0790-H2COO-C9H7NO4]	533
25	5	Betanidina ^{g,i}	C18H16N2O8	389,0991	1,5	9,89	343,09 [M+H-H2CO2] 297,09 [M+H-2H2CO2] 255,1 [M+H-2H2CO2-CO2] 253,08 [M+H-3H2CO2] 150,05 [M+H-Hex-H2CO2-C9H7NO4]	539
30	6	Isobetamidina ^{g,i}	C18H16N2O8	389,0988	0,8	10,83	343,09 [M+H-H2CO2] 297,09 [M+H-2H2CO2] 255,1 [M+H-2H2CO2-CO2] 253,08 [M+H-3H2CO2] 150,05 [M+H-Hex-H2CO2-C9H7NO4]	539
35	7	Betacianina (desconocida)	III ^e C26H28N2O14	593,1618	0,2	10,72	547,11 [M+H-H2COO] 511,17 [M+H-2xH2O] 389,09 [M+H-C8H12O6] 345,11 [M+H-C8H12O6-COO] 325,07 [M+H-C8H12O6-H2COO-H2O] 301,11 [M+H-C8H12O6-2xCOO] 299,10 [M+H-C8H12O6-H2COO-COO] 297,08 [M+H-C8H12O6-2xH2COO] 194,04 [M+H-C8H12O6-C9H9NO4] 178,05 [M+H-C8H12O6-C9H7NO4-H2O] 176,03 [M+H-C8H12O6-C9H9NO4-H2O] 150,05 [M+H-C8H12O6-H2CO2-C9H7NO4]	534
40								
45								
50								
55								
60								
65								
	Núm.	Nombre	Composición	[M+H] ⁺	Error de	Rt,	MS fragmentos	UV/VI

			elemental	Da	masa, ppm	min		S, nm
	Betaxantinas							
5	1	Vulgaxanthi If,g,h,i (glutamina- betaxantina)	n C14H17N3O7	340,114 7	0,6	2,21	323,08 [M+H-NH3] [M+H-NH3-H2CO2] [M+H-NH3-2xH2CO2] 194,04 185,07 [M+H- 3H2CO2-NH3] 157,06 [M+H-3H2CO2-NH3-CO] 150,05 [M+H-COO- C5H10N2O3] 148,05 [M+H- H2CO2-C5H10N2O3] 132,10 86,1	476
10								
15	2	Indicaxantina ^{b,c} (prolina- betaxantina)	C14H16N2O6	309,109 0	1,0	7,69	263,10 [M+H-H2COO] 217,10 [M+H-2xH2COO] 219,11 [M+H-COO- H2COO] 189,10 175,12 [M+H-H2COO-2COO] 173,11 [M+H-2xH2COO- COO] 150,05 [M+H-COO- C5H9NO2] 145,07 106,07 [M+H-2COO-C5H9NO2]	478
20								
25	3	Dopaxanthi hexósido ^b	n- C24H28N2O1 3	553,166 7	0,5	7,97	391,11 (C18H19N2O8) [M+H-Hex] 357,13 [M+H- Hex-2xOH] 347,13 [M+H- Hex-COO] 345,11 [M+H- Hex-H2COO] 303,13 [M+H- Hex- 2xCOO] 299,10 [M+H- Hex-2xH2COO] 255,11 [M+H-Hex-COO-2xH2COO] 211,07 [M+H-Hex-C9H8O4] 208,05 194,04 181,05 [M+H-C9H10N2O4] 165,05 [M+H- Hex-C9H8O4- H2COO] 150,05 [M+H-Hex- H2COO-C9H9NO4] 106,06 [M+H-Hex-H2COO-COO- C9H9NO4]	478
30								
35								
40	4	Betaxantina (desconocida)	I ^b C18H19N3O4	342,144 5	2,6	6,67	298,15 [M+H-COO] 254,16 [M+H-2xCOO] 252,15 [M+H-H2COO- COO] 237,14 [M+H- 2xCOO-NH3] 225,14 196,10 159,09 132,08 117,05 106,06	476
45								
50	5	Valina- betaxantina ^{g,h,i}	C14H18N2O6	311,124 5	0,6	10,6 9	267,11 [M+H-COO] 265,11 [M+H-H2COO] 221,13 [M+H-COO-H2COO] 219,13 [M+H-2xH2COO] 193,13 175,12 [M+H-COO- 2xH2COO] 166,05 150,05 [M+ H-H2CO2-C5H9NO2] 132,05 [M+H-H2CO2- C5H9NO2-H2O] 119,06 104,05 [M+H-2xH2CO2- C5H9NO2] 94,05	469
55								
60	6	Ácido betalámico ^{g,h,i}	C9H9NO5	212,055 8	0,5	8,79	166,05 [M+H-H2COO] 148,04 [M+H-H2COO-H2O] 138,05 [M+H-H2COO-CO] 120,05 [M+H-2x(H2COO)] 92,05 [M+H-2x(H2COO)- CO] 65,04	408

Compuestos de betalaina identificados mediante análisis de LC-MS en experimentos de agroinfiltración de *N. benthamiana* de ^apAD1-GT+pDODA1, ^bpAD6+pDODA1 y ^cpX11, ^d*N.benthamiana* callus, ^e*N. glauca* callus, ^fpX11 transformado de *N. tabacum*, experimentos de expresión en levadura de ^gCYP76AD1+DODA1.

^hCYP76AD6+DODA1 y CYP76AD1/AD6+DODA1. Todos los fragmentos se obtuvieron en el modo MS/MS excluyendo betanidina e isobetanidina, cuyos fragmentos se determinaron en el modo MS^(E). Rt, tiempo de retención; MS fragmentos, masas de fragmentos obtenidos en modo de ionización positiva; UV/VIS, máximos de absorción en el intervalo UV/visible; Hex, Hexosa.

Para el análisis de L-DOPA, las muestras se extrajeron como se describió anteriormente y se analizaron mediante el uso de un instrumento UPLC/PDA-MSMS, donde se conectó un módulo de separación UPLC (Waters Acquity) a un detector de matriz de fotodiodos (Waters Acquity 2996, 190-800 nm), y (en línea) a un detector MS de triple cuadrupolo (Waters Xevo TQ MS), equipado con una fuente ESI. Los compuestos se separaron con una columna Phenomenex Luna (2x150 mm, 3 µm) mediante el uso del siguiente gradiente: el primer 1 min - gradiente lineal de 100 hasta 90 % de A, 1-4 min - 90-75 % de A, 4-5 min - 75-0 % de A, 5-9,5 min - lavado al 100 % de B, 9,5-10 min - retorno a 100 % de A, y 10-12 min - equilibrado al 100 % de A, donde A es 0,1 % de ácido fórmico en agua y B es 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. La temperatura de la columna se ajustó a 35 °C, flujo - 0,25 ml/min. Las muestras se analizaron en modo de ionización positiva, mediante el uso de los siguientes ajustes: capilar - 2 kV, cono - 26 eV, con dos transiciones 198,1> 152,1 (colisión - 15 eV) y 198,1> 181,1 (colisión - 10 eV) usadas para la asignación de compuestos. La L-DOPA se identificó mediante comparación con un estándar comercial de L-DOPA (Sigma-Aldrich), se disolvió en DDW (5 µM) y se inyectó con las mismas condiciones de LC-MS.

Para la cuantificación relativa de betaxantinas en hojas de remolacha silenciadas con VIGS mediante espectrofotometría, las muestras se extrajeron mediante el uso del mismo procedimiento que se detalló anteriormente, excepto que se usó metanol al 80 % en lugar de etanol al 80 %. Los extractos se diluyeron 4 veces en solución de extracción, se colocaron en una placa de 96 pocillos y se analizaron con un lector de microplacas Biotek Synergy HT. El contenido relativo de betaxantina de cada muestra se evaluó al medir la absorción a 475 nm y restar el valor de absorción a 600 nm.

Para la estimación del contenido de betacianina por espectrofotometría, se usó el mismo método de extracción que anteriormente. Las muestras se diluyeron en DDW para obtener soluciones de D.O.535 < 2,0. La cuantificación de betacianina se basó en mediciones de absorción a 535 nm y 600 nm, y se calculó mediante el uso de un método descrito previamente.

Expresión recombinante en levaduras

Las secuencias codificantes de CYP76AD1, CYP76AD6 y BvDODA1 se amplificaron mediante PCR y se clonaron en los sitios BP de un vector pDONR207 mediante el uso de la clonación Gateway (Life Technologies, Invitrogen) de acuerdo con el manual del fabricante, y después se recombinaron en los sitios LR de los vectores pAG423GAL-ccdB (para CYP76AD6), pAG425GAL (para BvDODA1), y pYES-DEST52 (para CYP76AD1, Invitrogen). Además, se introdujo la secuencia codificante de beta-glucuronidasa (GUS) en estos vectores para ensayos de control. Los vectores de destino se transformaron mediante el uso del método PEG/LiAc a la cepa BY4742 de *S. cerevisiae*, en transformación secuencial. Cada clon de levadura se transformó finalmente con los tres vectores de destino, que expresan diferentes combinaciones de CYP76AD1, CYP76AD6, BvDODA1 y GUS. Las cepas de levadura se cultivaron en medio SD estándar durante la noche, que contenía glucosa al 2 % y carecía de histidina, leucina y uracilo. La levadura se sedimentó, se resuspendió a D.O.600 de 1,0 en 2 ml de medio SD con ascorbato 2 mM, refinosa al 1 % y galactosa al 2 %, carecía de histidina, leucina y uracilo, y se cultivó durante la noche. Las imágenes en la Figura 8 son de los medios en los que se cultivaron las levaduras, seguido de la inducción con galactosa durante la noche. Para el análisis de LC-MS, se secó 1 ml de medio líquido en un evaporador y se resuspendió en 100 µl de DDW.

Análisis bioinformáticos

Para el análisis de expresión conjunta, los cóntigos correspondientes a DOPA 4,5-dioxigenasa (MjDOD), ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT) y CYP76AD3 se usaron por separado como 'cebos'. Los genes que se expresan conjuntamente con cualquiera de los 'cebos' se identificaron mediante el uso de un script R para calcular los valores de correlación de Pearson, basado en los valores de recuento normalizados de cada gen en las 24 bibliotecas.

Para la generación del árbol filogenético de proteínas similares a CYP76AD1, la secuencia de proteína CYP76AD6 se usó primero para una consulta BLASTp de la base de datos NCBI nr. Las cuatro coincidencias principales de BLASTp con la identidad de secuencia más alta y la secuencia de proteína completa se seleccionaron para el alineamiento de secuencias múltiples, junto con la proteína CYP76AD1 y sus ortólogos descritos previamente CYP76AD2, CYP76AD3 y CYP76AD4. El alineamiento de secuencias múltiples se realizó con Clustal Omega y se procesó en un árbol filogenético de unión de vecinos con el software MEGA versión 6.06. Se usó muestreo con reemplazamiento de 100 repeticiones para la validación. El alineamiento por pares de CYP76AD6 y CYP76AD1 se realizó con Clustal Omega mediante el uso de parámetros predeterminados y se editó con el software GeneDoc.

Transformación y regeneración de plantas

La transformación y regeneración de plantas mediada por agrobacterias se realizó en discos de hojas de tabaco, berenjena, *N. benthamiana*, tomate, papa, petunia, *Nicotiana glauca* de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Un protocolo usado para la transformación de *Solanum nigrum* se proporciona más abajo en la presente descripción. Todas las especies de plantas se transformaron mediante el uso de la cepa de agrobacteria GV3101. El cultivo de tejidos vegetales se llevó a cabo en cuartos climatizados (22 °C; 70 % de humedad; 16/8 horas de luz/oscuridad, 2500 lux de intensidad de luz).

Secuencias de genes usados en este estudio

Las secuencias proporcionadas son secuencias de cóntigos obtenidas del ensamblaje de novo de los datos del transcriptoma (seq-ARN) de *Beta vulgaris* y *Mirabilis jalapa*. Todas las secuencias se presentan en la dirección 5'→3'.

>MjCYP76 de *M. jalapa*

```

CTTCAAATCCTCCCACGTATATATCAACAAAAACCAAAAACATCATCTCATT
ACAATAATGGAGTATCATCTTCTCTTCCTTCTCCTCCTGCCGATCATCCTTATCTTCGTG
TTCCTCAATCACAAGCCCAAGCAAACCAAACTCGAACCACCAGGACCACGTCCATGG
CCCATCATAGGCCACACCAACCTCGTCGGCTCCAAACCTCATCAGTCCATTGCCAAAC
TAGCTCATATTTACGGTCCCATAATGTCACTTAAGCTAGGGAGAATCACTACTATTGT
CATATCTTCCCCTGAAGCAGCCAAAGACTTGTTCTCTGAAACATGACCTTACTTTCTCA
AGTAGGCAAGTTCCTCACGCTTCAACCGCTACAAACCATGACAAACTATCCATGGTTT
GGCTCCCTGTATGTCCCAAATGGCGCTATCTTAGAAAGATCGCGGCCATCCAACTATT
CACCAACCAACAACCTTGATGGTGGTCAGGTACTAAGGCGTAAGAAAGTGAGGAGTT
GATCCAATTTGTGACTCGTTGTAGTAAACAAGGGCAAGTCATTGATATTGGAGAGGCT
GTTTTTATTACTACTCTTAACTTAATGTCAAATACCTTTTTTTTCCAAGGATTTGTGTAGT
TATGGTTTGGCCGAATCACGAGAGTTTAAGGATCTATTTTGGGAGTTCATGAAAGTGC
TAGCGAGTCCTAATGTTTCTGATTATTTTCCATGGTTAAGATGGTTGGATTTGCAAGGC
ATCAAGAGAAGAAGCGAGGGTTGTTATCGCAAGATGTTGGGTTTTTTTGGGGAGATTA
TTGATCAGAGATTGAGAGATCCAATGTCATGTAAGAACGATGTATTGGACACTCTACT
CAAACCTTGTCGACCAAAAAGAGTTGAGCTTTGAGGATGTCAAACATATGCTTGTGGAT
TTGTTTGTGTCAGGGACGGATACAACCTTCGAACACATTGGAATGGACAATGGTAGAA
CTTTTACGCCACCCTAACATATTGACTAAAGCACAACTGAACTCAGCCAAGTCATAG
GCAAGGACAAGTTAGTCCAAGAATCATGTATCACCAAGTTGCCATATCTTCAATCAAT
ATTGAAAGAAACATTCAGGTTGCACCCACCGACTCCTTTTTTACTTCCACACAAAGCA
ATCGAGAACGTTGAACTATGCAACTATCACATACCTAAAGGTGCTCAAGTTTGGGTGA

```

ATGTGTGGTCTATTGGCCGCGATCCCAACATTTGGTCAAGCCCGGACTTATTTTCCCCA
 GAGAGATTTTtaggtaccgacattgatataaaaaggtaaccatttcgagctcataccat
 5 TCGGAGCAGGAAGAAGGATTTGCCCCGGGTGTCACTAGCTTACAGGATGCTTCATTT
 GATTTTGGCCACTCTCCTTCATTCAATTGGAACCTTCCTAATGACGTATGTCCGG
 AAAATATGGATATTGAAGAAAAATTTGGGATTACACTTCAAAAGATCATGCCACTCA
 10 AAGTCATACCAAGCTCTAGGTGTCTGGATCACGACAATACTGGTGTTAATCTTTTA
 CAACATATTGAATGATATATATCACGTTAAGGTACATGCGTCTAGATGCAGAACTTG
 15 CATACTTTCTTTTCAATAAAGTCTTGCATATGTATGGTTTATAGGGTGATGTAATTT
 CTTGTTTGTCTTTTACTTAAGTTTATAAGACATTTTTTTTTTTTTTTTATCGATGCTCTTAC
 TCATTAATAATTGGAACATATACAAAATTTTATATGTTTTAGATAAAATTATACAGG
 20 TTTTAATTTTAGGAACTTACCACTTGTTCACTGCGAGACTTAAATAGTCAAAATAG
 AAAATACACACTATTAATAAAGTACTCACTATTTATCAAATTTAT (SEQ ID NO: 1).

>BvCYP76new de *Beta vulgaris*

CAGTCATTTAAAATCCTGTAAATTACTCACATACATAACCAAATTAAGTTG
 30 CCGCCGTA CTGATTTCCAAAGGTCCTACATCTATCAATGGAGTATTACACCATAACGC
 TATTATTCATCATCTTCACAATATCAATATTCGGTACAAAAATTTTGAGCAAGTCCAA
 ACTTCCTCCAGGACCAACACCATGGCCTATCATAGGCAACATCCTCGAGCTAGGCAAG
 35 TTACCTCATCAGGCAGTTGACAAGCTCTCAAAAACCTATGGCCCTATATTATCTCTCA
 AACTCGGAAGCATCACTACAATAGTAATATCATCCCCTGAAATCGTTAAAGAAATGTT
 CCTCGAGCACGACTTAGCCCTTTCTAGTAGGCCTTCCCCGGATGCTTCGAGGGTGGA
 40 AACCATAACAAATTTTCCATTGTTTGGCTCCCAGTGTCCCCCAAATGGCGGGACCTTA
 GAAAAATTGCTACTATCCAATTGTTTACTACTCAACGCCTAGATTCTAGCCAAGA ACT
 45 ACGGCAGATCAAGGTGAACGAGCTGGTTGATTATGTACGACAGTGTTGTGAAAAGGG
 TCTACCTGTTGATGTTGGTAAAGCCGGGTTTACTACCACGTAAATATGTTGTCTAACA
 CGTTTTTCTCCATGGATTTGGCTAGCCATGCTTCTTCGAATTCGCAAGAGTTCAAGGAT
 50 CTTGTTTGGAGTCTTTTGAAGAGGGTGCAAAGCCTAATGTGTCTGGATTTTTTCCCGAT
 AGTTAGAGAATTGGATTTGCAGGGAGTATCGAAAAATAGAAGGGTGACATGAAGAA
 55 GCTAATGGGAATTTTCGAGGAAATCATTGATGGAAGGTTGACAAAGTTAAAGGATGT
 GAAGGATGATGTTCTAAGTACTTTACTCAAACCTTGTTAAGGATGAAGAATTGAACCTT
 GACGACGTCAAACATATGCTCATGGATTTATTTTtagcgggaacagatacaacCTCTA
 60 TCACATTGGAGTGGGCGATGACAGAATTACTTCGCAATCCAGAAAAGATGGAAAAGG
 TTCAAATTGAGTTGGACAAAGTACTTGGAAGGATAGTTCTCTGCAAGAGTCAATGAT
 65 CTCAAATTACCATATATTCAAGCAATAGTGAAAGAAACATTAAGATTACACCCACC

AACTCCTTTCTTGATTTCCTCACAAAGCAGAAAAAGATGTATTGTTATGCAACTATTTA
 GTGCCCCAAAACTCAATTATTTGGGTAAATTTATGGTCGATCGCTCGTAGTCCAAGTG
 5 TGTGGCCAAATCCAGAATCATTTTCTCCTGAAAGGTTTTTGGAGATGGAAATTGATAT
 TAAAGGACGAGATTTCAAACCTACACCCTTTGGATCAGGAAGAAGAATGTGTCCTGG
 AATGCCACTTGCTTATAGGATGACACATATGTTGTTGGCTACTCTTCTTCATTCAATTTA
 10 ACTGGAAGTATGGTGAGGCAAGTCCAAAAGATATAGACATGAAAGAAAAGTTTGGGT
 TGACGTTGCAAAAGGCTCAGCCACTTCAAGCAATTCCAATTCCCAGATGATCAATCTC
 15 TTTTGAGGAGTTAGACGATTTCTTTGTGTCAACCAACTAGTACTTATCGGAACATTTAT
 TGTAAATGTGTCTGTTAGATGTACATATGATGTTGTTATACTAAGAAATAACGGTGTT
 TAAGTGCAACATGGGACAAGAGGATTATGTAAAGTATCCTAGATTTTATTAGGTGCTC
 20 CTACACCTATGTATTGGTGCATTTGCACCAAGTCGTCTGTAGAAAAGTTGAGACTTGG
 GAGGCAAGAACTTTACCTCTGTAAAAAAAACGCGTTTTTTGCATTCTCCTTGTATCTTT
 25 TGCAAGAGATTGTACGCATTCACAAAACATCAAATACATTTGTGTTTACACAATAAGA
 ATCGCCAACACTGA (SEQ ID NO: 9).

>similar a CYP82G1 de *M. jalapa*

30 TACGTCTATTCTTGCCTCCCATTTCTCCTGCAAAAAGGAAGAAAATGGAA
 ATACCCTTTAATTTGCAACCTATTTTTCTAATTATTGTACTATCTACCTTCATTCTAACC
 35 CACCTAATAACAAAAAACACAAGAAAGTTCAACCAATGCAAATCAAAAACCAAGCCA
 ATACCAAAACCACCTGGCTCACTACCCATAATAGGTCACTTGCACCTCCTAAGAGGTC
 ATGGAACCACCCTAGGTCGCACCCCTCGGAGCCATGGCCGACAAGTCCGGACCCATTTT
 40 CGGCCTCAAGCTAGGCCAACACAAGGCTATAGTCATTAGTAAGTGGGAGATAGTCAA
 GGATTGTTTCACCAATAATGACATGAACCTTGCAACTAGACCTAGCATGGCTATTAGC
 45 AAATATATTGGTTATGACTTTGCCTCTTTCTCTATCTCACCTTATGGCCGATATTGGCG
 TGAGATTCGTAAGATCTCTACTGTTGAGCTCTTGTCAAACAAACGCCTTGAGAAAATG
 AAGCATGTTTCGAACCTTTTGAGGTGAACTCTTGCCTTCAAATCTTCTATGAAAAATGTG
 50 TCAAATCAGAGGATAATGAAAGTAATAAAGTAGCAAAAATTTGTCTTAAAAAGTGGT
 TAGAATATATTGGTTTTAATATCGCACTATCTATGATAGTTGGCAAGAGATTCTCCTAC
 GACCAGTATTATAAAAAAAATACTGTTGCATCGAGATTTATGAAGGCAATAGAAAGA
 55 GCAACCCACTTAGCAGGACTTCCTATACCCTCGGATTTTTTACCATGGGTGGAATGGA
 TGGATTTGGTGGGTACATTGGTGCTATGAAGGAACTCATAAGGAAATTGATGTGAT
 60 TATTGGACATTGGCTTGATGAGCATATTCAAAGAGGAAAGAGACGTTAGAAAGGCG
 AGGTACAAGCATTGATGATAGTGAATCATGGATGTAATGTTATCTAACATTACTGAA
 CAATTTGCCAAGTCAACCTACTCTAAAAACACCATCATTAAGCAACAGCTTTGACAC
 65

TACTTCTAACAGGTTTCAGAAAGCACCTCAATCACACTAACATGGGCCATATCACTACT
 TCTAAACAACCCTACGGCCCAAAATTTGGCCCAACAAGAAATGGACAAACAAGTTGG
 5 TAAACAAAGATGGGTTGAAGAATCTGACATCACCAATCTACCATACCTCCAAGCCATC
 ATAAAGGAACTTTACGTTTGTATCCACCAAGCCCATTAGCAGGCCCAAGAGTGGCCC
 AAGAAGACTGCCAAATCAATGGACATTGTATCACAAAAGGAACCCGGGTGATTGTTA
 10 ACATATGGAAGTTGCATCGTGATCCGATGGTTTGGTCCGACCCAGATAAGTTCCGACC
 CGAAAGGTTTATTGGGGAGCATAAGGATATTGATTTTAAGGGTCAATACTTTGGGTAT
 15 ATACCTTTTAGCTTGGGTAGGAGGGGTTGTCTTGGGATGAATTTTGGGCTACAAGTGG
 TCCATTTGATGTTAGCTCGTTTGGTCCAAGGGTTCGATATTTGGGCTCAAAATGGTGG
 CCTAATTGATTTGAAGGAAGGGTTGGGCTTGGCTTTGCCCAAGGCTGGTCCATTGGAT
 20 GTCATTCTTGCAACCACGTTTGTCCAGTGAGCTTTATGGAGCTTTATCAAAGGTGAATGT
 TACTTATGGTCGGGCAATGAATGAACTAGCTTTGTATTTATAATTTTACAAATAATTTG
 25 TAAGATATGAACTGTTTATCTAGTCACTTTTCCGCGTCTTAGAATATCAATAAGCAAA
 AAGTTTTATGTAATAATATGTATTAGTGTGTTATTGTATCATGATTCGTCGGTATACTG
 AAAATATTTTACGTCTAGGAGAATGTGCACACATTTAATCTTATTTGCTTATAAGTATT
 30 ATATACATAAAATTTTCTACTTTATAATTTAGGTATATTGAGCTTTGACCAAAACCCA
 AAAACTAAAGAAGTTTTTTTTTAAACATACAAGTTGGTATTGTTTAGATTTTTATTTAT
 TTTTATTATCTCTTTTATTTGTACTTAGTGGGTGTGTTAATAATGTAAAGAAGTATTAA
 35 ATATTTATAGAGTTGGAAAAACCCAATATTTTACATTGGAAAAA (SEQ ID NO: 36).

>similar a CYP78A9 de *M. jalapa*

40 TACGTCTCTAACCTCCTTCTCCTCACCATCATCATCTTATTTCTCTCTCTAACT
 TCCTATTTCTCTCTCTAGAATGGTCTCAACTAGTGACTCACTCTGGCTTTTCACCTACTT
 45 AGCTTCAAAATATGATCATTTTACGACCCCTAACTTTATTTATTCTTTGTTTTGTTTCGT
 AATATTTTTTATTTTGATTCATCTACTGTACTGGTCCCACCCAGGTGGTCCGGCATGGG
 GGAAGTATTCATGGACTCATCTCTCGGGATGGGCCGGGAAGCCCATCCCGGGCCCAA
 50 GAAGTTGGCCCATATAGGTGGTTTGGACCTGAAGATGGGACTGGCTCATCGGAAGTT
 AGCCACAATGGCTGAGAAATACGGGACCATGGCTAAGAGGCTCATGGCTTTTAGCCT
 55 AGGAGAAACACGCGTGATTGTCACGTGCAATCCCGACGTGGCGAAAGAAATACTAAA
 TAGCCCGGTTTTCTTGGACCGACCCGACCAGGAGTCGGCTTATGGGTTGATGTTTAAAC
 CGGTCTATAGGGTTTCGCACCCTATGGGACCTACTGGCGAACCCTAAGGAAAATAACA
 60 TCAACCCATTTATTAAGCCCTAAACACGTAAAAGAATATGAGAACCTACGTAGGGAA
 ATAATGGAACAAATGGTTGACTCGATATCGAACCAAGCCGGACCGGTTCCGGTCCGG
 65 GAAATACTAAGGAGGGCTTCATTGGATAATATGATGGGGTCAGTGTTTGGTGGGCCCC

ACAAGGAGGTCGTTGAACAGTTGATAGAAATGGTTGGTGAAGGGTATGACTTATTGG
 GTGTCCTTAATTTGGGGGACCATCTATCTTGGCTAGCCGAGTTTGACTTTCAAAAGGTT
 5 CGGTTCAAGGTGCTCTCAACTTGTTC AAAAGTCAACCGGTTGCTTGGTGAAATTATCG
 ATGAACATCGGTCTAGTTCGGGTCAAATTATGAACCGGGACTTTGTTGATGTTTTGTT
 GACTCTACCACAACATGAACAACCTTTCTCATTCTGACATGGTCGCTGTTCTTTGGGAG
 10 ATGATATTTAGAGGAACAGATGCAACAGCAGTATTAATAGAATGGACATTAGCACGA
 TTAGTAATTCATAAAGATATTCAATCAAAGGTCCAAAATGAGTTAGACCAAGTAGTTG
 GAACATCACGAGCCGTTGAAGAGTCTGACCTATCATCACTGATATATCTAACGGCTGT
 15 GATTAAAGAAGTATTGCGGGTCCACCCACCTGGGCCCCCTCCTATCGTGGTCTCGCCTT
 TCAATTCAAGATACTACTATAGATGGTTGTATGTGCCAAAAGGTACTACTGCTATGG
 TTAACATGTGGGCTATTGCTAGAGATCCTAATGTGTGGGCCAACCCAGATGAATTTGA
 CCCGGATAGATTTTTAATCGGTGGGTCCGAGTTTGAGTTCTCTGTTCTTGGGTCCGATC
 TTAGACTTGCCCCCTTTCGGGTTCGGGTTCGTAGGTCATGTCCTGGGAAGGTCTTAGGTTT
 25 GACCACAGTCAGTTTTTTGGGTTGCTTCACTCTTG CATGAGTTTGAGTGGGTGACATCA
 CCTAACGCTGACGTGGATTTGAGTGAAGTGCTTAAGCTTTCGTGTGAGATGGCTCATC
 CTCTTACCGTGGAAGCTAGGCCGCGACGTCATTAATTTTACAAAAGACGATATTCTCA
 TACACAGATTATTGTCAACTTTATCAATATATACGGGTGATAGTTTGACATTGTTATAG
 TATTCGGAAAAATATTTTCTAGAGATAAGTAAATTTATAATAATCTAAAAAACTGAAT
 35 GTATAATTATATTAATTAATGTACTAATGTTATTATAATGTTTATAAATGATTGTGAAA
 TATATATGGTTAACATTATATGTAATGAGAAATGGTTTGCTTGGCAAAAA (SEQ ID NO:
 40 37).

>similar a CYP86B1 de *M. jalapa*

GCTAGCTGCCTTGTTCAATTTCAAGAACAATATACACTAGTCAATCCATTTCA
 45 AATGGCCTACTTAGAAATTGTCATATTCTTCATTTTTCTCATCGTAATTTGTTTTCTTT
 TCGTGACAAAAATGGTCTCCCAACAAATTGGCCGATTGTTGGGATGCTACCAGCTGTT
 50 CTAATCAATCTTCATAGAATTAATGACTATTTTGCTGAACTTGTTGCTAAATCAAATTT
 AACATTCTCATTTAAGGGTCCTTGGTTTAGCAACATGCGAATTTTAGCGACAGTTGAT
 CCAGCAAATGTGCACCATATAATGAGTAAGAATTTTAACAATTATCCTAAGGGTGCTA
 55 AGTTTTACGACATCTTTGATATACTTGGAGATGGTATTTTAAACACCGACTTTAATATA
 TGGCAATACCATCGGAAAAATGGCTCAGTCATATATTGGTGACTCAAGATTTCACAAT
 60 TTTTGTGGAAGAAAGTTGGGGAAAAGATTGAAGGTGGATTAATTCCTATCCTTGATCA
 TGTGTCATGCAAGGGTTACAAGTTGATTTACAAGATTTATTTGAAAGGTTTACTTTTG
 65 ATACTATTTGTTCACTTATTATGAACTATGATCCTATGTCTTTGTCCATTGATTTTCCTG

ATGTTCCATCATCTAAGGCTCTAGATGTTGCTGAAGAAGTCATACTTCTTCGTCATTTA
 GTACCTACAAGTGTTTGGAAAGTTTCAAAGATGGTTAGGTGTAGGGATGGAAAAGAAG
 5 CATAAGATAGCTTGGCAAGTACTTGATGATTTTCAATTTATGAGTGCATATCAAGGAAAA
 GAGAAGAGATGAGAGATAGTTTGTCTATGAGAATAAGGACAATGAGATGGGTGTTG
 ATTTAATGACATTGTATATGAATGAAATCAAAGTAATGAACTTGTCAAGGATGATCC
 10 TAACAAGTTTTTGGAGGGATACTATTCTTAACTTTTTTATTGCAGGTCGAGATACAACTA
 GTACTGCTTTATCGTGGTTTTTCTATCTACTATCCAAGAATCCACAAGTGGTAGAAAA
 GATTAGACAAGAGTTATCTTGGATCGTTTCACAAGAAAAAACTAAAAATTATGCTAAT
 15 TTGATTGATAAACTTGTTTATCTTCATGCCGCATTATGTGAAGCTTTAAGATTATATCC
 TCCGGTGGTATTTGAAGCAAAGTCTCCGATTGAATCGGACACTTTACCAAGTGGTCAT
 20 AAGATTGATCCTGACACACAAATAATCTTAAATATGTACGCAATGGCGAGGATGAAA
 ACAATATGGGGCGATGATTGCGATCAATTTAAACCTGAGAGGTGGATATCATCAACA
 ACAGGAAAGATTAAGCATGAACCTTCGTACAAGTTCTTGGCTTTTAATGCAGGACCAA
 25 GAACTTGTGTAGGAAAAAATATGGCTTTTACTCAAATGAAAGCAATAGCAATAGCTA
 TATTACAAAATCATATACATGGTATTGATGGACAAGTTATTGAACCTGATCTATC
 30 CATAATTCTCCATATGAAGAATGGATTCAGAGTAACTGTTTCACCGTGTAACGTTTCT
 ATATAACCATCGAGAGAACCAAGTTTCTCGATCTCTTTTAAACATTGTAATGTTTAAT
 TATCAACTAAAAAATCGTATATTCTCTTCGTTTCATTTTTTCTTTTTCTTTTTATCAAA
 35 GATCAAGGTAACGTCGGAAATAACCATATTGTTTTCTTTGGTTAAATGAAAAGACAAT
 GTAAGTTGTAAAAGTATGTAAGTGTAATAAATAAATTTAAAAAATTGTGTGAAAATAA
 40 GTTGTAATAAATAAAGAATAATGTTGGTATTTTATTGTTTACTATTTTGATAAACAGAA
 AAAATAAATAAAACTGTTTAAAAATAAAAGTGAGAAGAAAAAAATAAAAGAAAA
 T (SEQ ID NO: 38).

Transformación de hipocótilo de *Solanum nigrum*

Medio

Jones Líquido (pH 5,2)
 Medios basales (pH a 5,8 con NaOH antes de añadir el agar)
 MS con vitaminas (cat M0222) = 4,41 g/l
 Sacarosa 3 % = 30 g/l
 Agarosa (agar vegetal) 0,6 % = 6 g/l

Tabla 3. IND1 (primer medio de inducción de callos)

	Solución madre	Concentración final en medio	Amt. para añadir a 1 L de medio basal	Amt. para añadir a 800 ml de medio basal
IAA	0,2 mg/ml	0,02 mg/l	100 µl	80 µl
BAP	1 g/l	1 mg/l	1000 µl	800 µl

Tabla 4. IND2 (segundo medio de inducción de callos)

	Solución madre	Concentración final en medio	Amt. para añadir a 1 L de medio basal	Amt. para añadir a 800 ml de medio basal
IAA	0,2 mg/ml	0,02 mg/l	100 µl	80 µl
BAP	1 g/l	1 mg/l	1000 µl	800 µl

Kan*	100 mg/ml	75 mg/l	750 µl	600 µl
Tic	100 mg/ml	100 mg/l	1000 µl	800 µl
*Fabricar medios sin Kan para los controles				

5

Tabla 5. BROTE (medio de inducción de brotes)

	Solución madre	Concentración final en medio	Amt. para añadir a 1 L de medio basal	Amt. para añadir a 800 ml de medio basal
BAP	1 g/l	0,5 mg/l	500 µl	400 µl
Kan*	100 mg/ml	25 mg/l	250 µl	200 µl
Tic	100 mg/ml	100 mg/l	1000 µl	800 µl
*Fabricar medios sin Kan para los controles				

10

Tabla 6. MAT (medio de maduración)

	Solución madre	Concentración final en medio	Amt. para añadir a 1 L de medio basal	Amt. para añadir a 800 ml de medio basal
Kan*	100 mg/ml	25 mg/l	250 µl	200 µl
Tic	100 mg/ml	100 mg/l	1000 µl	800 µl
*Fabricar medios sin Kan para los controles				

15

20

Tabla 7. RAÍZ (medio de enraizamiento en magenta)

	Solución madre	Concentración final en medio	Amt. para añadir a 1 L de medio basal	Amt. para añadir a 800 ml de medio basal
Kan*	100 mg/ml			
Tic	100 mg/ml			
IBA	2 mg/ml			
*Fabricar medios sin Kan para los controles				

25

Procedimiento

30

*Trabaje siempre en una campana de flujo, cerca de una llama

*Use fórceps y bisturí esterilizados con EtOH y flameados

*Selle las placas con parafilm antes de retirarlas de la campana de flujo

Prepare las *Agrobacterium*:

35

Elija una colonia de una nueva transformación en GV3101 de *Agrobacterium* e inocule 7,5 ml de tampón LB en un tubo falcon de 50 ml

Cultive, agite a 28 °C durante la noche

Añada Jones líquido (pH 5,2) hasta un volumen total de 25 ml

40

Manejo del explante:

Mediante el uso de plántulas que tienen cotiledones expandidos, pero sin hojas verdaderas, retire las plántulas individuales con pinzas esterilizadas y colóquelas en una placa de Petri estéril (aprox. 30 hipocótilos por placa).

45

Corte el hipocótilo mediante el uso de un bisturí estéril, sumerja el bisturí en la mezcla de *Agrobacterium* antes de cada incisión.

Para el control, sumerja el bisturí en Jones líquido antes de cada incisión.

Coloque todos los explantes en placas IND1 y colóquelos en el cuarto de cultivo en la oscuridad durante 3 días (envuélvalos en papel de aluminio).

50

Subcultivo subsecuente:

Traslade los explantes a las placas IND2 (espaciándolos más -20 por placa) y colóquelos en el cuarto de cultivo con ciclos de luz/oscuridad

55

*Compruebe las placas cada dos días en busca de contaminación y transfiera los explantes sanos a medios frescos antes si la contaminación es visible.

Después de 2-3 semanas, se formarán callos en los extremos de los explantes (donde se cortaron). Corte los callos del resto del tejido y transfíalos al medio BROTE.

Si los callos no se han formado, traslade a medios IND2 frescos.

60

Después de 1-2 semanas, los brotes verdes comenzarán a desarrollarse a partir de los callos. Transfiera estos callos a los medios MAT.

Si no se han formado brotes, traslade a medios de brotes frescos.

Después de 1-2 semanas, los brotes deben ser lo suficientemente grandes como para separarlos del callo y transferirlos al medio RAÍZ (en magentas).

Si los brotes aún son pequeños, traslade a medios MAT frescos.

65

Traslade las plántulas a un medio RAÍZ fresco cada 2-3 semanas hasta que tengan suficientes raíces para trasladarlos al suelo.

Ejemplo 2

El perfilado del transcriptoma y análisis de expresión conjunta en *Mirabilis Jalapa* sugiere la implicación de un miembro de la subfamilia CYP76AD1 en la biosíntesis de Betalaina

El objetivo principal de este estudio fue dilucidar la primera etapa comprometida en la biosíntesis de betalainas en plantas, que comienza con el aminoácido aromático tirosina. Alcanzar esto cerraría la brecha en nuestro conocimiento actual con respecto a las enzimas vegetales y los genes que actúan en la vía central de la betalaina (Figura 1). Dado que los datos de la secuencia del genoma y el transcriptoma de las plantas productoras de betalaina son actualmente muy limitados, generamos un conjunto completo de datos de transcriptoma a partir de la planta de *Mirabilis jalapa* pigmentada con betalaina (es decir, las cuatro en punto). Se secuenciaron las bibliotecas de 24 tejidos de *M. jalapa*, lo que incluye los productores como los no productores de betalaina. El conjunto de tejidos seleccionado proporcionó una representación temporal y espacial de la síntesis de betalaina, ya que se tomaron muestras de cuatro partes florales diferentes (es decir, pétalos, estambres, anteras y estigmas) en cinco etapas del desarrollo, cada una de las cuales exhibió una pigmentación creciente durante el desarrollo (Figura 2 A a F).

Los datos del transcriptoma se analizaron primero mediante el examen de los patrones de expresión génica de los genes relacionados con la betalaina previamente identificados en *M. jalapa*, específicamente, DOPA 4,5-dioxigenasa (MjDOD), ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT) y el citocromo P450 CYP76AD3. Se encontró que estos tres genes exhiben patrones de expresión que son similares a la acumulación de pigmento (es decir, aumento de la expresión durante el desarrollo de la flor y mayor expresión en tejidos rojos frente a verdes) (Figura 2G). Por tanto, se podrían encontrar potencialmente genes adicionales relacionados con la betalaina mediante análisis de expresión conjunta, en busca de genes con patrones de expresión que se correlacionen altamente con los de MjDOD, cDOPA5GT o CYP76AD3.

Se cree comúnmente que la hidroxilación de la tirosina en plantas productoras de betalaina es catalizada por una enzima tirosinasa (polifenol oxidasa). Por lo tanto, inicialmente buscamos un gen que codifique tirosinasa que se exprese conjuntamente con MjDOD, cDOPA5GT o CYP76AD3, sin embargo, no se encontró ninguno. Tampoco pudo detectarse una polifenol oxidasa expresada en un patrón paralelo a la acumulación de betalaina mediante el examen manual de los genes anotados como polifenol oxidasas en el conjunto de datos de *M. jalapa* (Figura 3). Alternativamente, la formación de L-DOPA podría, en teoría, ser catalizada en *M. jalapa* mediante una enzima del tipo citocromo P450. Se encontró que cuatro genes que codifican el citocromo P450 se expresan conjuntamente con uno o más de los genes conocidos relacionados con la betalaina usados como cebos, específicamente, similar a CYP82G1 (SEQ ID NO: 36), similar a CYP78A9 (SEQ ID NO: 37), similar a CYP86B1 (SEQ ID NO: 38) y similar a CYP76AD1 (SEQ ID NO: 1). Este último, en lo adelante denominado MjCYP76, se destacó como un candidato prometedor, ya que exhibe altos valores de expresión en todo el conjunto de datos, en un patrón que se correlacionó altamente con la acumulación de betalaina (Figura 2G).

Ejemplo 3

El silenciamiento conjunto de CYP76AD1 y CYP76AD6 inhibe la producción de betalaina en *Beta vulgaris*

Para examinar si MjCYP76 está realmente implicado en la biosíntesis de betalaina, se necesitó un ensayo de silenciamiento génico. Dado que no se dispone de un procedimiento de transformación robusto y estable para ninguna planta productora de betalaina, decidimos aplicar el silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS), un método ampliamente usado para el silenciamiento de genes transitorio en plantas que es altamente adecuado para rastrear los fenotipos de pigmentación. Sin embargo, se demostró previamente que el silenciamiento de genes con el método VIGS era particularmente desafiante en *M. jalapa*, muy probablemente debido a la actividad inhibidora de la proteína antiviral de *Mirabilis* (MAP), y solo podría lograrse cuando el gen MAP se silencia conjuntamente con el gen de interés. Los intentos de silenciamiento génico en *M. jalapa* mediante el uso de VIGS no tuvieron éxito en nuestras manos, lo que incluye el intento de silenciamiento de cDOPA5GT, lo que debería dar como resultado una pérdida parcial de la pigmentación de betalaina en la planta. Por lo tanto, procedimos a tratar de identificar un ortólogo MjCYP76 en una especie de planta productora de betalaina diferente, en la que los ensayos de silenciamiento génico pueden implementarse de manera efectiva. Se describió previamente un método VIGS eficiente mediante el uso de infiltración al vacío en remolacha roja, que se usó con éxito para silenciar genes relacionados con betalaina. La identificación de un ortólogo MjCYP76 en la remolacha roja podría, por tanto, ayudar en la evaluación de la relevancia de este gen para la biosíntesis de betalaina.

Con este fin, secuenciamos los transcriptomas de tejidos de hipocótilo de tres variedades de remolacha; una variedad de 'remolacha dorada' que produce únicamente betaxantinas amarillas, así como también una variedad de remolacha roja y una 'remolacha rayada', las cuales tienen hipocótilos pigmentados de rojo. Se esperaba que un ortólogo MjCYP76 en la remolacha, que supuestamente desempeñaría un papel clave en la biosíntesis de betalaina, se expresara altamente en los tres tejidos. Los homólogos se identificaron mediante la consulta tBLASTx del conjunto de datos del transcriptoma de remolacha con la secuencia codificante MjCYP76. Se encontraron cóntigos que representan ocho genes diferentes del citocromo P450 con alta homología de secuencia con MjCYP76 (más del

50 % de identidad en el nivel de proteína), lo que incluye el CYP76AD1 previamente caracterizado (Figura 4A). El gen con la puntuación más alta, BvCYP76new, se seleccionó como un candidato potencial para ser un ortólogo funcional de MjCYP76 en la remolacha. Un gen adicional dentro de este grupo, denominado en lo adelante CYP76AD6, que contiene una identidad del 60 % con MjCYP76 a nivel de nucleótidos y del 53 % a nivel de aminoácidos, exhibió valores de expresión marcadamente más altos en comparación con los otros parálogos y, por lo tanto, también se seleccionó para análisis subsecuentes.

Los fragmentos de BvCYP76new y CYP76AD6 se clonaron en el vector VIGS pTRV2 y se introdujeron en plántulas de la variedad de remolacha roja 'sangre de toro', que produce plantas con hojas de color rojo oscuro altamente pigmentadas y, por lo tanto, es particularmente compatible para ensayos de silenciamiento génico para genes relacionados con la betalaina. Dado que la reacción de la tirosina hidroxilasa para formar L-DOPA es esencial para la formación de todos los compuestos de betalaina, lo que incluye las betacianinas rojas y las betaxantinas amarillas, se esperaba que el silenciamiento de BvCYP76new o CYP76AD6 produjera plantas que exhibieran manchas verdes, debido a la carencia de pigmentación de betalaina. pTRV2:BvDODA1 y pTRV2:CYP76AD1 también se introdujeron en plántulas de remolacha y sirvieron como controles positivos para el ensayo. El silenciamiento de BvCYP76new o CYP76AD6 no dio como resultado ningún fenotipo visible (datos no mostrados), mientras que el silenciamiento de BvDODA1 y CYP76AD1 produjo manchas de color verde o amarillo, respectivamente, como se informó previamente. Una posible explicación de la carencia de fenotipo visible al silenciar un gen que supuestamente codifica la enzima responsable de la producción de L-DOPA, fue que esta enzima puede ser redundante con otra enzima o enzimas que también catalizan la misma reacción. Uno de esos candidatos es CYP76AD1, que posiblemente podría catalizar la etapa de hidroxilación de la tirosina además de su actividad demostrada experimentalmente de conversión de L-DOPA a ciclo-DOPA. CYP76AD1 tendría que actuar de forma redundante con otra enzima, ya que el silenciamiento de CYP76AD1 no previene la formación de betaxantinas, de las que la L-DOPA es un precursor esencial (Figura 1). Esta hipótesis podría examinarse mediante el silenciamiento conjunto de BvCYP76new o CYP76AD6 junto con CYP76AD1.

Por lo tanto, construimos vectores pTRV2 que albergan fragmentos de CYP76AD1 con cualquiera de los candidatos BvCYP76new o CYP76AD6, en tándem. Se llevó a cabo un experimento subsecuente de silenciamiento de BvDODA1, CYP76AD1, BvCYP76new o CYP76AD6, como se hizo en el experimento con VIGS mencionado anteriormente, además del silenciamiento conjunto de CYP76AD1 con cada uno de los candidatos a CYP76. Las plantas en las que se silenciaron conjuntamente CYP76AD1 y BvCYP76new produjeron manchas amarillas en las hojas, de manera similar a las plantas en las que solo se silenció CYP76AD1. Sin embargo, el silenciamiento conjunto de CYP76AD1 y CYP76AD6 provocó un fenotipo claramente evidente de manchas verdes, que carecen tanto de betacianinas como de betaxantinas, de manera similar al fenotipo obtenido mediante el silenciamiento de BvDODA1 (Figura 5A, B). Las diferencias en los niveles de acumulación de betaxantina también podrían observarse mediante imágenes de luz azul (Figura 5C), en las que las betaxantinas típicamente exhiben una fuerte fluorescencia. La acumulación reducida de betaxantina en tejido silenciado conjuntamente con CYP76AD1-CYP76AD6 frente a tejido silenciado con CYP76AD1 se demostró adicionalmente mediante análisis espectrofotométrico (Figura 6A). Estos hallazgos respaldaron la noción de redundancia en la etapa de hidroxilación de la tirosina de la biosíntesis de betalaina en remolacha roja, por lo que esta etapa puede ser catalizada por CYP76AD1 o CYP76AD6. Adicionalmente, el hecho de que el silenciamiento de CYP76AD1 solo bloquee la producción de betacianinas pero no de betaxantinas, sugirió que CYP76AD6 no cataliza la conversión de L-DOPA a ciclo-DOPA, sino solo la formación de L-DOPA a partir de tirosina.

Se realizó un análisis de qRT-PCR para examinar la expresión de CYP76AD1 y CYP76AD6 en plantas infectadas con los vectores pTRV2:CYP76AD1 o pTRV2:CYP76AD1-CYP76AD6. CYP76AD1 se encontró que estaba regulado negativamente tras la infección con ambos vectores, mientras que CYP76AD6 solo mostró una regulación negativa después de la infección con pTRV2:CYP76AD1-CYP76AD6 (Figura 6B). También se examinó la expresión de cuatro parálogos de CYP76AD1 y CYP76AD6. Tres de los cuatro parálogos examinados mostraron una regulación negativa en los tejidos infectados con al menos uno de los vectores pTRV2:CYP76AD1 o pTRV2:CYP76AD1-CYP76AD6 (Figura 4A). Por tanto, la posible implicación de uno o más de estos parálogos en la biosíntesis de betalaina no puede descartarse en la actualidad. Sin embargo, la irrelevancia de uno de los tres parálogos, BvCYP76new, en la biosíntesis de betalaina puede inferirse de los resultados de los experimentos de silenciamiento, ya que el silenciamiento de BvCYP76new solo no provocó cambios visibles en el fenotipo, y el silenciamiento de este gen junto con CYP76AD1 produjo el mismo fenotipo que se observó cuando CYP76AD1 se silenció solo.

Ejemplo 4

La expresión transitoria de CYP76AD1 en *N. Benthamiana* permite la producción de L-Dopa y betacianinas

Si CYP76AD1 de hecho cataliza tanto la formación de L-DOPA como su conversión a ciclo-DOPA, entonces la expresión heteróloga de CYP76AD1 junto con una enzima DOD y una glucosiltransferasa relacionada con la betalaina (por ejemplo, ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa o betanidin-5-O-glucosiltransferasa) debería ser suficiente para la biosíntesis de la betacianina glicosilada ampliamente común, la betanina. Para probar esto, generamos constructos de sobreexpresión para los genes de remolacha BvDODA1 y CYP76AD1 y el gen ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa (cDOPA5GT) de *M. jalapa*, que se usará para la sobreexpresión transitoria mediada

por agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se fabricaron dos vectores para este propósito; uno para la sobreexpresión de BvDODAI bajo el control del promotor 35S de CaMV (pDODA) y otro vector para la expresión en tándem de CYP76AD1 y cDOPA5GT, impulsados por los promotores 35S de CaMV y ubiquitina-10 de Arabidopsis, respectivamente (pAD1-GT). La infiltración conjunta de agrobacterias (*Agrobacterium tumefaciens*) que albergan los vectores pDODA y pAD1-GT en las hojas de *N. benthamiana* provocaron la aparición de una pigmentación de color rojo oscuro en las áreas infiltradas dentro de los 2-3 días posteriores a la infiltración (Figura 7A). El análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) reveló que el tejido foliar pigmentado contenía altos niveles de betanina, así como también del isómero isobetanina de betanina (Figura 7B; Tabla 2). Este resultado proporcionó una primera prueba de concepto para la posibilidad de producción *in-planta* de betalaína manipulada por ingeniería genética sin alimentación de sustrato. Adicionalmente, la formación de betacianinas sin necesidad de alimentación con L-DOPA o sobreexpresión de una enzima hidroxilante de tirosina (por ejemplo, tirosinasa) indicó que CYP76AD1 cataliza la formación de L-DOPA además de su actividad previamente conocida de convertir L-DOPA en ciclo-DOPA.

Sin embargo, la producción de betalaínas puede haber sido posible alternativamente debido a la presencia de L-DOPA en hojas de *N. benthamiana* como resultado de actividad tirosina hidroxilasa por una enzima endógena. Para examinar si la producción de L-DOPA era posible debido a la expresión de CYP76AD1, se infiltró pAD1-GT en hojas de *N. benthamiana* sin pDODA. La introducción de un vector que sobreexpresa la proteína YFP (pYFP) se usó como control para este experimento. El análisis de LC-MS confirmó la presencia de L-DOPA en tejidos infiltrados con pAD1-GT pero no en tejidos infiltrados con pYFP (Figura 7C).

Ejemplo 5

La expresión transitoria de CYP76AD6 en *N. benthamiana* permite la producción de L-DOPA y betaxantinas

La actividad de tirosina hidroxilasa de CYP76AD6 también se evaluó mediante la sobreexpresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Se construyó un vector de sobreexpresión para CYP76AD6 bajo el control del promotor 35S de CaMV (pAD6) y se insertó en agrobacterias. La infiltración conjunta de pAD6 y pDODA dio como resultado la aparición de una pigmentación amarilla en las áreas infiltradas, visible dentro de varios días posteriores a la infiltración. (Figura 7D). El análisis de LC-MS del tejido pigmentado de amarillo reveló la presencia de un compuesto principal de betaxantina, identificado como indicaxantina (prolina-betaxantina) (Figura 7E). Se encontró que dos compuestos adicionales exhibían espectros típicos de absorción de luz de betaxantina, uno de los cuales supuestamente se identificó como dopaxantina-hexósido, basado en la masa precisa y la fragmentación (Tabla 2). En particular, las betaxantinas glicosiladas no se producen, hasta donde tenemos conocimiento, en especies productoras de betalaína natural. El hecho de que la infiltración conjunta de CYP76AD6 y BvDODAI indujera la producción de betaxantinas pero no de betacianinas coincide con los datos obtenidos en los ensayos de silenciamiento génico mencionados anteriormente, lo que confirma que CYP76AD6 cataliza solo la etapa única de formación de L-DOPA y no su conversión subsecuente a ciclo-DOPA. La agroinfiltración del vector pAD6 solo dio como resultado la producción de L-DOPA en las hojas de *N. benthamiana*, verificado mediante LC-MS (Figura 7F).

Ejemplo 6

La expresión recombinante de CYP76AD1 y CYP76AD6 permite la síntesis de betalaínas en levaduras

La actividad de CYP76AD1 y CYP76AD6 se evaluó posteriormente mediante la expresión recombinante de cada una de las dos enzimas en levadura, junto con BvDODAI. Con este fin, las secuencias codificantes completas de BvDODAI, CYP76AD1 y CYP76AD6 se clonaron en vectores de sobreexpresión de levadura inducibles por galactosa y se transformaron en células *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras se cultivaron subsecuentemente en medio SD estándar, sin suplementación con L-DOPA. De manera similar a los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* analizados anteriormente, se observó pigmentación rojo púrpura en medios de levadura que expresaban CYP76AD1 y BvDODAI, mientras que la pigmentación amarilla fue evidente en medios de levadura que expresaban CYP76AD6 y BvDODAI. La expresión de cada una de las enzimas del citocromo P450 sin BvDODAI o la expresión de BvDODAI solo no dio como resultado la formación de pigmentos rojos o amarillos. Adicionalmente, la expresión conjunta de CYP76AD1, CYP76AD6 y BvDODAI dio como resultado la formación de una pigmentación anaranjada en el medio (Figura 8A). Se utilizó el análisis LC-MS para verificar la presencia de betalaínas en los medios pigmentados de amarillo, rojo-púrpura y anaranjado (Figura 7C; Tabla 2).

Ejemplo 7

CYP76AD6 pertenece a un clado filogenético que no se asoció previamente con la biosíntesis de betalaína

En un estudio publicado recientemente, los análisis filogenéticos a gran escala de las plantas Caryophyllales sugirieron la presencia de varios eventos de duplicación de genes del locus CYP76AD1 al principio de la historia evolutiva de Caryophyllales. Se sugirió que estos eventos dieron lugar a tres clados dentro del linaje CYP76AD1, denominados CYP76AD1- α , CYP76AD1- β y CYP76AD1- γ . Los inventores dedujeron que el clado CYP76AD1- α está directamente asociado con la biosíntesis de betalaína, ya que incluye, entre otros, el gen CYP76AD1 caracterizado funcionalmente de *B. vulgaris* y su ortólogo CYP76AD3 de *M. jalapa*, que también se ha implicado en desempeñar

un papel similar en la biosíntesis de betalaína. Sin embargo, actualmente no se conoce nada con respecto a la función de los genes pertenecientes a los clados CYP76AD1- β y CYP76AD1- γ . Curiosamente, el gen CYP76AD6 informado aquí [acceso 'Bv9_228610_yqeq.t1' en el genoma de *B. vulgaris*] está posicionado en el clado CYP76AD1- β , como se demuestra en los análisis filogenéticos presentados por Brockington y colaboradores, y presentado además aquí en un árbol filogenético de máxima probabilidad (Figura 8B). El alineamiento por parejas de las secuencias de las proteínas CYP76AD6 y CYP76AD1 mostró una identidad del 72 % (Figura 9). Sus genes correspondientes exhiben una identidad de secuencia del 70 % a nivel de nucleótidos.

Ejemplo 8

La ingeniería metabólica de pigmentos de betalaína roja en plantas transgénicas requiere la expresión heteróloga de tres genes biosintéticos

Como se analizó anteriormente, pudimos generar betacianinas rojas y betaxantinas amarillas mediante la sobreexpresión transitoria de genes en hojas de *N. benthamiana*. Subsecuentemente, intentamos manipular por ingeniería genética la producción de betalaína en especies de plantas naturalmente no productoras mediante una transformación estable. Con este fin, se usó la clonación de Goldenbraid para generar un constructo de cuatro genes (denominado en lo adelante pX11), en el que CYP76AD1, BvDODA1 y cDOPA5GT se expresan en tándem y están impulsados por promotores constitutivos, además de un gen de resistencia a la kanamicina para la selección de transgenes (Figura 10). El vector pX11 se sometió a prueba inicialmente mediante agroinfiltración en *N. benthamiana*. De manera similar a la infiltración conjunta de pDODA y pAD1-GT, la introducción de pX11 dio como resultado una pigmentación roja del tejido infiltrado (Figura 12B). Se realizó un análisis de LC-MS del tejido infiltrado con pX11 para determinar la composición de betalaínas. Se encontraron picos correspondientes a betanina e isobetanina, como se observó previamente mediante la infiltración conjunta de los vectores de sobreexpresión pDODA y pAD1-GT (Figura 11A). También se identificó el compuesto de betaxantina indicaxantina (prolina-betaxantina), lo que indica algún nivel de flujo hacia la formación de betaxantina. Se reconocieron dos metabolitos adicionales como betacianinas, basado en los espectros de absorción de la luz y la fragmentación, que incluían el casi ubicuo fragmento de betacianina, betanidina ($m/z = 389$; Tabla 2). El tejido de la hoja infiltrado con pX11 apareció intensamente pigmentado de rojo, aparentemente con producción de betacianinas en grandes cantidades (Figura 12B). Por lo tanto, se evaluó el tejido infiltrado para determinar el contenido total de betacianina mediante análisis espectrofotométrico, y se encontró que contenía un estimado de 330 mg kg⁻¹, más alto que las brácteas rojas de *Bougainvillea glabra* y los pétalos rojos de *M. jalapa*, que contenían 120 mg kg⁻¹ y 250 mg kg⁻¹ de betacianinas, respectivamente, y 2,3 veces menor que la raíz de remolacha roja, que se estimó que contenía 760 mg kg⁻¹ (Figura 12C).

El vector pX11 se usó después para la transformación estable de varias especies de plantas, lo que incluye el tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), papa (*Solanum tuberosum*), berenjena (*Solanum melongena*), tabaco de árbol (*Nicotiana glauca*), hierba mora negra europea (*Solanum nigrum*), Petunia (*Petunia x hybrida*) y *Nicotiana benthamiana*. Se cultivaron conjuntamente los explantes de las diferentes especies con agrobacterias y se colocaron en medios selectivos. En *N. benthamiana*, *N. glauca*, Petunia y tomate, se observaron pequeñas manchas de pigmentación rojo-púrpura en la superficie del explante a los dos días de cultivo conjunto con agrobacterias. En todas las especies transformadas, la introducción de pX11 provocó la formación de callos de color rojo-púrpura, que generalmente aparecieron dentro de 1-2 semanas de cultivo (Figura 11A). Se encontró con LC-MS que los tejidos de callos de *N. benthamiana* y *N. glauca* pigmentados contenían betanina e isobetanina. Adicionalmente, se encontró un nuevo compuesto de betacianina no identificado en el callo de *N. glauca* (Figura 10B, Tabla 2).

El cultivo de tejidos de tabaco transformado con pX11 (*Nicotiana tabacum* L cv. Samsun-NN) condujo eventualmente a la generación de plantas maduras, intensamente pigmentadas de rojo, que mostraron acumulación de betalaína en todos los órganos principales de la planta, lo que incluye tallos, hojas, raíces y flores (Figura 13). El análisis de LC-MS de hojas de tabaco pX11 transgénico validó la presencia de betacianinas, betanina e isobetanina, así como también del compuesto de betaxantina vulgaxantina I (glutamina-betaxantina) (Tabla 2). El contenido de betacianina de las hojas de tabaco pX11 se midió adicionalmente mediante espectrofotometría en 135 mg kg⁻¹ (Figura 12C).

Ejemplo 9

Discusión

CYP76AD1 y CYP76AD6 catalizan de manera redundante la hidroxilación de tirosina, la primera etapa comprometida en la biosíntesis de betalaína en plantas

En este estudio, hemos demostrado la implicación de CYP76AD1 en la hidroxilación de la tirosina a L-DOPA en la remolacha roja, además de su función previamente informada en la catálisis de la reacción subsecuente que conduce a la formación de ciclo-DOPA. Además, identificamos una enzima citocromo P450 adicional de remolacha, CYP76AD6, que cataliza la primera etapa de hidroxilación en redundancia con CYP76AD1 (Figura 1). Un ortólogo CYP76AD6, MjCYP76, se identificó principalmente en *Mirabilis jalapa*, que exhibe un patrón de expresión que es

similar a la acumulación de betalaina. Es probable que MjCYP76 y el CYP76AD3 previamente identificado, respectivamente, cumplan las mismas funciones en *M. jalapa* como lo hacen CYP76AD6 y CYP76AD1 en la remolacha roja, aunque esto aún debe verificarse de manera concluyente mediante análisis funcionales, principalmente ensayos de silenciamiento génico en *M. jalapa*.

La implicación de CYP76AD6 en la formación de L-DOPA se demostró inicialmente mediante ensayos de silenciamiento génico; mientras que silenciar CYP76AD1 por sí solo inhibe la formación de betacianinas pero no de betaxantinas, silenciar CYP76AD1 y CYP76AD6 en paralelo bloquea la formación de ambos grupos de betalaina. El silenciamiento de CYP76AD6 solo no produce un fenotipo visible, ya que la formación de L-DOPA y ciclo-DOPA continúa catalizada por CYP76AD1. Esta carencia de fenotipo visible puede explicar parcialmente por qué CYP76AD6 y la etapa de hidroxilación de la tirosina fueron los últimos en descubrirse dentro de la vía central de biosíntesis de la betalaina. Si bien los genes similares a DOD y CYP76AD1 pudieron identificarse en especies productoras de betalaina mediante mutaciones naturales o inducidas artificialmente que provocan fenotipos claramente visibles, CYP76AD6 no pudo, debido a su redundancia funcional con CYP76AD1. Las funciones sugeridas de CYP76AD1 y CYP76AD6 en la biosíntesis de betalaina se corroboraron adicionalmente mediante la expresión recombinante en *N. benthamiana* y células de levadura, que condujeron a la formación de betacianinas o betaxantinas, respectivamente, cuando se acoplaron a la expresión de BvDODAI. Adicionalmente, la formación de L-DOPA en *N. benthamiana* se detectó cuando CYP76AD1 o CYP76AD6 se sobreexpresaron sin BvDODAI.

CYP76AD1 y CYP76AD6 pertenecen a dos clados separados dentro de la subfamilia CYP76AD1, denominados clados CYP76AD1- α y CYP76AD1- β . Es concebible que las dos enzimas de citocromo P450 compartan algún grado de relación estructural, ya que catalizan redundantemente una reacción enzimática idéntica. Además, se informó previamente que los citocromos P450 que pertenecen a una sola subfamilia catalizan etapas subsecuentes en la misma vía biosintética. Es plausible que mientras el clado CYP76AD1- α puede comprender enzimas que poseen actividad dual de formación de L-DOPA y ciclo-DOPA, el CYP76AD1- β puede incluir enzimas que catalizan solo la formación de L-DOPA. Sin embargo, se necesitarán análisis funcionales de los genes correspondientes de especies productoras de betalaina adicionales para respaldar esta hipótesis.

Las enzimas tirosinasas catalizan tanto la ortohidroxilación de monofenoles como la oxidación de o-difenoles a o-quinonas, por tanto, convierten directamente la tirosina a la forma oxidada de L-DOPA, dopaquinona. CYP76AD1, en un mecanismo de reacción actualmente desconocido, también cataliza tanto la hidroxilación de la tirosina como la conversión de L-DOPA a ciclo-DOPA. Nuestros resultados experimentales sugieren que CYP76AD6 es único en el sentido de que cataliza la ortohidroxilación de la tirosina pero no la conversión de L-DOPA a dopaquinona o ciclo-DOPA. La actividad única de la enzima CYP76AD6 puede aprovecharse para la producción a gran escala de L-DOPA que es altamente ventajosa e inesperada en comparación con los métodos de producción actuales. CYP76AD6 forma directamente L-DOPA a partir del sustrato tirosina. La naturaleza ubicua de la tirosina permite la posibilidad de expresión de CYP76AD6 en una variedad de plataformas biológicas, lo que incluye plantas y microbios.

El descubrimiento de una nueva clase de enzimas hidroxilantes de tirosina también podría facilitar la identificación de genes adicionales del citocromo P450 que pueden catalizar la formación de L-DOPA en la biosíntesis de otros metabolitos derivados de L-DOPA. Por ejemplo, el gen responsable de la hidroxilación de la tirosina en la biosíntesis de alcaloides de bencilisoquinolina (BIA) continúa desconocido hasta la fecha, en una vía, de cualquier otra manera, bien caracterizada. Es posible que en las plantas productoras de BIA, la L-DOPA también sea catalizada por un citocromo P450 similar a CYP76AD1 y CYP76AD6.

El descubrimiento de las funciones de CYP76AD1 y CYP76AD6 en la formación de L-DOPA avanza en nuestra comprensión de la biosíntesis de betalainas en las plantas y esencialmente completa la identificación de genes y enzimas que forman las estructuras principales de betalaina. Sin embargo, la vía de la betalaina continúa relativamente poco conocida con respecto a la modificación de la estructura de la betalaina a través de enzimas 'decoradoras' (por ejemplo, enzimas glicosiladoras y acilantes), transporte subcelular y detoxificación. Se espera que la elucidación de la vía central y la mayor disponibilidad de datos de secuencias de plantas productoras de betalaina faciliten la caracterización adicional de los genes y los factores reguladores implicados en la biosíntesis de estos pigmentos.

Ingeniería metabólica de la producción de betalaina en plantas

Mientras que las antocianinas y los carotenoides prevalecen en todo el reino vegetal, las betalainas son pigmentos específicos del orden de las plantas Caryophyllales, en el que se producen en un orden filogenético y mutuamente excluyentes con las antocianinas. Su enigmática historia evolutiva, así como también sus cualidades nutricionalmente beneficiosas y su valor económico como colorantes alimentarios naturales, han llevado a un creciente interés en estos pigmentos en los últimos años, lo que incluye la perspectiva de sintetizarlos en microorganismos y plantas.

En este estudio, hemos demostrado por primera vez la manipulación por ingeniería genética de la producción de betalaina en plantas, sin alimentación de sustrato, tanto por expresión génica transitoria como por transformación estable. Esto fue posible mediante la identificación de la actividad tirosina hidroxilasa adicional de CYP76AD1. Por lo

tanto, se encontró que la expresión de CYP76AD1, en combinación con BvDODA1 y cDOPA5GT, era suficiente para la biosíntesis de la betanina, sin necesidad de un suministro exógeno de L-DOPA. El uso del vector pX11 que incluye los genes CYP76AD1, BvDODA1 y cDOPA5GT se demostró por primera vez mediante la expresión transitoria mediada por agroinfiltración en *N. benthamiana*, lo que dio como resultado la producción de betalainas en grandes cantidades, visible dentro de los dos días posteriores a la infiltración. Los intentos de transformación estable de pX11 en plantas y su cultivo subsecuente en cultivo de tejidos dieron como resultado la pigmentación de los explantes y la formación de callos y brotes de color rojo-púrpura en una variedad de especies de plantas dentro de varios días, lo que demuestra el uso potencial de las betalainas como marcadores de transformación genética visibles. La transformación estable de plantas de tabaco con pX11 condujo finalmente a la generación de plantas maduras completamente pigmentadas. El análisis de LC-MS de las plantas de tabaco productoras de betalaina confirmó la presencia de la betanina como la principal betalaina producida.

Por lo tanto, los hallazgos de este estudio abren el camino para la producción heteróloga de betalainas en especies de plantas adicionales, lo que podría dar como resultado el desarrollo de cultivos alimentarios potenciados nutricionalmente, así como también nuevas variedades de plantas ornamentales. Aparte de las plantas productoras de betacianina pigmentadas de rojo manipuladas por ingeniería genética, la producción de betalaina podría modificarse principalmente para limitarse a las betaxantinas que expresen CYP76AD6 en lugar de CYP76AD1, como lo demuestran los experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana*. La manipulación por ingeniería genética de plantas que exhiben tanto pigmentación roja como amarilla también podría lograrse hipotéticamente mediante la expresión de ambos citocromos P450 en diferentes secuencias promotoras no constitutivas (por ejemplo, promotores específicos de frutas, específicos de flores o inducibles). Las plantas productoras de betalaina manipuladas por ingeniería genética también servirán como un recurso genético excepcional para examinar la atracción basada en pigmentos de los polinizadores hacia las flores y los frugívoros hacia las frutas, así como también el papel de los pigmentos para ayudar a los órganos de las plantas a resistir señales abióticas y bióticas.

Ejemplo 10

Materiales y métodos (2)

Generación de constructos de ADN

Secuencias de genes usados en este estudio; cDOPA5GT (Núm de acceso a GenBank AB182643.1), BvDODA1 (acceso HQ656027.1), CYP76AD1 (HQ656023.1), CYP76AD6 (KT962274), AroG175 (JC233128.1), AAH (HQ003815.1). La secuencia CYP76AD15 se proporciona en la presente descripción. Los transcritos de cDOPA5GT, CYP76AD15 de *M. jalapa* y CYP76AD1, BvDODA1, y CYP76AD6 de *B. vulgaris* se amplificaron a partir de bibliotecas de ADNc de pétalos rojos de *M. jalapa* y de hipocótilo rojo de *B. vulgaris*. Los constructos de ADN usados para la agroinfiltración de *N. benthamiana* y para la transformación de plantas mediada por agrobacterias se construyeron con clonación Goldenbraid (Sarrión-Perdigones y otros, 2013; GoldenBraid 2.0: A Comprehensive ADN Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *Plant Physiology* 162: 1618-1631). BvDODA1, CYP76AD1, CYP76AD6, CYP76AD15, cDOPA5GT, AroG175 y AAH se clonaron inicialmente en un vector pUPD. pX11, pX11(E8), pX11(CHS), pX13, pDOPA3 y pDOPA4 son vectores 3α1. pX12, pDOPA1 y pDOPA2 son vectores 3Ω1. Todos los vectores se basan en una cadena principal pCambia (Roberts y otros, 1997; A Comprehensive Set of Modular Vectors for Advanced Manipulations and Efficient Transformation of Plants. En pCambia Vector Release Manual Rockefeller Foundation Meeting del International Program on Rice Biotechnology, 15-19 de Septiembre, Malaca, Malasia).

Transformación y regeneración de plantas

La transformación y regeneración de plantas mediada por agrobacterias se realizó de acuerdo con los siguientes métodos; discos de hojas de tabaco (Horsch y otros, 1985; *Science* 227: 1229-1231), berenjena (Van Eck y Snyder, 2006; berenjena (*Solanum melongena* L.). En K Wang, ed, *Agrobacterium Protocols*. Springer, págs. 439-448), tomate (McCormick, 1997; Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. En K Lindsey, ed, *Plant tissue culture manual*. Springer, págs. 311-319), papa (Perl y otros, 1992; *Plant Molecular Biology* 19: 815-823) y Petunia (Conner y otros, 2009; Transformation and regeneration of Petunia. En T Gerats, J Strommer, eds, *Petunia*. Springer, págs. 395-409). La transformación y cultivo de BY2 se realizó de acuerdo con An, 1985 (*Plant Physiology* 79: 568-570). Todas las especies de plantas se transformaron mediante el uso de la cepa de agrobacteria GV3101. El cultivo de tejidos vegetales se llevó a cabo en cuartos climatizados (22 °C; 70 % de humedad; 16/8 horas de luz/oscuridad, 2500 lux de intensidad de luz).

Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Los ensayos de expresión génica transitoria en *N. benthamiana* para los genes BvDODA1 y CYP76AD15 y la toma de muestras subsecuente para el análisis de LC-MS se realizaron como se describió anteriormente.

Extracción y análisis de metabolitos

Para el análisis de LC-MS, la extracción de tejido vegetal de frutos de tomate (pulpa y cáscara), frutos de berenjena (pulpa), tubérculo de papa (pulpa), pétalos de *N. tabacum* y hojas de *N. benthamiana* se realizó como se describió previamente (Polturak y otros, 2016). Para la extracción de células BY2, los callos extraídos de placas de Petri (aprox. 500 mg) se lisaron mediante dos ciclos de congelación y descongelación con nitrógeno líquido, seguidos de ruptura con perlas de metal. El extracto celular se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se recolectó y filtró a través de filtros PVDF de 0,22 µm (Millipore) antes del análisis. El análisis de LC-MS de L-DOPA y betalaínas se realizó como se describió previamente (Polturak y otros, 2016). La cuantificación relativa de L-DOPA en células BY2 se determinó mediante el área del pico, basado en la transición 198->152.

Ensayo de germinación de semillas

Se sembraron semillas de plantas de tabaco pX11 y de tipo silvestre (WT) en placas de Petri que contenían medio Murashige-Skoog (MS) completo (4,4 g/litro) y agar al 1 %. Para los ensayos de condiciones de estrés, los medios de MS contenían adicionalmente NaCl 150 mM o manitol 400 mM. Las semillas se sembraron en tres placas petri, cada una contenía 50 semillas por genotipo. Las placas selladas se mantuvieron en la oscuridad durante 1 semana y después se trasladaron a cuartos climatizados (22 °C; 70 % de humedad; 16/8 horas de luz/oscuridad, 2500 lux de intensidad de luz). Las tasas de germinación de semillas se examinaron durante un período de 26 días.

Material vegetal y condiciones de cultivo

Las plantas de *Mirabilis jalapa*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *S. melongena* y *S. lycopersicum* se cultivaron en suelo en un invernadero con condiciones de luz de día largo (25 °C). Las plantas de *Beta vulgaris* y *Nicotiana benthamiana* se cultivaron en suelo en cuartos climatizados (22 °C; 70 % de humedad; 18/6 horas de luz/oscuridad).

Ejemplo 11

La expresión de pX11 en tomate, papa y berenjena da como resultado plantas pigmentadas de rojo

Para inspeccionar la viabilidad de la producción de betalaína heteróloga en cultivos alimentarios, se introdujo el vector pX11 en tomate (*Solanum lycopersicum* var. MicroTom), papa (*Solanum tuberosum* var. Désirée) y berenjena (*Solanum melongena* línea DR2) mediante transformación estable mediada por agrobacterias. Se observaron signos de pigmentación rojo-púrpura en los explantes transformados de las tres especies dentro de varios días después del cultivo conjunto con agrobacterias. Como se observó previamente con las plantas de tabaco que expresan pX11, los explantes transformados finalmente evolucionaron hasta plantas completamente pigmentadas de rojo. Los frutos de tomate y berenjena, así como también los tubérculos de papa exhibieron una fuerte coloración rojo-púrpura (Figura 14). El análisis de LC-MS de frutos de tomate, frutos de berenjena y tubérculos de papa verificó la presencia de betalaínas, con la betanina y la isobetanina identificadas como las principales betacianinas presentes (Figura 14).

Ejemplo 12

Acumulación de betalaínas específicas de frutas en plantas de tomate

En todas las especies de plantas que expresan pX11, la acumulación de betalaína fue visible en prácticamente todos los tejidos y órganos de las plantas, debido a las secuencias promotoras de expresión constitutiva usadas para la expresión génica, específicamente, 35S de CaMV para los genes BvDODA1 y CYP76AD1, y el promotor ubiquitina-10 de Arabidopsis para cDOPA5GT. Inicialmente planteamos la hipótesis de que la producción constitutiva de compuestos que contienen nitrógeno puede conducir a una carga metabólica significativa en las plantas transgénicas. Por lo tanto, construimos un vector binario para expresarse en tomate, lo que daría como resultado la restricción de la acumulación de pigmentos a la maduración y la fruta madura. Con este fin, se modificó pX11 para tener CYP76AD1 impulsado por el promotor E8 específico de fruta en lugar de 35S de CaMV (Figura 15). La transformación del vector pX11(E8) a var. M-82 de tomate dio como resultado de hecho la generación de plantas que tienen una pigmentación de betalaína limitada a la fruta madura (Figura 16), aunque con una concentración de betalaína más baja que la fruta de los tomates MicroTom que expresan pX11. En particular, las plantas de tomate, papa y berenjena que expresan pX11 finalmente no exhibieron ningún fenotipo de desarrollo aparente o retraso en el crecimiento.

Ejemplo 13

Acumulación de betalaínas específicas de flores en Petunias

En un enfoque similar, se construyó una versión adicional del vector pX11, en el que CYP76AD1 es impulsado por el promotor de CALCONA SINTASA (CHS) de *Petunia x hybrida* específico de flores en lugar de 35S de CaMV (Figura 15). Se espera que la transformación de pX11(CHS) en plantas de *Petunia x hybrida* dé como resultado la generación de plantas que acumulan betalaínas solo en los pétalos, durante la maduración de las flores.

Ejemplo 14

La expresión de pX11, pX12 y pX13 en tabaco da como resultado flores de diferentes colores

Las plantas que expresan pX11 mostraron un color predominantemente rojo púrpura debido a la acumulación de altas cantidades de betacianinas frente a betaxantinas. pX11 incorpora la expresión de CYP76AD1 que codifica una enzima con doble actividad en la biosíntesis de betalaína, que cataliza tanto la hidroxilación de la tirosina a L-DOPA como la conversión de L-DOPA a ciclo-DOPA. Como se describió en la presente descripción anteriormente y en Polturak y otros, 2016 (New Phytol. 2016 Abr;210(1):269-83), una enzima relacionada en la remolacha roja, CYP76AD6, exhibe únicamente actividad de 3-hidroxilación de tirosina, para formar L-DOPA. Dado que se requieren derivados de ciclo-DOPA para la formación de betacianinas, la expresión *in-planta* de CYP76AD6 en lugar de CYP76AD1 da como resultado la formación de betaxantinas pero no de betacianinas, como se observó previamente por la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Para explorar la posibilidad de generar plantas transgénicas que acumulen únicamente betalaínas del tipo betaxantina, se construyó un vector binario para la expresión de BvDODA1 y CYP76AD6, en lo adelante denominado pX13. Se diseñó un vector adicional, pX12, para la expresión de ambos genes del citocromo P450 CYP76AD1 y CYP76AD6, junto a BvDODA1 y cDOPA5GT (Figura 15). A continuación se introdujeron pX12 y pX13 en tabaco mediante transformación estable. Mientras que las plantas de tabaco que expresaban pX13 producían únicamente betaxantinas, lo que daba como resultado la formación de flores pigmentadas de amarillo, la expresión de pX12 en las plantas de tabaco generaba plantas con flores de un tono anaranjado-rosa (Figura 17). El análisis de LC-MS de los pétalos de las plantas pX11, pX12 y pX13 verificó que los diferentes colores observados en las flores de las tres líneas son el resultado de relaciones variables de betacianina/betaxantina; los extractos de flores pX11 contenían predominantemente betacianinas, los extractos pX13 solo contenían betaxantinas, mientras que los extractos de pX12 contenían ambos grupos de betalaínas, con una relación betacianina/betaxantina más baja que pX11 (Figura 17). Las diferencias en la acumulación de betaxantina frente a la betacianina también se pudieron observar mediante imágenes de luz azul, bajo las cuales las betaxantinas tienen una fuerte fluorescencia típica (Gandia-Herrero y otros, 2005). Por tanto, el flujo hacia la biosíntesis de betacianinas rojo púrpura o betaxantinas amarillas puede manipularse mediante la expresión de CYP76AD1, CYP76AD6 o una combinación de ambos.

Ejemplo 15

Expresión de pX11 y pX13 en células BY2

La producción biotecnológica de pigmentos de betalaína puede proporcionar nuevas fuentes viables para su uso como colorantes naturales para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Hasta la fecha, la mayor parte de la investigación se ha centrado principalmente en el desarrollo del cultivo de raíces pilosas o cultivo de células de *Beta vulgaris* para la producción de betalaínas.

La manipulación por ingeniería genética para la producción de betalaína heteróloga permite el desarrollo de numerosas fuentes nuevas para estos pigmentos. Una fuente viable puede ser el cultivo de líneas de células vegetales bien estudiadas, tales como las líneas BY2 de tabaco o T87 de arabidopsis. Un intento previamente informado de usar estas líneas para la producción de betalaína implicó la expresión del gen DOD de *Mirabilis jalapa* *MjDOD* junto con un gen de tirosinasa del hongo Shiitake. Se demostró la producción de betaxantinas en células BY2 y T87. Sin embargo, al cabo de varias semanas, las células cultivadas se volvieron marrones y atrofiadas, muy probablemente debido a la acumulación tóxica de dopaquinona y sus derivados, como resultado de la actividad de la tirosinasa exógena (Nakatsuka y otros, 2013).

Para explorar el uso potencial del cultivo de células vegetales para la producción de betalaína a través de la expresión de genes relacionados con la betalaína únicamente, expresamos los vectores pX11 y pX13 en la línea celular de tabaco BY2, lo que dio como resultado la generación de células rojo púrpura o amarillas, respectivamente (Figura 18). El análisis de LC-MS del extracto celular de las células que expresan pX11 mostró la betanina y la isobetanina como las principales betacianinas. Se identificaron varias betaxantinas en ambas líneas celulares pX11 y pX13, lo que incluye glutamina-betaxantina y alanina-betaxantina (Figura 18). En particular, las líneas celulares pX11 y pX13 no mostraron signos de pardeamiento o retraso en el crecimiento como se informó previamente para los callos que expresan tirosinasa (Nakatsuka y otros, 2013).

Ejemplo 16

Producción de L-DOPA en tabaco y células BY2 por la expresión de CYP76AD6

La L-DOPA es un compuesto económicamente importante que se ha usado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y es un precursor de metabolitos de alto valor, lo que incluye, entre otros, catecolaminas, alcaloides de bencilisoquinolina y betalaínas. Los métodos actuales para la producción a escala industrial de L-DOPA muestran limitaciones críticas. La actividad tirosina 3-hidroxilasa de la enzima CYP76AD6 puede implementarse para la producción de L-DOPA que es ventajosa en comparación con los métodos de producción actuales, mediante el cual la L-DOPA se formaría directamente a partir de tirosina. Exploramos la implementación de CYP76AD6 para la producción de L-DOPA mediante la expresión en plantas de tabaco y en la línea celular de tabaco BY2. Con este fin, se construyeron cuatro vectores diferentes para la expresión de CYP76AD6 (Figura 19); en un vector, CYP76AD6

está impulsado por el promotor 35S de CaMV (en lo adelante denominado pDOPA1). En otro vector, pDOPA2, CYP76AD6 es impulsado por el promotor de la ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum* (SIUb10). En el vector pDOPA3, CYP76AD6 bajo el control del promotor 35S se expresa junto con dos genes adicionales, AroG175 (Tzin y otros, 2012) e hidroxilasa de aminoácidos aromáticos (AAH) (Pribat y otros, 2010), los cuales se utilizan para aumentar la disponibilidad de tirosina. En el vector pDOPA4, CYP76AD6 bajo el control del promotor SIUb 10 se expresa junto con AroG175 y AAH. Los cuatro vectores expresan adicionalmente el gen de la neomicina fosfotransferasa II (nptII) para conferir resistencia a la kanamicina para la selección de transformantes. pDOPA1, pDOPA2, pDOPA3 y pDOPA4 se introdujeron en plantas de tabaco mediante transformación estable mediada por agrobacterias. El análisis por LC-MS de plantas de primera generación (t0) confirmó que la L-DOPA se produce en líneas que expresan los cuatro vectores diferentes. El análisis de las plantas de tabaco pDOPA1 y pDOPA3 se presenta en la Figura 20. Los cuatro vectores pDOPA también se introdujeron en líneas de células BY2. Las células BY2 que expresan vectores pDOPA2 o pDOPA4 exhibieron diversos grados de pigmentación gris a negra después de varias semanas de cultivo, probablemente debido a la formación de derivados de L-DOPA, posiblemente como resultado de la oxidación enzimática o no enzimática de la L-DOPA. El análisis de LC-MS de extractos obtenidos de callos que expresan pDOPA2 y pDOPA4 mostró la presencia de L-DOPA en concentraciones variables (Figura 20).

Ejemplo 17

Las betalainas confieren resistencia a las plantas a condiciones de alto estrés osmótico y alta salinidad

Teniendo en cuenta las funciones sugeridas de las betalainas para conferir resistencia en las plantas a diversos factores de estrés abiótico, como la sequía, la alta salinidad y el exceso de luz, permitir la producción de betalainas en plantas que naturalmente no las producen puede servir para aumentar su tolerancia a los factores de estrés abiótico. Por lo tanto, procedimos a examinar esta suposición mediante ensayos de germinación de semillas de plantas de tabaco productoras de betalainas. Se colocaron semillas de tabaco pX11 y de tipo silvestre (WT) en placas de Petri que contenían medios Murashige-Skoog (MS) suplementados con manitol 400 mM o NaCl 150 mM, para imitar condiciones de alto estrés osmótico o estrés por salinidad alta, respectivamente. Se usaron como control placas Petri que contenían medio MS sin suplementación adicional. Se determinaron las tasas de germinación de las semillas sembradas en todas las placas durante un período de 26 días. Mientras que las semillas de tabaco pX11 y WT exhibieron tasas de germinación similares en los medios MS de control, las semillas pX11 exhibieron una germinación significativamente mayor frente a las semillas WT en placas que contenían manitol 400 mM durante todo el período de tiempo del experimento. En placas que contenían NaCl 150 mM, las semillas pX11 mostraron tasas de germinación significativamente mayores después de una semana de incubación, pero las semillas WT obtuvieron tasas de germinación similares dentro de dos semanas y en adelante (Figura 21). Por lo tanto, las plantas de tabaco productoras de betalaina exhiben una mayor tolerancia a las condiciones de alta osmótica y alta salinidad en comparación con las plantas de tipo silvestre, con una mayor tasa de germinación en condiciones de alto estrés osmótico y una germinación más rápida en condiciones de alta salinidad.

Ejemplo 18

Las betalainas confieren resistencia a la infección de *Botrytis cinerea* en hojas de tabaco

Se ha sugerido previamente que las betalainas desempeñan un papel en la defensa contra los hongos patógenos, pero la evidencia de la actividad antifúngica de las betalainas en la literatura científica es escasa. La producción de betalainas heterólogas en plantas proporciona una plataforma excelente para estudiar las actividades antifúngicas de las betalainas *in-planta*, y también puede implementarse para conferir resistencia a hongos fitopatógenos en especies de cultivos objetivo. Para examinar los posibles efectos antifúngicos de las betalainas, plantas de tabaco de tipo silvestre y pX11 se sometieron a la infección de las hojas por el hongo del moho gris (*Botrytis cinerea*), un patógeno necrotrófico de plantas que es responsable de pérdidas importantes en los productos agrícolas tanto en las etapas de precosecha como de postcosecha. Se aplicaron gotitas de suspensión de esporas de *B. cinerea* en diferentes concentraciones sobre las hojas de las plantas, con un total de aproximadamente 100, 250 o 500 esporas por planta. El grado de infección de *B. cinerea* se estimó después mediante mediciones diarias del tamaño de la lesión alrededor de los puntos de infección. Las hojas de tabaco pX11 exhibieron un área de lesión significativamente más pequeña tras la infección en comparación con las hojas de tabaco de tipo silvestre (Figura 22). Las hojas de tabaco de tipo silvestre infectadas también exhibieron mayores signos de necrosis en comparación con las hojas pX11 dentro de varios días después de la infección (Figura 22). Juntos, estos resultados indican un aumento de la resistencia hacia la infección por *B. cinerea* de plantas productoras de betalaina.

Ejemplo 19

CYP76AD15 es un ortólogo funcional de CYP76AD6 en *Mirabilis jalapa*

Teniendo en cuenta la presencia natural de especies de plantas productoras de betalaina adicionales que consisten en variedades de color rojo o amarillo, es plausible que estas especies tengan un mecanismo molecular similar al observado en la remolacha roja, donde una enzima del citocromo P450 cataliza solo la hidroxilación de la tirosina, mientras que otra cataliza tanto la hidroxilación de la tirosina como la formación de ciclo-DOPA. También es posible

que los ortólogos funcionales de CYP76AD1 y CYP76AD6 se encuentran en los subclados CYP76AD1- α y CYP76AD1- β , respectivamente. Sin embargo, se necesitan análisis funcionales de los genes correspondientes de especies productoras de betalaínas adicionales para respaldar esta hipótesis.

Se han identificado previamente ortólogos funcionales de CYP76AD1 en varias plantas, lo que incluye *Mirabilis jalapa*, donde CYP76AD3 se identificó basado en la similitud de secuencia con CYP76AD1 (Hattestad y otros, 2012). Sin embargo, los ortólogos de CYP76AD6 no se describieron previamente. Para evaluar la presencia de un ortólogo de CYP76AD6 en *M. jalapa*, se realizó una consulta tBLASTx en un conjunto de datos del transcriptoma de *M. jalapa* obtenido previamente (Polturak y otros, 2016), mediante el uso de la secuencia de nucleótidos CYP76AD1. Esta búsqueda dio como resultado la identificación de varios genes interrelacionados, lo que incluye un gen con la mayor similitud de secuencia con CYP76AD6, en lo adelante denominado CYP76AD15. Curiosamente, según los datos obtenidos en el análisis transcriptómico de *M. jalapa*, CYP76AD15 no muestra un patrón de expresión similar a la acumulación de betalaína. En cambio, se observó un patrón de expresión generalmente constitutivo para este gen. La actividad CYP76AD15 se sometió a prueba mediante ensayos de agroinfiltración en *N. benthamiana*. De manera similar a CYP76AD6, se encontró que CYP76AD15 permite la producción de betaxantina en hojas de *N. benthamiana* cuando se infiltra conjuntamente con BvDODA1, y la producción de L-DOPA cuando se infiltra solo (Figura 23). La aparición de varias betaxantinas se verificó mediante análisis de LC-MS, lo que incluye dopamina-betaxantina y valina-betaxantina, que se identificaron basado en los patrones de absorción típicos y la fragmentación MS/MS. Por lo tanto, se identificó CYP76AD15 como un ortólogo funcional de CYP76AD6, que cataliza la formación de L-DOPA a partir de la tirosina. El análisis de secuencia indica que CYP76AD15 pertenece al subclado CYP76AD1- β junto con CYP76AD6, mientras que CYP76AD3 pertenece al clado CYP76AD1- α con CYP76AD1, lo que confirma de esta manera la asociación de cada uno de los subclados con una actividad catalítica específica.

Si bien determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente, se les ocurrirán ahora muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes a los expertos en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones adjuntas se destinan a cubrir todas las modificaciones y cambios que caigan dentro del verdadero espíritu de la invención.

Listado de secuencias

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

<120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN POLIPÉPTIDOS DEL CLADO CYP76AD1 Y USOS DE ESTOS

<130> P-79384-PC

<150> IL241462

<151> 2015-09-10

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1901

<212> ADN

<213> *Mirabilis jalapa*

<400> 1

ES 2 930 456 T3

	cttcaaattcc	tcccacgtat	atatcaacaa	aaacccaaaa	catcatctca	ttacaataat	60
	ggagtatcat	cttctcttcc	ttctcctcct	gccgatcatc	cttatcttcg	tggtcctcaa	120
5	tcacaagccc	aagcaaacca	aactcgaacc	accaggacca	cgtccatggc	ccatcatagg	180
	ccacaccaac	ctcgtcggct	ccaaacctca	tcagtccatt	gccaaactag	ctcatattta	240
10	cggtcccata	atgtcactta	agctagggag	aatcactact	attgtcatat	cttcccctga	300
	agcagccaaa	gacttggttc	tgaaacatga	ccttactttc	tcaagtaggc	aagttcctca	360
	cgcttcaacc	gctacaaacc	atgacaaact	atccatgggt	tggctccctg	tatgtcccaa	420
15	atggcgctat	cttagaaaga	tcgcggccat	ccaactattc	accaaccaac	aacttgatgg	480
	tggtcaggta	ctaaggcgta	agaaagtgga	cgagttgatc	caatttgtga	ctcgtttag	540
20	taaacaaggg	caagtcattg	atattggaga	ggctgttttt	attactactc	ttaacttaat	600
	gtcaaatacc	tttttttcca	aggatttgtg	tagttatggg	ttggccgaat	cacgagagtt	660
	taaggatcta	ttttgggagt	tcataaaaagt	gctagcgagt	cctaattgtt	ctgattattt	720
25	tccatggtta	agatggttgg	atttgcaagg	catcaagaga	agaagcgagg	gttgttatcg	780
	caagatggtg	ggtttttttg	gggagattat	tgatcagaga	ttgagagatc	caatgtcatg	840
30	taagaacgat	gtattggaca	ctctactcaa	acttgtcgac	caaaaagagt	tgagctttga	900
	ggatgtcaaa	catatgcttg	tggaatttgt	tggtgcaggg	acggatacaa	cttcgaacac	960
	attggaatgg	acaatggtag	aacttttacg	ccaccctaac	atattgacta	aagcaciaac	1020
35	tgaactcagc	caagtcatag	gcaaggacaa	gttagtccaa	gaatcatgta	tcaccaagtt	1080
	gccatatctt	caatcaatat	tgaaagaaac	attcagggtg	caccacccga	ctcctttttt	1140
40	acttccacac	aaagcaatcg	agaacgttga	actatgcaac	tatcacatac	ctaaaggtgc	1200
	tcaagtttgg	gtgaatgtgt	ggtctatttg	ccgcgatccc	aacatttggg	caagcccggg	1260
45	cttattttcc	ccagagagat	ttttaggtac	cgacattgat	ataaaaggta	accatttcga	1320
	gctcatacca	ttcggagcag	gaagaaggat	ttgccccggg	ttgtcactag	cttacaggat	1380
	gcttcatttg	attttggcca	ctctccttca	ttcattcaat	tggaaacctc	ctaatacgt	1440
50	atgtccggaa	aatatggata	ttgaagaaaa	atttgggatt	acacttcaaa	agatcatgcc	1500
	actcaaagtc	ataccaagct	ctaggtgtct	ggatcacgac	aactaactgg	tggttaatctt	1560
55	ttacaacata	ttgaatgata	tatatcacgt	taaggtagat	gcgtctagat	gcagaaactt	1620
	gcatacgttt	ccttttcaat	aaagtcttgc	atatgtatgg	tttatagggt	gatgtaattt	1680
	cttggttgtt	tttacttaag	tttataagac	attttttttt	tttttttatc	gatgctctta	1740
60	ctcattaaaa	tattggaaca	tatacaaaat	tttatatggt	ttagataaaa	ttatacaggt	1800
	tttaatttta	ggaacttacc	acttggtcac	actgcgagac	ttaaatagtc	aaaatagaaa	1860
65	atacacacta	ttaaaaagta	ctcactattt	atcaaattta	t		1901

ES 2 930 456 T3

	<210> 2	
	<211> 1663	
	<212> ADN	
	<213> Mirabilis jalapa	
5	<400> 2	
	cctcacctcc ataacaaaga aatgaccgcc attaaaatga acaccaatgg tgaagggtgaa	60
10	acacaacata tactaatgat acctttcatg gcgcaagggc atttacgtcc ttctccttgag	120
	cttgctatgt ttctatataa acgaagtcac gttatcatta ctcttctttac taccocgctc	180
15	aatgcggggtt tcctacgaca tctccttcac caccatagct attctagctc ggggatcaga	240
	attgtcgagt tacctttcaa ctcaaccaat catggtcttc cacctggcat tgaaaacact	300
	gataaactta cactcccact tgtagtatca ctttttcatt caaccatttc tcttgaccct	360
20	caccttagag attatatttc ccgccatttc tcccctgcgc gccctcctct gtgtgtcata	420
	catgatgtgt tccttggttg ggttgatcaa gttgctaaag acgtgggctc aactgggtgtt	480
25	gtttttacta cgggtggcgc gtatggtaca agcgcatatg tgtccatttg gaatgatctg	540
	cctcaccaga attactctga tgatcaagag tttccgcttc ctggtttccc ggagaatcat	600
30	aaattccgac gttctcaact tcatcggttt ctgaggtatg ccgatggatc agatgattgg	660
	tcgaaaatatt tccaaccgca attgaggcaa tcaatgaaga gttttggatg gctatgtaat	720
	tcagttgagg aaatcgaaac acttgggttt agtatcctca ggaactacac taaactaccc	780
35	atttggggta ttggaccgtt gatagcttca cctgtacaac attcatcatc tgataataac	840
	agtactggtg ccgagtttgt tcaatggttg agcttgaaag aaccagattc tgtattatac	900
40	atctcatttg gatcacagaa cacaatttca ccaaccgaga tgatggaact agcagccggt	960
	ttggagtcaa gtgagaagcc gtttttgttg gtgattcgag caccatttgg gttcgatatac	1020
	aatgaggaaa tgagaccaga atggctacca gagggattcg aggagcgaat gaagggtgaaa	1080
45	aaacaaggaa agttggtgta taagttggga ccacagtttg agataactta ccatgagtca	1140
	atcggagggt tcttaactca ttgtgggttg aattcgatcc ttgagtcact tcgagaagg	1200
50	gtgcctatgt taggggtggc attggcagcc gaacaagctt ataatttgaa gtatttggag	1260
	gacgaaatgg gggttgacgt cgagttagcg aggggatttg aaggagagat aagtaaagag	1320
55	aaagtgaaga gaattgtgga gatgatttta gagagaaatg aaggaagtaa aggatgggaa	1380
	atgaaaaata gagcagtaga aatggggaag aaacttaaag acgctgtcaa tgaggagaag	1440
	gaactgaagg gttcttctgt taaggcaata gatgatttct tagatgcggt catgcaagct	1500
60	aagttggaac cttctcttca ataataagat cgatagttta tctcgtctca gagactcaaa	1560
	caattgacta ctaggatgat cagaaagaga gttatgttca gtgttctgtt attatgcaag	1620
65	acttcaataa taacagaaaa attcgtgatt agattcataa ctt	1663

ES 2 930 456 T3

	<210> 3		
	<211> 1005		
	<212> ADN		
	<213> Mirabilis jalapa		
5	<400> 3		
	atgaaaggaa catactatat aaatcatggt gatccactaa tgtacttaaa aaaacatata	60	
10	aaactaaggc aattccttaga aggatggcaa gaaaatgttg ttattgaaaa accaaagagt	120	
	atacttatca tttctgctca ttgggatact aatgtacctt ctgtcaactt tggtgaacat	180	
15	tgtgatacta ttcattgattt tgatgactat cctgatcctt tgtaccagat acaatatcga	240	
	gcaccgggag caccaaattt agcaaaaaag gtggaagagt tactaaaaga gtcaggaatg	300	
20	gaatgtgaga tagatacaaa gagaggactc gatcatgcag catgggttcc actaatgttt	360	
	atgtatcctg aagctaatat tcctatttgt gagctctcag tccaaccaag caaagatggg	420	
	atccaccact ataattgttg gaaagctctt tctcctcttt tgcaacaagg tggtctcatc	480	
25	attggctctg gtgggtactgt tcatccttct gatgatactc ctcatgtgcc caatgggtgtt	540	
	gtccttggg ctattgagtt tgataactgg cttgaagatg ctcttcttag tggaaggat	600	
30	gaagatgtga acaacttcaa gaaattggca ccaaattggg agatatctca tccaggacaa	660	
	gaacatttgt accctttgca tgtggcatta ggggctgctg gcaaaaatcc aaagacacaa	720	
	cttattcatc gaagctgggc tgccaatggt gtctttggat attccacctt caacttcact	780	
35	cccaccactc aaaaaactga ttaaaaacttc ttttatatat ctctatttct tgctttattt	840	
	cttcttctgt caattgtttt atttatgttg taatattatg taaaatttgc ctaaattggg	900	
40	ctaccgggtg attatactat gactaacatt tgatatagtt gctccgacta ctatgtcaaa	960	
	gctgtaagggt gtttgatcat tgtgtaatcg aaaaatgttg gattc	1005	
45	<210> 4		
	<211> 1680		
	<212> ADN		
	<213> Mirabilis jalapa		
50	<400> 4		
55			
60			
65			

ES 2 930 456 T3

	aaagcataca atgaccacca gcaatcatta aacaagagtt aacactgtca ctcatcta	60
	tttcttcaaa acactatttc ttctctcatc tctttaagta gttatttatt taattttgat	120
5	catcataata tggatttctt aacccttgtc atgatattat ctattatctt cttcttttac	180
	aatctattaa aaatgaaatt cactacccat tcagatgccc aacttcctcc aggacctaaa	240
10	ccaatgccaa tattcggtaa tatcttcgaa ctaggtgaaa aacctcaccg atcatttgct	300
	aacttagcaa aaacacacgg accactaatg tcgttaaggt taggaagtg caccaccatt	360
	gtcgtctcct cggcagaggt tgctaaagaa atgttcctta aaaatgacca gtcccttgca	420
15	gatagaagtg tccctaattc tgtaacggca ggtgaccatc acaagctaac catgtcatgg	480
	ttgcctgtct ctccaaaatg gaaaaatttc cgaaaaatca cagccgttca tttgctttct	540
20	cctcaaaggc ttgatgcttg ccatgcactt agacatgcca aggtcaaaca actctatgaa	600
	tatgttcaag agtgtgccct aaaaggagaa gcagttgata ttggcaaggc cgcatttacc	660
	acttcactta atctattatc caatttgctt ttttcggttg agttagctaa tcatacttct	720
25	aatacttccc aagagtttaa acaacttata tgggatataa tggaagatat tggaaagcct	780
	aactatgctg attattttcc tttacttaaa tatgttgatc cctctggcat acgacgtcgt	840
30	ttagcggcta attttgataa acttattgat gtatttcaaa gctttatctc caaaaggtta	900
	tcactctgctt attctagtgc aacaagtctc gatgatgtgc ttgatgttct tctcaaactc	960
35	ctcaaggaaa aggagcttaa tatgggtgag attaatcatc ttcttggtga catatttgat	1020
	gcagggtacag acacaacatc aaatacattc gaatgggcaa tggcagaact aatgaggaac	1080
	ccaataatga tgaaaagagc tcaaaatgag atagcattag tattaggcaa agataatgcc	1140
40	actattcaag aatctgatat agcaaacatg ccttatctac aagcaattat caaagaaaca	1200
	ttacgtttac atcctccaac tgtctttcta ttgccacgaa aagccattac taatgttaag	1260
45	ctatatggtt atattgtccc aaaaaatgca cagatacttg ttaacttggt ggccattggt	1320
	cgcgacccca aggtctggaa gaaccctaata gagttcttac ctgatagggt tttgaattct	1380
50	gatattgatg tcaaaggctg agattttggg ttgttgccct ttggtgcagg gagaaggata	1440
	tgtcctggta tgaacttggc ttataggatg ttaactttga tgttggcaac tcttcttcaa	1500
	tcttttgatt ggaagcttcc tcatcggaat agtcctctgg atttgatat ggatgagaaa	1560
55	tttggtatcg ctttacaaaa gactaaacca cttgagatta ttctcttat taaatattga	1620
	tgttttatat gttgtattat tattgcaatt gtttaaacat ctttcttatt attttggttg	1680
60	<210> 5 <211> 749 <212> ADN <213> Mirabilis jalapa	
65	<400> 5	

ES 2 930 456 T3

	tcgatgtcac caatttcccc tatggacgtc caaaccacat tcccaaagca actagactca	60
	gtgattcgaa ccaaggtggc aaggccagca aaaaaaagga accaagaaga gaagaagaaa	120
5	gaagaagaga tacttgtgat agagttagaa gagctaaaac aaaacgagta cgtcaaattt	180
	gatgtgtaca taaatgatga ttatgattac gagaataaga atgacggcgt gacgaggcca	240
10	acggaaaaat atgcagggag tttcgtgagt ttggcatcat cgggacaggg aatggagagc	300
	aagaagagtg ggttgagatt ggcgttgacc aagttgatcg atgaaattgg tgctgatggt	360
15	gatgacttct tagatgtggt gctagtggct aaagctggga aaggtggtgt tgttataaat	420
	gacgtcaaga ttgagttcct tgcttgattt agttaagtat tagtatggta gtggttgatg	480
	tattgccttt taatttgtgt acaagttaca actttatttg caattcacca cttgttttta	540
20	tttgtatatg agtttctggt ttatctcaat atttagtcat ggtgttactg ttttatggtg	600
	tttcctcacg tatctaagaa aaaataacaa tagatattgg aattatcatg aattgtgcgc	660
25	ccatcactgg tggtttgaaa aagaaagaca ataaaaataa gaaaaaatta taaaaaaat	720
	tctataatat atttattttt ttaaaaaaa	749
30	<210> 6 <211> 2176 <212> ADN <213> Mirabilis jalapa	
	<400> 6	
35	catcccactt ccattccgac aaccaactca accaccatca tcaaccctcc tcacaacaac	60
	ccccttctct ctcaccttcc tccgatcaat cgcgcgcgtt cattccgcca cctttcaccc	120
40	aaactctcca tccgaaacaa ccaacaatcc accaacaacg accctctttt cgacccatca	180
	aaactcgacc gaagaaacat ccttatcggg agtgggtctcg ccggcatcta cggcggagcc	240
45	accactctcg gaggtaacct cgccctagct gctccccgcg tccctgacgt caaaacatgc	300
	aacctcacgt ccacctccgg tggggggcct gaggggctcg aatgttgccc accctcatc	360
	agaaacatcg tagatttcaa ccctcgaaac tacgcccggc cggcactccg ggtcagacgt	420
50	ccggctcatg aagtcgcaa tgaccgggag tacatggcta aatttaaaga agcaataaga	480
	agaatgagag cacttcctag atctgatcca agaaactttg tacaacaagc taatgttcat	540
55	tgtgcttatt gtgatggctc atacggtcaa gataaacaca gtgacgtcga ttacacggtt	600
	catttttctt ggttattctt cccattccat agagtttacc tctatttctt cgaacgtatc	660

60

65

ES 2 930 456 T3

	ttggggaaat tgatcgatga tccaactttc gcaatcccat actggaactg ggatcatcca	720
	gatggtatga gaatgccaac tatttacacg aaccagatt caccattggt tgatgctctt	780
5	agagatccgg ctcatcagcc gcctagagtt gcagatctta actacaatga tgttgatact	840
	gatataagtc cagagttgca gattgagtat aacttaagag tgatgaatta tcaaatgaca	900
10	aggaataata aacctgagtt gtttatgggt gcacctttgt accctggtaa tgctgctgaa	960
	gagaagggta ctgggtgcact tgaaaatggt cctcataatt tgcttcatgt ttgggttggt	1020
	gatcgtaatg acgatccatt tcacaggaac atgggatcct tcttctcggc tggaagagac	1080
15	ccaatattct acggtcacca tgcaaacgta gacagaatgt ggtacatttg gaataccaag	1140
	cttagccatc aaaatttcac tacaaaagat tggctagaca ctactttgt tctctacgac	1200
20	gagaacaaac aagctgtcag gattcgaact tcagactgtc tggatggtga aaaacaactc	1260
	ggctacacct attcgaacca agacttacct tggtagact caacgactgg aggaggagcc	1320
	attgaaccaa cccaccccc accatctggt gtggccgagt tcccacaagt tctagacaag	1380
25	gttatcagaa ccagggtggc tcgaccaag acctcaagg cacaacagga aaaggaagtt	1440
	gctacagaag tgctgaaagt gtctgtcaac attgataaag aagataatta cattaagttt	1500
30	gatgttttta tcaatgatgg tcaggatttt gagaccggtg gtcagactga tatcggttaag	1560
	tcttatgcag gaagctttac tagcgtccct cataagacta gaaaagggtc taggatggat	1620
35	atgaaccgcc gggtttctact tcccttgact gagattttgg agaatttggg tgctgatggt	1680
	gatgattata ttgatgttgc tattgttcct aaggctggtt taggtaatgt caccattact	1740
	gctgttaagg ttgattatat tatttgatta gtcactaatc aagtaattaa taaattaaaa	1800
40	ttactacat atataataat tagttatgat gagtgtgtta atgtagtaag tggattatt	1860
	attaagtgag taaaataaaa agcgaccatg cattatgatt catgattgtg ggagtcgtgt	1920
45	ttcatgcatg gtagtgatgg gatgttatcg tatcttttgg tgcgcttta atctgtttcc	1980
	actttattat tttttttttt tccaagtatt tccactttat tgttatgact tgtcaaaagt	2040
	tggattata taagtttgtc gttctatatatt aaaattatatt tttaatgttt ttttttattt	2100
50	ttacttttag taaagttggt atcaaggaca tgatattttt gaaggaatga agacaaacat	2160
	taatataact gtaagg	2176
55	<210> 7 <211> 282 <212> ADN <213> Mirabilis jalapa	
60	<400> 7	
	caaacaagct gtcaggattc gaacctctga ttgcctcgat gttgaaaacc aactcggcta	60
65	cacctatgag gaccaagatt tgccatgggt agactcatct gtcggaaaag acgcccctat	120

ES 2 930 456 T3

	accacacaaa ccccaaccat ctgatgtggc cgagttccca caagtcctag acaaagttat	180
	ccgtactaga gtggctcgac ccaaggccac aagggtccgag caagaaaagc aggttgctgc	240
5	agaagccctg aaagtatccg tcaacattga taaagaagat aa	282
	<210> 8	
	<211> 1016	
10	<212> ADN	
	<213> Mirabilis jalapa	
	<400> 8	
15	acggaggcgc ataaaaaaat gggtgtatta ttttgctatt gatatctgct gggaaaacaa	60
	ggagtagtgt attcggattc tcacatcccc gaaatcgatc aacgtcttta tttgggcggt	120
	ttaaagcaag gaatatctga ggaattgcta tcagtgactc atttgtgtgt caaagcatat	180
20	caaccagcta taggaggtgc taccgtgggt aacttgaatt ctttaggccc cttttgaatg	240
	tcacgaaaga gatgtgtcct tattggtaaa ctgtttgatt tctattgttg agaagtcaaa	300
25	acctggacat tagacaacca ctgtgattat ttgactgttt ccgattaatc ctactaatga	360
	cggctctctc cccttctcct ataacgacca tcaacattcc cgttgccact agaaacacta	420
30	aaccactccc taagccattg atgctttatc aatcctgcc ccctaccttg aaaatttcat	480
	gccaaagcctc ccacaacctc aagggtgaatc cacaacgccg agatctccta attgggctag	540
	ccaccctatg tgggaccccc accttgtgtg tcccactagt ctccagcagca ccagcagcag	600
35	caaccctttt tccacagctg ttggactccg tgggtccggac cagggtggca aggccagcaa	660
	aagaaagaag ccaaagagag aaggatgatg aagaggaggt gcttgtggtt agcttggagc	720
40	aactaaggga agatgaatat gtcaaatttg atgtgtacat caatgatgat tatgactttg	780
	agaataagaa tgatgggctg acaaggccaa caaaagaata tgcggggagt tattctagcc	840
	tgccatctcc aaggcgactc atggagagca agaagattgc gttgaagctg gcgttgacac	900
45	agctgattga tgacattggt gccgatagcg atgactatat tgacgtggtg ctggtgccta	960
	aagcaggaaa aggtgctctt gttgtaaaaa atgtcaagat tgagttcctt gcttga	1016
50	<210> 9	
	<211> 1922	
	<212> ADN	
	<213> Beta vulgaris	
55	<400> 9	
	cagtcattta aaatcctgta aattactcac atacataacc aaattaaagt tgccgccgta	60
	ctgattttcca aaggctctac atctatcaat ggagtattac accataacgc tattattcat	120
60	catcttcaca atatcaatat tcggtacaaa aattttgagc aagtcctaac ttccctccagg	180
	accaacacca tggcctatca taggcaacat cctcgagcta ggcaagttac ctcatcaggc	240
65	agttgacaag ctctcaaaaa cctatggccc tatattatct ctcaaactcg gaagcatcac	300

ES 2 930 456 T3

	tacaatagta	atatcatccc	ctgaaatcgt	taaagaaatg	ttcctcgagc	acgacttagc	360
	ccttttctagt	aggccttccc	cggatgcttc	gaggggtggga	aaccataaca	aattttccat	420
5	tgtttggtc	ccagtgtccc	ccaaatggcg	ggaccttaga	aaaattgcta	ctatccaatt	480
	gtttactact	caacgcctag	attctagcca	agaactacgg	cagatcaagg	tgaacgagct	540
10	ggttgattat	gtacgacagt	gttgtgaaaa	gggtctacct	gttgatgttg	gtaaagccgg	600
	gtttactacc	acgttaaata	tggtgtctaa	cacgtttttc	tccatggatt	tggttagcca	660
	tgcttcttcg	aattcgcaag	agttcaagga	tcttgtttgg	agtcttttgg	aagaggggtgc	720
15	aaagccta	gtgtcggatt	ttttcccgat	agttagagaa	ttggatttgc	agggagtatc	780
	gaaaaataga	agggtgcaca	tgaagaagct	aatgggaatt	ttcgaggaaa	tcattgatgg	840
20	aaggttgaca	aagttaaagg	atgtgaagga	tgatgttcta	agtactttac	tcaaacttgt	900
	taaggatgaa	gaattgaacc	ttgacgacgt	caaacatatg	ctcatggatt	tatttttagc	960
	gggaacagat	acaacctcta	tcacattgga	gtgggcgatg	acagaattac	ttcgcaatcc	1020
25	agaaaagatg	gaaaagggtc	aaattgagtt	ggacaaagta	cttggcaagg	atagttctct	1080
	gcaagagtca	atgatctcaa	aattaccata	tattcaagca	atagtgaaag	aaacattaag	1140
30	attacacca	ccaactcctt	tcttgattcc	tcacaaagca	gaaaaagatg	tattgttatg	1200
	caactattta	gtgccccaaa	actcaattat	ttgggttaat	ttatggtcga	tcgctcgtag	1260
	tccaagtgtg	tggccaaatc	cagaatcatt	ttctcctgaa	aggtttttgg	agatggaaat	1320
35	tgatattaaa	ggacgagatt	tcaaactcat	accctttgga	tcaggaagaa	gaatgtgtcc	1380
	tggaatgcca	cttgcttata	ggatgacaca	tatgttggtg	gctactcttc	ttcattcatt	1440
40	taactggaag	tatggtgagg	caagtccaaa	agatatagac	atgaaagaaa	agtttggggt	1500
	gacgttgcaa	aaggctcagc	cacttcaagc	aattccaatt	cccagatgat	caatctcttt	1560
45	tgaggagtta	gacgatttct	tttgttcaac	caactagtac	ttatcggaac	atttattggt	1620
	aaatgtgtct	gttagatgta	catatgatgt	tgttatacta	agaaataacg	gtgtttaagt	1680
	gcaacatggg	acaagaggat	tatgtaaaagt	atcctagatt	ttattaggtg	ctcctacacc	1740
50	tatgtattgg	tgcatattgca	ccaagtcgtc	tgtagaaaac	ttgagacttg	ggaggcaaga	1800
	actttacctc	tgtaaaaaaa	acgcgttttt	tgcatctctc	ttgtatcttt	tgcaagagat	1860
55	tgtacgcatt	cacaaaacat	caaatacatt	tgtgtttaca	caataagaat	cgccaacact	1920
	ga						1922

<210> 10

<211> 495

60 <212> PRT

<213> Beta vulgaris

<400> 10

65

ES 2 930 456 T3

	Met	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Phe	Val	Phe
	1				5					10					15	
5	Tyr	His	Ile	Phe	Lys	Ser	Phe	Phe	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg	Arg	Leu
				20					25					30		
10	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Val	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Phe	Asp	Leu
			35					40					45			
15	Gly	Glu	Lys	Pro	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Asn	Leu	Ser	Lys	Ile	His	Gly
		50					55					60				
20	Pro	Leu	Ile	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Ser
	65					70					75					80
25	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Glu	Met	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala	Leu
				85						90				95		
30	Ala	Asn	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Ala	Gly	Asp	His	Asp	Lys
				100					105					110		
35	Leu	Ser	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Gln	Lys	Trp	Arg	Asn	Met	Arg
			115					120					125			
40	Lys	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Ala	Ser
		130					135					140				
45	Gln	Pro	Leu	Arg	Gln	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Gln
	145					150					155					160
50	Asp	Cys	Ser	Lys	Lys	Met	Gln	Pro	Val	Asp	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala	Phe
				165						170					175	
55	Thr	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Phe	Ser	Ile	Glu	Leu	Ala
				180					185					190		
60	Ser	His	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Met	Trp	Asn
			195					200					205			
65	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Phe	Phe	Pro	Ile
		210					215					220				
70	Leu	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	Tyr
	225					230					235					240
75	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Arg	Glu	Arg	Gln

ES 2 930 456 T3

	245							250					255			
5	Lys	Leu	Arg	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Gly	Ala	Lys	Gln	Thr	Asn	Asp	Ile
				260					265					270		
10	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Glu	Asp	Asn	Glu	Leu	Ser	Met	Pro
			275					280					285			
15	Glu	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr
		290					295					300				
20	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Asn	Pro
	305					310					315					320
25	Glu	Met	Met	Thr	Lys	Val	Gln	Asn	Glu	Ile	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	Lys
					325					330					335	
30	Asp	Cys	Leu	Asp	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Pro	Tyr	Leu
				340					345					350		
35	Gln	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val	Phe
			355					360					365			
40	Leu	Leu	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	Asn	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Val
	370						375					380				
45	Val	Pro	Lys	Asn	Ala	Gln	Val	Leu	Val	Asn	Leu	Trp	Ala	Ile	Gly	Arg
	385					390					395					400
50	Asp	Pro	Lys	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Glu	Val	Phe	Ser	Pro	Glu	Arg	Phe
				405						410					415	
55	Leu	Asp	Cys	Asn	Ile	Asp	Tyr	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro
				420					425					430		
60	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Cys	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Arg
		435						440					445			
65	Met	Leu	Asn	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Tyr	Asn	Trp	Lys
	450						455					460				
70	Leu	Glu	Asp	Gly	Ile	Asn	Pro	Lys	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	Glu	Lys	Phe
	465					470					475					480
75	Gly	Ile	Thr	Leu	Gln	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Gln	Val	Ile	Pro	Val	
				485						490					495	

ES 2 930 456 T3

<210> 11
<211> 499
<212> PRT
<213> *Froelichia latifolia*

<400> 11

5	Met	Asp	Asn	Thr	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Ser	Val	Met	Phe	Val	Leu
	1				5					10					15	
10	Phe	His	Leu	Leu	Lys	Thr	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Lys	Leu
				20					25					30		
15	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Arg	Met	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Phe	Asp	Leu
			35				40						45			
20	Gly	Glu	Lys	Pro	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Asn	Phe	Ala	Lys	Ile	His	Gly
		50					55					60				
25	Pro	Leu	Ile	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Ser
	65					70					75					80
30	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Glu	Met	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala	Leu
					85					90					95	
35	Ala	Asn	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Ala	Gly	Asp	His	Asp	Lys
				100					105					110		
40	Leu	Ser	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Lys	Trp	Arg	Asn	Leu	Arg
			115					120					125			
45	Lys	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Asn	Gln	Arg	Leu	Asp	Ala	Ser
		130					135					140				
50	Gln	Pro	Leu	Arg	Gln	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Leu	Leu	Ala	Tyr	Val	Gln
	145					150					155					160
55	Asn	Cys	Ser	Glu	Lys	Asn	Gln	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala	Phe
					165					170					175	
60	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Phe	Ser	Met	Glu	Leu
				180					185					190		
65	Ala	Ser	His	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Met	Trp
			195					200					205			
	Asn	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Phe	Phe	Pro
	210						215					220				

ES 2 930 456 T3

	Ile	Leu	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly
	225					230					235					240
5	Tyr	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Arg	Glu	Arg
					245					250					255	
10	Gln	Lys	Ile	Arg	Ala	Ser	Asn	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys	Gln	Thr	Ser	Asp
				260					265					270		
15	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	Tyr	Glu	Asp	Asn	Glu	Leu	Ser	Met
			275					280					285			
20	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp
	290						295					300				
25	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Asn
	305					310					315					320
30	Pro	Glu	Met	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Asn	Glu	Ile	Glu	Glu	Val	Leu	Gly
					325					330					335	
35	Lys	Asp	Cys	Ser	Asn	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Pro	Tyr
				340					345					350		
40	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val
			355					360					365			
45	Phe	Leu	Leu	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	Val	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr
	370						375					380				
50	Val	Val	Pro	Lys	Asn	Ala	Gln	Val	Leu	Val	Asn	Leu	Trp	Ala	Ile	Gly
	385					390					395					400
55	Arg	Asp	Pro	Lys	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Glu	Val	Phe	Ser	Pro	Glu	Arg
					405					410					415	
60	Phe	Leu	Glu	Cys	Asp	Ile	Asp	Tyr	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu
				420					425					430		
65	Pro	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Cys	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr
			435					440					445			
70	Arg	Met	Leu	Asn	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	His	Asn	Tyr	Asn	Trp
	450						455					460				
75	Lys	Leu	Gly	Asp	Asp	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Leu	Asp	Met	Glu	Glu	Lys
	465					470					475					480

ES 2 930 456 T3

	Phe Gly Ile Thr Leu Gln Lys Ile Lys Pro Leu Gln Val Ile Pro Val	
	485	490 495
5	Ala Arg Lys	
	<210> 12	
	<211> 495	
10	<212> PRT	
	<213> Alternanthera caracasana	
	<400> 12	
15	Met Asp Asn Thr Thr Leu Ala Val Val Leu Ser Ile Met Phe Ala Cys	
	1 5 10 15	
20	Phe His Leu Ile Lys Thr Ile Phe Ser Asn Ser Ser Asn Ser Lys Leu	
	20 25 30	
25	Pro Pro Gly Pro Lys Arg Leu Pro Ile Phe Gly Asn Ile Phe Asp Leu	
	35 40 45	
30	Gly Glu Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Tyr Ala Lys Leu His Gly	
	50 55 60	
35	Pro Leu Ile Ser Leu Gln Leu Gly Ser Val Met Thr Val Ile Val Ser	
	65 70 75 80	
40	Ser Ala Ser Val Ala Glu Glu Met Phe Leu Lys Asn Asp Gln Ala Leu	
	85 90 95	
45	Ala Asn Arg Thr Ile Pro Asp Ser Val Arg Ala Gly Asp His Asp Lys	
	100 105 110	
50	Leu Ser Met Ser Trp Leu Pro Val Ser Pro Lys Trp Arg Asn Leu Arg	
	115 120 125	
55	Lys Ile Ser Ala Val Gln Leu Leu Ser Thr Gln Arg Leu Asp Ala Ser	
	130 135 140	
60	Gln Pro Leu Arg Gln Ala Lys Val Gln Gln Leu Leu Ala Tyr Val Gln	
	145 150 155 160	
65	Asp Cys Ser Lys Lys Gly Gln Pro Val Asp Ile Gly Arg Ala Ala Phe	
	165 170 175	
70	Thr Thr Ser Leu Asn Leu Leu Ser Asn Thr Phe Phe Ser Met Glu Leu	
	180 185 190	

ES 2 930 456 T3

	Ala	Ser	His	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Met	Trp
			195					200					205			
5	Asn	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Phe	Phe	Pro
	210						215					220				
10	Ile	Leu	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Ser
	225					230					235					240
15	Tyr	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Val	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Arg	Glu	Arg
					245					250					255	
20	Gln	Lys	Ile	Arg	Ser	Ser	Asn	Val	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Thr	Asn	Asp
				260					265					270		
25	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Glu	Glu	Asn	Glu	Leu	Ser	Met
			275					280					285			
30	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp
	290						295					300				
35	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Asn
	305					310					315					320
40	Pro	Tyr	Met	Met	Val	Lys	Ala	Gln	Asn	Glu	Ile	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly
					325					330					335	
45	Lys	Asp	Cys	Ser	Asn	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Pro	Tyr
				340					345					350		
50	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val
			355					360					365			
55	Phe	Leu	Leu	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	His	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr
	370						375					380				
60	Val	Val	Pro	Lys	Asn	Ala	Gln	Val	Leu	Val	Asn	Leu	Trp	Ala	Ile	Gly
	385					390					395					400
65	Arg	Asp	Pro	Lys	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Glu	Val	Phe	Phe	Pro	Glu	Arg
					405					410					415	
70	Phe	Leu	Gly	Cys	Asp	Ile	Asp	Tyr	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu
				420					425					430		
75	Pro	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Cys	Pro	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr
			435					440					445			

ES 2 930 456 T3

	Arg	Met	Leu	Asn	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	His	Asn	Tyr	Asn	Trp
	450						455					460				
5	Lys	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Asn	Pro	Lys	Asp	Met	Asp	Met	Glu	Glu	Lys
	465					470					475					480
10	Phe	Gly	Ile	Thr	Leu	Gln	Lys	Ile	Lys	Pro	Leu	Gln	Val	Ile	Pro	
					485					490					495	
	<210> 13															
	<211> 493															
15	<212> PRT															
	<213> Alternanthera ficoidea															
	<400> 13															
20	Met	Asp	Asn	Thr	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Phe	Val	Phe
	1				5					10					15	
25	Phe	His	Leu	Ile	Arg	Ser	Leu	Val	Ser	His	Ser	Ser	Lys	Ser	Ser	Lys
				20					25					30		
30	Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Arg	Met	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Phe	Asp
			35					40					45			
35	Leu	Gly	Glu	Lys	Pro	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Lys	Ile	Tyr
	50						55					60				
40	Gly	Pro	Leu	Ile	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Val	Val	Val
	65					70					75					80
45	Ser	Ser	Ala	Glu	Val	Ala	Lys	Glu	Met	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala
					85					90					95	
50	Leu	Ala	Asn	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Ala	Gly	Asp	His	Asp
				100					105					110		
55	Lys	Leu	Ser	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asn	Lys	Trp	Arg	Asn	Leu
			115					120					125			
60	Arg	Lys	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Thr	Gln	Arg	Leu	Asp	Ala
	130						135					140				
65	Ser	Gln	Ala	Asn	Arg	Gln	Ala	Lys	Val	Gln	Gln	Leu	Leu	Ala	Tyr	Val
	145					150					155					160
70	Gln	Asp	Cys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Pro	Val	Asp	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala
					165					170					175	

ES 2 930 456 T3

	Phe	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Phe	Ser	Ile	Glu
				180					185					190		
5	Leu	Ala	Ser	His	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Met
			195					200					205			
10	Trp	Asn	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Phe	Phe
		210					215					220				
15	Pro	Ile	Leu	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala
	225					230					235					240
20	Ala	Tyr	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Val	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Gln	Glu
				245						250					255	
25	Arg	Gln	Lys	Ile	Arg	Ser	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Thr	Asn	Asp	Ile	Leu
			260						265					270		
30	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Thr
		290					295					300				
35	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Asn	Pro	Glu
	305					310					315					320
40	Met	Met	Ile	Arg	Val	Gln	Asn	Glu	Ile	Glu	Gln	Ala	Val	Gly	Lys	Asp
				325						330					335	
45	Cys	Pro	Met	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln
			340						345					350		
50	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val	Phe	Leu
			355					360					365			
55	Leu	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	Val	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Val
		370					375					380				
60	Pro	Lys	Val	Trp	Lys	Asn	Ser	Glu	Val	Phe	Ser	Pro	Glu	Arg	Phe	Leu
				405						410					415	
65	Glu	Cys	Asp	Ile	Asp	Tyr	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Phe

ES 2 930 456 T3

	420	425	430
5	Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Leu Thr Leu Ala Tyr Arg Met 435 440 445		
10	Leu Asn Leu Met Met Ala Asn Phe Leu Tyr Ser Phe Asp Trp Lys Leu 450 455 460		
15	Glu Gly Gly Met His Pro Lys Asp Leu Asp Met Asp Glu Lys Phe Gly 465 470 475 480		
20	Ile Thr Leu Gln Lys Val Lys Pro Leu Gln Val Ile Pro 485 490		
25	<210> 14 <211> 497 <212> PRT <213> Beta vulgaris <400> 14		
30	Met Asp His Ala Thr Leu Ala Met Ile Leu Ala Ile Trp Phe Ile Ser 1 5 10 15		
35	Phe His Phe Ile Lys Leu Leu Phe Ser Gln Gln Thr Thr Lys Leu Leu 20 25 30		
40	Pro Pro Gly Pro Lys Pro Leu Pro Ile Ile Gly Asn Ile Leu Glu Val 35 40 45		
45	Gly Lys Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Leu Ala Lys Ile His Gly 50 55 60		
50	Pro Leu Ile Ser Leu Arg Leu Gly Ser Val Thr Thr Ile Val Val Ser 65 70 75 80		
55	Ser Ala Asp Val Ala Lys Glu Met Phe Leu Lys Lys Asp His Pro Leu 85 90 95		
60	Ser Asn Arg Thr Ile Pro Asn Ser Val Thr Ala Gly Asp His His Lys 100 105 110		
65	Leu Thr Met Ser Trp Leu Pro Val Ser Pro Lys Trp Arg Asn Phe Arg 115 120 125		
	Lys Ile Thr Ala Val His Leu Leu Ser Pro Gln Arg Leu Asp Ala Cys 130 135 140		
	Gln Thr Phe Arg His Ala Lys Val Gln Gln Leu Tyr Glu Tyr Val Gln		

ES 2 930 456 T3

	145					150						155				160
5	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	Phe
					165					170					175	
10	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Phe	Phe	Ser	Val	Glu	Leu
				180					185					190		
15	Ala	His	His	Lys	Ser	His	Thr	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Glu	Leu	Ile	Trp
			195					200					205			
20	Asn	Ile	Met	Glu	Asp	Ile	Gly	Lys	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Pro
	210						215					220				
25	Ile	Leu	Gly	Cys	Val	Asp	Pro	Ser	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Cys
	225					230					235					240
30	Ser	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Val	Phe	Gln	Gly	Ile	Ile	Cys	Glu	Arg
					245					250					255	
35	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Asp	Asp	Val
				260					265					270		
40	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Gln	Leu	Phe	Lys	Gln	Asn	Glu	Leu	Thr	Met	Gly
		275						280					285			
45	Glu	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr
	290						295					300				
50	Thr	Ser	Ser	Thr	Phe	Glu	Trp	Val	Met	Thr	Glu	Leu	Ile	Arg	Asn	Pro
	305					310					315					320
55	Glu	Met	Met	Glu	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Val	Leu	Gly	Lys
					325					330					335	
60	Asp	Lys	Gln	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ile	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln
				340					345					350		
65	Ala	Ile	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val	Phe	Leu
			355					360					365			
	Leu	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	Thr	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Ile	Val
	370						375					380				
	Pro	Lys	Asp	Ala	Gln	Ile	Leu	Val	Asn	Leu	Trp	Ala	Ile	Gly	Arg	Asp
	385					390					395					400

ES 2 930 456 T3

Pro Asn Ala Trp Gln Asn Ala Asp Ile Phe Ser Pro Glu Arg Phe Ile
405 410 415

5 Gly Cys Glu Ile Asp Val Lys Gly Arg Asp Phe Gly Leu Leu Pro Phe
420 425 430

10 Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Met Asn Leu Ala Ile Arg Met
435 440 445

15 Leu Thr Leu Met Leu Ala Thr Leu Leu Gln Phe Phe Asn Trp Lys Leu
450 455 460

20 Glu Gly Asp Ile Ser Pro Lys Asp Leu Asp Met Asp Glu Lys Phe Gly
465 470 475 480

25 Ile Ala Leu Gln Lys Thr Lys Pro Leu Lys Leu Ile Pro Ile Pro Arg
485 490 495

Tyr

<210> 15
<211> 496
<212> PRT
<213> Amaranthus hybridus subesp. cruento

<400> 15

35 Met Asp Asn Ala Thr Leu Ala Met Ile Leu Thr Ile Trp Phe Ile Ser
1 5 10 15

40 Ile Asn Phe Ile Lys Met Phe Phe Tyr His Gln Asn Thr Lys Leu Ser
20 25 30

45 Leu Pro Pro Gly Pro Lys Pro Leu Pro Ile Ile Gly Asn Ile Leu Glu
35 40 45

50 Val Gly Lys Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Leu Ala Lys Ile His
50 55 60

55 Gly Pro Leu Ile Ser Leu Arg Leu Gly Ser Val Thr Thr Ile Val Val
65 70 75 80

60 Ser Ser Ala Glu Val Ala Lys Glu Met Phe Leu Lys Lys Asp Gln Pro
85 90 95

65 Leu Ser Asn Arg Asn Val Pro Asn Ser Val Thr Ala Gly Asp His His
100 105 110

ES 2 930 456 T3

	Lys	Leu	Thr	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Lys	Trp	Arg	Asn	Phe	
			115					120					125				
5	Arg	Lys	Ile	Thr	Ala	Val	His	Leu	Leu	Ser	Pro	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	
		130					135					140					
10	Cys	Gln	Ser	Leu	Arg	His	Ala	Lys	Val	Gln	Gln	Leu	Tyr	Gln	Tyr	Val	
	145					150					155					160	
15	Gln	Glu	Cys	Ala	Leu	Lys	Gly	Gln	Ser	Val	Asp	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	
					165					170					175		
20	Phe	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Phe	Phe	Ser	Lys	Glu	
				180					185					190			
25	Leu	Ala	Cys	His	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Gln	Leu	Ile	
			195					200					205				
30	Trp	Asn	Ile	Met	Glu	Asp	Ile	Gly	Lys	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	
		210					215					220					
35	Pro	Ile	Leu	Gly	Cys	Ile	Asp	Pro	Leu	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	
	225					230					235					240	
40	Ala	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Phe	Gln	Thr	Ile	Ile	Ser	Glu	
					245					250					255		
45	Arg	Leu	Glu	Asn	Asp	Ile	Asn	Ser	Asn	Ala	Thr	Thr	Asn	Asp	Val	Leu	
				260					265					270			
50	Asp	Val	Leu	Leu	Gln	Leu	Tyr	Lys	Gln	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Glu	
		275						280					285				
55	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Thr	
		290					295					300					
60	Ser	Ser	Thr	Phe	Glu	Trp	Val	Met	Ala	Glu	Leu	Ile	Arg	Asn	Pro	Lys	
	305					310					315					320	
65	Met	Met	Glu	Lys	Ala	Gln	Gln	Glu	Ile	His	Glu	Val	Leu	Gly	Lys	Asp	
					325					330					335		
70	Arg	Gln	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ala	
				340					345					350			
75	Leu	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val	Phe	Leu	Leu	
			355					360					365				

ES 2 930 456 T3

	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	Met	Asp	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Val	Val	Pro	
	370						375					380					
5	Lys	Asp	Ala	Gln	Ile	Leu	Val	Asn	Leu	Trp	Ala	Ile	Gly	Arg	Asp	Ser	
	385					390					395					400	
10	Gln	Val	Trp	Glu	Lys	Pro	Asn	Val	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Phe	Leu	Gly	
					405					410					415		
15	Ser	Asp	Val	Asp	Val	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Leu	Pro	Phe	Gly	
				420					425					430			
20	Ala	Gly	Lys	Arg	Ile	Cys	Pro	Gly	Met	Asn	Leu	Ala	Ile	Arg	Met	Leu	
			435					440					445				
25	Thr	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Gln	Phe	Phe	Asn	Trp	Lys	Leu	Glu	
	450						455					460					
30	Ala	Leu	Gln	Lys	Asn	Lys	Pro	Leu	Glu	Ile	Ile	Pro	Ser	Leu	Arg	His	
					485					490					495		
35	<210> 16																
	<211> 496																
	<212> PRT																
	<213> Mirabilis jalapa																
40	<400> 16																
40	Met	Asp	Phe	Leu	Thr	Leu	Val	Met	Ile	Leu	Ser	Ile	Ile	Phe	Phe	Phe	
	1				5					10				15			
45	Tyr	Asn	Leu	Leu	Lys	Met	Lys	Phe	Thr	Thr	His	Ser	Asp	Ala	Gln	Leu	
			20						25					30			
50	Pro	Pro	Gly	Pro	Lys	Pro	Met	Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Ile	Phe	Glu	Leu	
			35					40					45				
55	Gly	Glu	Lys	Pro	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Thr	His	Gly	
	50						55					60					
60	Pro	Leu	Met	Ser	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Ser	
	65					70					75					80	
65	Ser	Ala	Glu	Val	Ala	Lys	Glu	Met	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ser	Leu	
					85					90					95		

ES 2 930 456 T3

	Ala	Asp	Arg	Ser	Val	Pro	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Asp	His	His	Lys
				100					105					110		
5	Leu	Thr	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Lys	Trp	Lys	Asn	Phe	Arg
			115					120					125			
10	Lys	Ile	Thr	Ala	Val	His	Leu	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Leu	Asp	Ala	Cys
		130					135					140				
15	His	Ala	Leu	Arg	His	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Val	Gln
	145					150					155					160
20	Glu	Cys	Ala	Leu	Lys	Gly	Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	Phe
					165					170					175	
25	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Asn	Leu	Phe	Phe	Ser	Val	Glu	Leu
				180					185					190		
30	Ala	Asn	His	Thr	Ser	Asn	Thr	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Ile	Trp
			195					200					205			
35	Asp	Ile	Met	Glu	Asp	Ile	Gly	Lys	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Pro
	210						215					220				
40	Leu	Leu	Lys	Tyr	Val	Asp	Pro	Ser	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Ala
	225					230					235					240
45	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Phe	Gln	Ser	Phe	Ile	Ser	Lys	Arg
				245						250					255	
50	Leu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Asp	Asp	Val	Leu	Asp
				260					265					270		
55	Val	Leu	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Leu	Asn	Met	Gly	Glu	Ile
			275					280					285			
60	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Thr	Ser
	290						295					300				
65	Asn	Thr	Phe	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Met	Arg	Asn	Pro	Ile	Met
	305					310					315					320
70	Met	Lys	Arg	Ala	Gln	Asn	Glu	Ile	Ala	Leu	Val	Leu	Gly	Lys	Asp	Asn
				325						330					335	
75	Ala	Thr	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Ala	Asn	Met	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ala
			340						345					350		

ES 2 930 456 T3

	Ile Ile Lys Glu Thr Leu Arg Leu His Pro Pro Thr Val Phe Leu Leu	355	360	365
5	Pro Arg Lys Ala Ile Thr Asn Val Lys Leu Tyr Gly Tyr Ile Val Pro	370	375	380
10	Lys Asn Ala Gln Ile Leu Val Asn Leu Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro	385	390	395
15	Lys Val Trp Lys Asn Pro Asn Glu Phe Leu Pro Asp Arg Phe Leu Asn	405	410	415
20	Ser Asp Ile Asp Val Lys Gly Arg Asp Phe Gly Leu Leu Pro Phe Gly	420	425	430
25	Ala Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Met Asn Leu Ala Tyr Arg Met Leu	435	440	445
30	Thr Leu Met Leu Ala Thr Leu Leu Gln Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro	450	455	460
35	His Arg Asn Ser Pro Leu Asp Leu Asp Met Asp Glu Lys Phe Gly Ile	465	470	475
40	Ala Leu Gln Lys Thr Lys Pro Leu Glu Ile Ile Pro Leu Ile Lys Tyr	485	490	495
	<210> 17			
	<211> 494			
	<212> PRT			
	<213> Celosia cristata			
	<400> 17			
45	Met Asp Asn Ala Thr Leu Ala Met Leu Leu Ala Ile Trp Phe Ile Ser	1	5	10
50	Phe His Phe Ile Lys Met Leu Phe Thr Asn Gln Ser Thr Lys Leu Leu	20	25	30
55	Pro Pro Gly Pro Lys Pro Leu Pro Ile Ile Gly Asn Ile Leu Glu Val	35	40	45
60	Gly Lys Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Leu Ala Lys Ile His Gly	50	55	60
65	Pro Leu Ile Ser Leu Lys Leu Gly Ser Val Thr Thr Ile Val Val Ser	65	70	75

ES 2 930 456 T3

	Ser	Ala	Glu	Val	Ala	Lys	Glu	Met	Phe	Leu	Lys	Lys	Asp	Gln	Pro	Leu	
					85					90					95		
5	Ser	Asn	Arg	Thr	Val	Pro	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Asp	His	His	Lys	
				100					105					110			
10	Leu	Thr	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Lys	Trp	Arg	Asn	Phe	Arg	
			115					120					125				
15	Lys	Ile	Thr	Ala	Val	His	Leu	Leu	Ser	Pro	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	Cys	
		130					135					140					
20	Gln	Ser	Leu	Arg	His	Ala	Lys	Val	Gln	Gln	Leu	Phe	Gln	Tyr	Val	Gln	
	145					150					155					160	
25	Glu	Cys	Ala	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	Phe	
					165					170					175		
30	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Phe	Phe	Ser	Lys	Glu	Leu	
				180					185					190			
35	Ala	Ser	His	Lys	Ser	Arg	Glu	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Ile	Trp	
			195					200					205				
40	Asn	Ile	Met	Glu	Asp	Ile	Gly	Lys	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Pro	
	210						215					220					
45	Ile	Leu	Gly	Cys	Val	Asp	Pro	Ser	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Ser	
	225					230					235					240	
50	Asn	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Glu	Val	Phe	Gln	Cys	Ile	Ile	Arg	Gln	Arg	
					245					250					255		
55	Leu	Glu	Arg	Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Asn	Asp	Val	Leu	Asp	Val	
				260					265					270			
60	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr	Lys	Gln	Asn	Glu	Leu	Ser	Met	Gly	Glu	Ile	Asn	
			275					280					285				
65	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Thr	Ser	Ser	
		290					295					300					
70	Thr	Phe	Glu	Trp	Val	Met	Ala	Glu	Leu	Ile	Arg	Asn	Pro	Glu	Met	Met	
	305					310					315					320	
75	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp	Glu	Ile	Glu	Gln	Val	Leu	Gly	Lys	Asp	Arg	Gln	

ES 2 930 456 T3

	325	330	335
5	Ile Gln Glu Ser Asp Ile Ile Lys Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Ile Ile 340 345 350		
10	Lys Glu Thr Leu Arg Leu His Pro Pro Thr Val Phe Leu Leu Pro Arg 355 360 365		
15	Lys Ala Asp Thr Asp Val Glu Leu Tyr Gly Tyr Ile Val Pro Lys Asp 370 375 380		
20	Ala Gln Ile Leu Val Asn Leu Trp Ala Ile Gly Arg Asp Ser Gln Ala 385 390 395 400		
25	Trp Glu Asn Pro Lys Val Phe Ser Pro Asp Arg Phe Leu Gly Cys Glu 405 410 415		
30	Ile Asp Val Lys Gly Arg Asp Phe Gly Leu Leu Pro Phe Gly Ala Gly 420 425 430		
35	Lys Arg Ile Cys Pro Gly Met Asn Leu Ala Ile Arg Met Leu Thr Leu 435 440 445		
40	Met Leu Ala Thr Leu Leu Gln Phe Phe Asn Trp Lys Leu Gln Asp Gly 450 455 460		
45	Met Ser Leu Glu Asp Leu Asp Met Glu Glu Lys Phe Gly Ile Ala Leu 465 470 475 480		
50	Gln Lys Thr Lys Pro Leu Arg Ile Ile Pro Val Ser Arg Tyr 485 490		
55	<210> 18 <211> 499 <212> PRT <213> Beta vulgaris <400> 18		
60	Met Asp Asn Ala Thr Leu Ala Val Ile Leu Ser Ile Leu Phe Val Phe 1 5 10 15		
65	Tyr His Ile Phe Lys Ser Phe Phe Thr Asn Ser Ser Ser Arg Arg Leu 20 25 30		
	Pro Pro Gly Pro Lys Pro Val Pro Ile Phe Gly Asn Ile Phe Asp Leu 35 40 45		
	Gly Glu Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Leu Ser Lys Ile His Gly		

ES 2 930 456 T3

	50		55		60												
5	Pro 65	Leu	Ile	Ser	Leu	Lys 70	Leu	Gly	Ser	Val	Thr 75	Thr	Ile	Val	Val	Ser 80	
10	Ser	Ala	Ser	Val	Ala 85	Glu	Glu	Met	Phe	Leu 90	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala 95	Leu	
15	Ala	Asn	Arg	Thr 100	Ile	Pro	Asp	Ser	Val 105	Arg	Ala	Gly	Asp	His 110	Asp	Lys	
20	Leu	Ser	Met 115	Ser	Trp	Leu	Pro	Val 120	Ser	Gln	Lys	Trp	Arg	Asn	Met	Arg	
25	Lys 130	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Leu 135	Leu	Ser	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Ala	Ser	
30	Gln 145	Pro	Leu	Arg	Gln	Ala 150	Lys	Val	Lys	Gln	Leu 155	Leu	Ser	Tyr	Val	Gln 160	
35	Val	Cys	Ser	Glu	Lys 165	Met	Gln	Pro	Val	Asp 170	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala 175	Phe	
40	Thr	Thr	Ser	Leu 180	Asn	Leu	Leu	Ser	Asn 185	Thr	Phe	Phe	Ser	Ile 190	Glu	Leu	
45	Ala	Ser	His 195	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser 200	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln 205	Leu	Met	Trp	
50	Asn 210	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly 215	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala 220	Asp	Phe	Phe	Pro	
55	Ile 225	Leu	Gly	Tyr	Ile	Asp 230	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg 235	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly 240	
60	Tyr	Phe	Asp	Lys	Leu 245	Ile	Asp	Val	Phe	Gln 250	Asp	Ile	Ile	Arg	Glu 255	Arg	
65	Gln	Lys	Leu	Arg 260	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser 265	Gly	Ala	Lys	Gln	Thr 270	Asn	Asp	
	Ile	Leu	Asp 275	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu 280	His	Glu	Asp	Asn	Glu 285	Leu	Ser	Met	
	Pro	Glu 290	Ile	Asn	His	Leu	Leu 295	Val	Asp	Ile	Phe	Asp 300	Ala	Gly	Thr	Asp	

ES 2 930 456 T3

	Thr Thr Ala Ser Thr Leu Glu Trp Ala Met Ala Glu Leu Val Lys Asn	
	305 310 315 320	
5	Pro Glu Met Met Thr Lys Val Gln Ile Glu Ile Glu Gln Ala Leu Gly	
	325 330 335	
10	Lys Asp Cys Leu Asp Ile Gln Glu Ser Asp Ile Ser Lys Leu Pro Tyr	
	340 345 350	
15	Leu Gln Ala Ile Ile Lys Glu Thr Leu Arg Leu His Pro Pro Thr Val	
	355 360 365	
20	Phe Leu Leu Pro Arg Lys Ala Asp Asn Asp Val Glu Leu Tyr Gly Tyr	
	370 375 380	
25	Val Val Pro Lys Asn Ala Gln Val Leu Val Asn Leu Trp Ala Ile Gly	
	385 390 395 400	
30	Arg Asp Pro Lys Val Trp Lys Asn Pro Glu Val Phe Ser Pro Glu Arg	
	405 410 415	
35	Phe Leu Asp Cys Asn Ile Asp Tyr Lys Gly Arg Asp Phe Glu Leu Leu	
	420 425 430	
40	Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Pro Gly Leu Thr Leu Ala Tyr	
	435 440 445	
45	Arg Met Leu Asn Leu Met Leu Ala Thr Leu Leu Gln Asn Tyr Asn Trp	
	450 455 460	
50	Lys Leu Glu Asp Gly Ile Asn Pro Lys Asp Leu Asp Met Asp Glu Lys	
	465 470 475 480	
55	Phe Gly Ile Thr Leu Gln Lys Val Lys Pro Leu Gln Val Ile Pro Val	
	485 490 495	
60	Pro Arg Asn	
	<210> 19	
	<211> 16212	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Vector de sobreexpresión pX11	
	<400> 19	
	cgctgtcatg agacgaattc tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc	60

ES 2 930 456 T3

	gtttattaga	ataatcggat	atttaaaagg	gcgtgaaaag	gtttatccgt	tcgtccatth	120
	gtatgtgcat	gccaaccaca	gggttccct	cgggatcaaa	gtactttgat	ccaacccctc	180
5	cgctgctata	gtgcagtcgg	cttctgacgt	tcagtgcagc	cgtcatctga	aaacgacatg	240
	tcgcacaagt	cctaagttac	gcgacaggct	gccgccctgc	ccttttcctg	gcgttttctt	300
	gtcgcgtgtt	ttagtgcgat	aaagtagaat	acttgcgact	agaaccggag	acattacgcc	360
10	atgaacaaga	gcgccgccgc	tggcctgctg	ggctatgccc	gcgtcagcac	cgacgaccag	420
	gacttgacca	accaacgggc	cgaactgcac	gcggccggct	gcaccaagct	gttttccgag	480
15	aagatcaccg	gcaccaggcg	cgaccgccc	gagctggcca	ggatgcttga	ccacctacgc	540
	cctggcgacg	ttgtgacagt	gaccaggcta	gaccgcctgg	cccgcagcac	ccgcgacct	600
	ctggacattg	ccgagcgcat	ccaggaggcc	ggcgcgggcc	tgcgtagcct	ggcagagccg	660
20	tgggccgaca	ccaccacgcc	ggccggccgc	atggtgttga	ccgtgttcgc	cggcattgcc	720
	gagttcgagc	gttcccta	catcgaccgc	acccggagcg	ggcgcgaggc	cgccaaggcc	780
25	cgaggcgtga	agtttgcccc	ccgccctacc	ctcaccocgg	cacagatcgc	gcacgcccgc	840
	gagctgatcg	accaggaagg	ccgcaccgtg	aaagaggcgg	ctgcactgct	tggcgtgcat	900
	cgctcgaccc	tgtaccgcgc	acttgagcgc	agcgaggaag	tgacgcccac	cgaggccagg	960
30	cggcgcggtg	ccttccgtga	ggacgcattg	accgaggccg	acgccctggc	ggccgcgag	1020
	aatgaacgcc	aagaggaaca	agcatgaaac	cgcaccagga	cggccaggac	gaaccgtttt	1080
35	tcattaccga	agagatcgag	gcggagatga	tcgcggccgg	gtacgtgttc	gagccgccc	1140
	cgcacctctc	aaccgtgcgg	ctgcatgaaa	tcctggccgg	tttgtctgat	gccaagctgg	1200
	cggcctggcc	ggccagcttg	gccgctgaag	aaaccgagcg	ccgccgtcta	aaaaggat	1260
40	gtgtatttga	gtaaaacagc	ttgcgtcatg	cggctcgtgc	gtatatgatc	cgatgagtaa	1320
	ataaacaat	acgcaagggg	aacgcataaa	ggttatcgct	gtacttaacc	agaaaggcgg	1380
45	gtcaggcaag	acgaccatcg	gaaccatct	agcccgccgc	ctgcaactcg	ccggggccga	1440
	tgttctgtta	gtcgattccg	atccccagg	cagtgcocgc	gattgggcgg	ccgtgcggga	1500
	agatcaaccg	ctaaccgttg	tcggcatcga	ccgcccgacg	attgaccgcg	acgtgaaggc	1560
50	catcgcccg	cgcgacttcg	tagtgatcga	cggagcgccc	caggcggcgg	acttggtgt	1620
	gtccgcgatc	aaggcagccg	acttcgtgct	gattccgggt	cagccaagcc	cttacgacat	1680
55	atgggccacc	gccgacctgg	tggagctggt	taagcagcgc	attgaggcca	cggatggaag	1740
	gctacaagcg	gcctttgtcg	tgtcgcgggc	gatcaaaggc	acgcgcacgc	gcggtgaggt	1800
	tgccgaggcg	ctggccgggt	acgagctgcc	cattcttgag	tcccgtatca	cgcagcgcg	1860
60	gagctacca	ggcactgccg	ccgccggcac	aaccgttctt	gaatcagaac	ccgaggccga	1920
	cgctgcccgc	gaggtccagg	cgctggccgc	tgaaattaaa	tcaaaactca	tttgagttaa	1980
65							

ES 2 930 456 T3

	tgaggtaaag	agaaaatgag	caaaagcaca	aacacgctaa	gtgccggccg	tccgagcgca	2040
	cgcagcagca	aggctgcaac	gttggccagc	ctggcagaca	cgccagccat	gaagcgggtc	2100
5	aactttcagt	tgccggcgga	ggatcacacc	aagctgaaga	tgtacgcggt	acgccaaggc	2160
	aagaccatta	ccgagctgct	atctgaatag	atcgcgccagc	taccagagta	aatgagcaaa	2220
	tgaataaatg	agtagatgaa	tttttagcggc	taaaggaggc	ggcatggaaa	atcaagaaca	2280
10	accaggcacc	gacgccgtgg	aatgccccat	gtgtggagga	acgggcggtt	ggccaggcgt	2340
	aagcggctgg	gttgtctgcc	ggccctgcaa	tggcactgga	acccccaagc	ccgaggaatc	2400
15	ggcgtgacgg	tcgcaaacca	tccggcccg	tacaaatcgg	cgcgccgctg	ggtgatgacc	2460
	tgggtggagaa	gttgaaggcc	gcgcaggccg	cccagcggca	acgcatcgag	gcagaagcac	2520
	gccccgggtga	atcgtggcaa	gcggccgctg	atcgaatccg	caaagaatcc	cggcaaccgc	2580
20	cggcagccgg	tgcgccgtcg	attaggaagc	cgcccaagg	cgacgagcaa	ccagattttt	2640
	tcgttccgat	gctctatgac	gtgggcaccc	gcgatagtcg	cagcatcatg	gacgtggccg	2700
25	ttttccgtct	gtcgaagcgt	gaccgacgag	ctggcgaggt	gatccgctac	gagcttccag	2760
	acgggcacgt	agaggtttcc	gcagggccgg	ccggcatggc	cagtgtgtgg	gattacgacc	2820
	tgggtactgat	ggcggtttcc	catctaaccg	aatccatgaa	ccgataccgg	gaagggaagg	2880
30	gagacaagcc	cggccgcgtg	ttccgtccac	acgttgcgga	cgtactcaag	ttctgccggc	2940
	gagccgatgg	cggaaagcag	aaagacgacc	tggtagaaac	ctgcattcgg	ttaaacacca	3000
35	cgcacgttgc	catgcagcgt	acgaagaagg	ccaagaacgg	ccgcctgggtg	acggtatccg	3060
	aggggtgaagc	cttgattagc	cgctacaaga	tcgtaaagag	cgaaaccggg	cggccggagt	3120
	acatcgagat	cgagctagct	gattggatgt	accgcgagat	cacagaaggc	aagaaccggg	3180
40	acgtgctgac	ggttcacccc	gattactttt	tgatcgatcc	cggcatcggc	cgttttctct	3240
	accgcctggc	acgccgcgcc	gcaggcaagg	cagaagccag	atggttgttc	aagacgatct	3300
45	acgaacgcag	tggcagcgcc	ggagagttca	agaagttctg	tttcaccgtg	cgcaagctga	3360
	tcgggtcaaa	tgacctgccg	gagtacgatt	tgaaggagga	ggcggggcag	gctggcccga	3420
	tcctagtcat	gcgctaccgc	aacctgatcg	agggcgaagc	atccgccggt	tcctaatagta	3480
50	cggagcagat	gctagggcaa	attgccctag	caggggaaaa	aggtcgaaaa	ggactctttc	3540
	ctgtggatag	cacgtacatt	gggaacccaa	agccgtacat	tgggaaccgg	aaccggtaca	3600
55	ttgggaaccc	aaagccgtac	attgggaacc	ggtcacacat	gtaagtgact	gatataaaag	3660
	agaaaaaagg	cgatttttcc	gcctaaaact	ctttaaaact	tattaaaact	cttaaaaccc	3720
	gcctggcctg	tgcataactg	tctggccagc	gcacagccga	agagctgcaa	aaagcgccta	3780
60	cccttcggtc	gctgcgctcc	ctacgccccg	ccgcttcgcg	tcggcctatc	gcgcccgctg	3840

65

ES 2 930 456 T3

	gccgctcaaa aatggctggc ctacggccag gcaatctacc agggcgcgga caagccgcgc	3900
	cgtcgccact cgaccgccgg cgcccacatc aaggcaccct gcctcgcgcg tttcggtgat	3960
5	gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggtgacgg tcacagcttg tctgtaagcg	4020
	gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc	4080
	gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat	4140
10	cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	4200
	ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg ctgcgctcgg	4260
	tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	4320
15	aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	4380
	gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca	4440
20	aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	4500
	ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc	4560
	tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc	4620
25	tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc	4680
	ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggtg agacacgact	4740
30	tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcgggtg	4800
	ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg	4860
	tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca	4920
35	aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa	4980
	aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	5040
40	aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatgc attctagggtg attagaaaaa ctcatcgagc	5100
	atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc	5160
	cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg	5220
45	tatcggctctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca	5280
	aaaataagggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcga ctgaatccgg tgagaatggc	5340
50	aaaagtttat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctctcatca	5400
	aatcactcg catcaaccaa accgttattc attcgtgatt gcgcctgagc gagtcgaaat	5460
	acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac	5520
55	actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat	5580
	gctgttttcc ctgggatcgc agtgggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa	5640
60	tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct	5700
	gtaacatcat tggcaacgct acctttgccg tgtttcagaa acaactctgg cgcacgggc	5760

65

ES 2 930 456 T3

	ttcccataca atcggtagat tgtcgcacct gattgcccga cattatcgcg agcccattta	5820
	tacccatata aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gccttgagca agacgtttcc	5880
5	cgttgaatat ggctcataac agaacttatt atttccttcc tcttttctac agtattttaa	5940
	gataccccaa gaagctaatt ataacaagac gaactccaat tcaactgttcc ttgcattcta	6000
	aaaccttaaa taccagaaaa cagctttttc aaagttgttt tcaaagttgg cgtataacat	6060
10	agtatcgacg gagccgattt tgaaaccgcg gtgatcacag gcagcaacgc tctgtcatcg	6120
	ttacaatcaa catgctaccc tccgcgagat catccgtgtt tcaaaccggg cagcttagtt	6180
15	gccgttcttc cgaatagcat cggtaacatg agcaaagtct gccgccttac aacggctctc	6240
	ccgctgacgc cgtcccgac tgatgggctg cctgtatcga gtggtgattt tgtgccgagc	6300
	tgccggtcgg ggagctgttg gctggctggt ggcaggatat attgtggtgt aaacataacg	6360
20	aattcgtctc aggagagcgt cgatctagta acatagatga caccgcgcgc gataatttat	6420
	cctagtttgc gcgctatatt ttgttttcta tcgcgtatta aatgtataat tgcgggactc	6480
	taatcataaa aacccatctc ataaataacg tcatgcatta catgttaatt attacatgct	6540
25	taacgtaatt caacagaaat tatatgataa tcatcgcaag accggcaaca ggattcaatc	6600
	ttaagaaact ttattgcaa atgtttgaac gatctgcttc gacgcactcc ttctttactc	6660
30	caccatctcg tccttattga aaacgtgggt agcaccaaaa cgaatcaagt cgctggaact	6720
	gaagttacca atcacgctgg atgatttgcc agttggatta atcttgctt tccccgcatg	6780
	aataatattg atgaatgcat gcgtgagggg tagttcgatg ttggcaatag ctgcaattgc	6840
35	cgcgacatcc tccaacgagc ataattcttc agaaaaatag cgatgttcca tgttgtcagg	6900
	gcatgcatga tgcacgttat gaggtgacgg tgctaggcag tattccctca aagtttcata	6960
40	gtcagtatca tattcatcat tgcattcctg caagagagaa ttgagacgca atccacacgc	7020
	tgcggcaacc ttccggcggt cgtggtctat ttgctcttgg acgttgcaaa cgtaagtgtt	7080
	ggatcggggg gggcgaagaa ctccagcatg agatccccgc gctggaggat catccagccg	7140
45	gcgtcccgga aaacgattcc gaagcccaac ctttcataga aggcggcggt ggaatcgaaa	7200
	tctcgtgatg gcaggttggg cgctcgcttg tcggtcattt cgaacccag agtcccgcctc	7260
	agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcgga gcgcgatac	7320
50	cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaag ctcttcagca atatcacggg	7380
	tagccaacgc tatgtcctga tagcgggtccg ccacaccag ccggccacag tcgatgaatc	7440
55	cagaaaagcg gccattttcc accatgatat tcggcaagca ggcacgcca tgggtcacga	7500
	cgagatcctc gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctggcgga	7560
60	gcccctgatg ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac	7620
65		

ES 2 930 456 T3

	gtgctcgctc gatgcgatgt ttcgcttggt ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg	7680
	tatgcagccg ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctccggcagga gcaagggtgag	7740
5	atgacaggag atcctgcccc ggcacttcgc ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag	7800
	tgacaacgtc gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgtcgt ggccagccac gatagccgcg	7860
	ctgcctcgtc ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg	7920
10	ggcgcccctg cgctgacagc cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgttgtg	7980
	cccagtcata gccgaatagc ctctccaccc aagcggccgg agaacctgcc cggatccggg	8040
	cggaaatag taaagaagtt gcggataagg taattgccat tgcagattat ttggattgag	8100
15	agtgaatatg agactctaata tggataccga ggggaattta tggaacgtca gtggagcatt	8160
	tttgacaaga aatatttgct agctgatagt gaccttaggc gacttttgaa cgcgcaataa	8220
20	tggtttctga cgtatgtgct tagctcatta aactccagaa acccctccgt caggagacta	8280
	gagccaagct gatctccttt gccccggaga tcaccatgga cgactttctc tatctctacg	8340
	atctaggaag aaagttcgac ggagaagggtg acgataccat gttcaccacc gataatgaga	8400
25	agattagcct cttcaatttc agaaagaatg ctgaccacac gatgggttaga gaggcctacg	8460
	cggcagggtc gatcaagacg atctacccga gtaataatct ccaggagatc aaataccttc	8520
30	ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa ctgcatcaag aacacagaga	8580
	aagatatatt tctcaagatc agaagtacta ttccagtatg gacgattcaa ggcttgcttc	8640
	ataaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaagaa agtagttcct actgaatcaa	8700
35	aggccatgga gtcaaaaatt cagatcgagg atctaacaga actcgccgtg aagactggcg	8760
	aacagttcat acagagtctt ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg	8820
40	tggagcacga cactctcgtc tactccaaga atatcaaaga tacagtctca gaagaccaa	8880
	gggctattga gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa cctcctcgga ttccattgcc	8940
	cagctatctg tcacttcac caaaaggacag tagaaaagga aggtggcacc tacaatgcc	9000
45	atcattgcga taaaggaaag gctatcgttc aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag	9060
	atggaccccc acccacgagg agcatcgtag aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa	9120
	agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa tcccactatc	9180
50	cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagagg actccggtat	9240
	ttttacaaca ataccacaac aaaacaaaca acaacaaca ttacaattta ctattctagt	9300
55	cgaaatgaaa atgatgaatg gtgaagatgc taatgatcaa atgatcaaag aaagcttctt	9360
	cataacacat ggaaacccaa tattaacagt agaagacaca catccattaa gacctttctt	9420
	tgaaacttgg agagagaaaa tcttttctaa gaaacctaa gcaattctta ttatttctgg	9480
60	tcattgggaa actgttaaac ctactgttaa tgctgtccat atcaatgata ctatccatga	9540

65

ES 2 930 456 T3

	ttttgatgac	tatcctgctg	ctatgtacca	gttcaagtat	ccagctcctg	gggaaccaga	9600
	attggcaaga	aaagtagagg	aaattctgaa	aaaatcgggt	ttcgaaacgg	cggaaactga	9660
5	tcaaaaacgt	gggcttgatc	atggtgcatg	ggtacctcta	atgctaattg	atcctgagggc	9720
	tgatatacca	gtatgtcagc	tctcagttca	gccgcattta	gatggaacat	accattacaa	9780
	cttaggacga	gcattggctc	ccttgaaaaa	cgacggcgta	ttaatcattg	gttcaggaag	9840
10	tgcaactcac	cctttggatg	aaactcctca	ttattttgat	ggagttgcac	cttgggcagc	9900
	tgcctttgat	tcatggcttc	gtaaagctct	cattaatgga	aggtttgaag	aagtgaatat	9960
15	atatgaaagc	aaagcaccaa	attggaaatt	agcacatcct	ttcccagAAC	atttttatcc	10020
	attgcatgtt	gttcttggcg	ctgctggtga	aaaatggaag	gcagagctta	ttcatagcag	10080
	ttgggatcat	ggcaccttgt	gtcatggctc	ctacaagttc	acttcagcct	aggcttggaa	10140
20	tggtatcttcg	atcccgatcg	ttcaaacatt	tggcaataaa	gtttcttaag	attgaatcct	10200
	gttgccggtc	ttgcgacgat	tatcatataa	tttctgttga	attacgttaa	gcatgtaata	10260
	attaacatgt	aatgcatgac	gttatttatg	agatgggttt	ttatgattag	agtcccgcaa	10320
25	ttatacattt	aatacgcgat	agaaaacaaa	atatagcgcg	caaactagga	taaattatcg	10380
	cgcdcggtgt	catctatgtt	actagatcgg	gaattgccaa	gctaattctt	gaagacgaaa	10440
30	gggcctcgtg	atacgccctat	ttttataggt	taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagac	10500
	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaaccct	at ttgtttat	ttttctaaat	10560
	acattcaaat	atgtatccgc	tcatgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	aataatggga	10620
35	cogactcgcg	ctgtcaggag	actagagcca	agctgatctc	ctttgccccg	gagatcacca	10680
	tggacgactt	tctctatctc	tacgatctag	gaagaaagtt	cgacggagaa	ggtgacgata	10740
40	ccatgttcac	caccgataat	gagaagatta	gcctcttcaa	tttcagaaag	aatgctgacc	10800
	cacagatggt	tagagaggcc	tacgcggcag	gtctgatcaa	gacgatctac	ccgagtaata	10860
	atctccagga	gatcaaatac	cttcccaaga	aggttaaaga	tgcagtcaaa	agattcagga	10920
45	ctaactgcat	caagaacaca	gagaaagata	tatttctcaa	gatcagaagt	actattccag	10980
	tatggacgat	tcaaggcttg	cttcataaac	caaggcaagt	aatagagatt	ggagtctcta	11040
50	agaaagtagt	tcctactgaa	tcaaaggcca	tggagtcaaa	aattcagatc	gaggatctaa	11100
	cagaactcgc	cgtgaagact	ggcgaacagt	tcatacagag	tcttttacga	ctcaatgaca	11160
	agaagaaaat	cttcgtcaac	atggtggagc	acgacactct	cgtctactcc	aagaatatca	11220
55	aagatacagt	ctcagaagac	caaagggcta	ttgagacttt	tcaacaaagg	gtaatatcgg	11280
	gaaacctcct	cggattccat	tgcccagcta	tctgtcactt	catcaaaagg	acagtagaaa	11340
60	aggaaggtgg	cacctacaaa	tgccatcatt	gcgataaagg	aaaggctatc	gttcaagatg	11400

65

ES 2 930 456 T3

	cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag	11460
	aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa	11520
5	gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtcat	11580
	ttcatttgga gaggactccg gtatTTTTac aacaatacca caacaaaaca aacaacaaac	11640
	aacattacaa tttactattc tagtogaaat ggatcatgca acattagcaa tgatactagc	11700
10	catttggttc atttcttttc atttcataaa attacttttt agccaacaaa ctaccaaact	11760
	tcttcctcct ggtccaaaac cattgccaat aattggtaac atcttagaag ttggtaaaaa	11820
15	accccatcgt tcatttgcta atcttgctaa aattcacggc cctttaatat cgttacgtct	11880
	aggaagtgta acaactattg ttgtatcatc agcagatgta gctaaagaaa tgttcttaaa	11940
	aaaagaccac cctcttttcta accgtactat tcctaattct gtcacggccg gtgaccacca	12000
20	taaactcacc atgtcgtggg tgcccgtttc gccgaaatgg cggaattttc gtaagattac	12060
	agccgtccat ttgctttctc ctcaaagact tgatgcttgc caaacctttc gccatgccaa	12120
	ggtgcaacag ctttatgaat atgtacaaga atgtgcacaa aaaggccaag ctgttgatat	12180
25	tggcaaagct gcatttacta cctcccttaa tttgttatct aaactattct tttcagtgga	12240
	attagccac cataaatcac acacttctca agagtttaag gaactaatat ggaacattat	12300
30	ggaagatatt gggaaaccta attatgctga ttattttcct attttaggct gtgttgatcc	12360
	atcaggtatt cgtcgaagat tagcatgtag ttttgacaag ttgattgcag tttttcaggg	12420
	tataatatgt gaaaggcttg cgctgattc ttcaactaca acaacaacga cgactgatga	12480
35	tgtgctagac gttcttcttc agctcttcaa acaaatgag ctcaactatgg gcgagattaa	12540
	ccatttgctc gtcgacattt ttgatgctgg aacagacact acatcaagta cttttgagtg	12600
40	ggtcatgaca gagttaatta ggaatcctga aatgatggaa aaggctcaag aagaaattaa	12660
	gcaagtattg ggcaaagata aacaaattca ggaatcagac attattaacc taccttactt	12720
	acaagccatt atcaaagaaa ctttgcgact acatccacca actgtatttc ttttgctcgc	12780
45	taaagccgac actgatgttg aactatatgg ttatatgttg cctaaagatg cacaaatact	12840
	tgtaaactta tgggctattg gaagagatcc taatgcatgg caaatgctg atattttttc	12900
	gcccgaaaga tttatagggg gtgaaaytga tgtcaaagga agagattttg gactcttacc	12960
50	ttttggagcc ggaagaagga tatgtcctgg gatgaatttg gccattagaa tgtaaacttt	13020
	gatgctagct actttacttc aattcttcaa ttggaagctt gaaggagaca taagtccaaa	13080
55	agacttagac atggatgaga aatttgggat tgcgttacia aagacaaagc ctttaaaact	13140
	tattccaata cctaggtatt gataataagc ttgctctcaa gatcaaaggc ttaaaaagct	13200
	ggggttttat gaatgggatc aaagtttctt tttttctttt atatttgctt ctccatttgt	13260
60	ttgtttcatt tccctttttg ttttoggttc tatgatgcac ttgtgtgtga caaactctct	13320

ES 2 930 456 T3

	gggttttttac ttacgtctgc gtttcaaaaa aaaaaaccgc tttcgttttg cgtttttagtc	13380
	ccattgtttt gtagctctga gtgatcgaat tgatgcctct ttattccttt tgttccctat	13440
5	aatttctttc aaaactcaga agaaaaacct tgaaactctt tgcaatgtta atataagtat	13500
	tgtataagat ttttattgat ttggttatta gtcttacttt tgctacctcc atcttcactt	13560
	ggaactgata ttctgaatag ttaaagcggt acatgtcttc cattcacaaa tgaacttaaa	13620
10	ctagcacaaa gtcagatatt ttaagatcgc accattttat ataaccocaa tcgtcaattc	13680
	tactgtttca agttttacac caaaacaatt acgaggtgta tctattcggt actcttttcg	13740
	cttattaatc cttttacatg atgcaaaata taacaaatta atttcaaatt gtcctgcaca	13800
15	tttggtttat acatcttgat tccaaaaagt cgctgtcagg aggtcgacga gtcagtaata	13860
	aacggcgta aagtgggtgc agccggcaca cacgagtcgt gtttatcaac tcaaagcaca	13920
20	aatacttttc ctcaacctaa aaataaggca attagccaaa aacaactttg cgtgtaaaca	13980
	acgctcaata cacgtgtcat tttattatta gctattgctt caccgcctta gctttctcgt	14040
	gacctagtcg tcctcgtctt ttcttcttct tcttctataa aacaataccc aaagagctct	14100
25	tcttcttcac aattcagatt tcaatttctc aaaatcttaa aaactttctc tcaattctct	14160
	ctaccgtgat caaggtaaat ttctgtgttc cttattctct caaaatcttc gattttgttt	14220
30	tcgttcgatc ccaatttcgt atatgttctt tgggttagat tctgttaatc ttagatcgaa	14280
	gacgattttc tgggtttgat cgtagatat catcttaatt ctcgattagg gtttcataga	14340
	tatcatccga tttgttcaaa taatttgagt tttgtcgaat aattactctt cgatttgtga	14400
35	tttctatcta gatctggtgt tagtttctag tttgtgcgat cgaatttgtc gattaatctg	14460
	agtttttctg attaacagaa tgaccgccat taaaatgaac accaatggtg aaggtgaaac	14520
40	acaacatata ctaatgatac ctttcatggc gcaagggcat ttacgtcctt tccttgagct	14580
	tgctatgttt ctatataaac gaagtcattt tatcattact cttcttacta ccccgctcaa	14640
	tgcgggtttc ctacgacatc tccttcacca ccatagctat tctagctcgg ggatcagaat	14700
45	tgctgagtta cctttcaact caaccaatca tgggtcttcca cctggcattg aaaacactga	14760
	taaacttaca ctcccacttg tagtatcact ttttcattca accatttctc ttgaccctca	14820
	ccttagagat tatatttccc gccatttctc ccctgcgcgc cctcctctgt gtgtcataca	14880
50	tgatgtgttc cttgggtggg ttgatcaagt tgctaaagac gtgggctcaa ctggtgttgt	14940
	ttttactacg ggtggcgcgt atggtacaag cgcataatgtg tccatttgga atgatctgcc	15000
55	tcaccagaat tactctgatg atcaagagtt tccgcttcct gggttcccgga agaatacataa	15060
	attccgacgt tctcaacttc atcggtttct gaggtatgcc gatggatcag atgattggtc	15120
60	gaaatatttc caaccgcaat tgaggcaatc aatgaagagt tttggatggc tatgtaattc	15180

ES 2 930 456 T3

	agttgaggaa atcgaaacac ttgggttttag tatcctcagg aactacacta aactacccat	15240
	ttgggggtatt ggaccgttga tagcttcacc tgtacaacat tcatcatctg ataataacag	15300
5	tactgggtgcc gagtttgttc aatgggttgag cttgaaagaa ccagattctg tattatacat	15360
	ctcattttgga tcacagaaca caatttcacc aaccagatg atggaactag cagccggttt	15420
	ggagtcaagt gagaagccgt ttttgtgggt gattcagaca ccatttgggt tcgatatcaa	15480
10	tgaggaaatg agrccagaat ggctaccaga gggattcagag gagcgaatga aggtgaaaaa	15540
	acaaggaaag ttggtgtata agttgggacc acagttggag atacttaacc atgagtcaat	15600
15	cggagggttc ttaactcatt gtgggtggaa ttcgatcctt gagtcacttc gagaagggtg	15660
	gcctatgtta ggggtggccat tggcagccga acaagcttat aatttgaagt atttggagga	15720
	cgaaatgggg gttgcagtcg agttagcgag gggattggaa ggagagataa gtaaagagaa	15780
20	agtgaagaga attgtggaga tgattttaga gagaaatgaa ggaagtaaag gatgggaaat	15840
	gaaaaataga gcagtagaaa tggggaagaa acttaaagac gctgtcaatg aggagaagga	15900
25	actgaagggt tcttctgtta aggcaataga tgatttctta gatgcggtca tgcaagctaa	15960
	gttggaaacct tctcttcaat aagcttcggc catgctagag tccgcaaaaa tcaccagtct	16020
	ctctctacaa atctatctct ctctatcttt ctccagaata atgtgtgagt agttcccaga	16080
30	taaggggaatt agggttctta tagggtttcg ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta	16140
	gtatgtatctt gtattttgtaa aatacttcta tcaataaaat ttctaattcc taaaaccaa	16200
35	atccagtgac ct	16212
	<210> 20	
	<211> 16 919	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> pX11(E8)	
	<400> 20	
45	ggagggggttt ctggagttta atgagctaag cacatacgtc agaaaccatt attgcgcgtt	60
	caaaagtcgc ctaagggtcac tatcagctag caaatatttc ttgtcaaaaa tgctccactg	120
	acgttccata aattcccctc ggtatccaat tagagtctca tattcaactct caatccaaat	180
50	aatctgcaat ggcaattacc ttatccgcaa cttctttacc tatttccgcc cggatccggg	240
	caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa	300
55	tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcgggc tgtcagcgca ggggcgcccg gttctttttg	360
	tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt	420
	ggctggccac gacgggctgt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgctact gaagcgggaa	480
60	gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc	540
65		

ES 2 930 456 T3

	ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg	600
	ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg	660
5	aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg	720
	aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg	780
	gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcacgcact	840
10	gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg	900
	ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc	960
15	ccgattcgca gcgcacgcgc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct	1020
	ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcc a tcacgagatt tcgattccac	1080
	cgcgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat	1140
20	cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt ctctgcccac cccgatccaa cacttacgtt	1200
	tgcaacgtcc aagagcaa at agaccacgaa cgccggaagg ttgccgcagc gtgtggattg	1260
25	cgtctcaatt ctctcttgca ggaatgcaat gatgaatatg atactgacta tgaaactttg	1320
	agggataact gcctagcacc gtcacctcat aacgtgcac atgcatgccc tgacaacatg	1380
	gaacatcgct atttttctga agaattatgc tcgttgagg atgtcgcggc aattgcagct	1440
30	attgccaa ca tcgaactacc cctcacgc at gcattcatca atattattca tgcggggaaa	1500
	ggcaagatta atccaactgg caaatcatcc agcgtgattg gtaacttcag ttccagcgac	1560
35	ttgattcggt ttgggtgtac ccacgttttc aataaggacg agatggtgga gtaaagaagg	1620
	agtgcgtcga agcagatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg	1680
	ttgccgggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa	1740
40	ttaacatgta atgcatgacg ttatattatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat	1800
	tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcg aaactaggat aaattatcgc	1860
45	gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcgac gctgtcagga gactagagcc aagctgatct	1920
	cctttgcccc ggagatcacc atggacgact ttctctatct ctacgatcta ggaagaaagt	1980
	tcgacggaga aggtgacgat accatgttca ccaccgataa tgagaagatt agcctcttca	2040
50	atttcagaaa gaatgctgac ccacagatgg ttagagaggc ctacgcggca ggtctgatca	2100
	agacgatcta cccgagtaat aatctccagg agatcaaata ccttcccaag aaggttaaag	2160
	atgcagtcaa aagattcagg actaactgca tcaagaacac agagaaagat atatttctca	2220
55	agatcagaag tactattcca gtatggacga ttcaaggctt gcttcataaa ccaaggcaag	2280
	taatagagat tggagtctct aagaaagtag ttctactga atcaaaggcc atggagtcaa	2340
60	aaattcagat cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga	2400

ES 2 930 456 T3

	gtcttttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag cactgacactc	2460
	tcgtctactc caagaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct attgagactt	2520
5	ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact	2580
	tcacaaaaag gacagtagaa aaggaaggtg gcacctacaa atgccatcat tgcgataaag	2640
	gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga cccccaccca	2700
10	cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat	2760
	gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt	2820
15	cctctatata aggaagttca tttcatttgg agaggactcc ggtattttta caacaatacc	2880
	acaacaaaaa aaacaacaaa caacattaca atttactatt ctagtgcgaa tgaaaatgat	2940
	gaatggtgaa gatgctaattg atcaaatgat caaagaaagc ttcttcataa cacatggaaa	3000
20	cccaatatta acagtagaag acacacatcc attaagacct ttctttgaaa cttggagaga	3060
	gaaaatcttt tctaagaaac ctaaggcaat tcttattatt tctggtcatt gggaaactgt	3120
25	taaacctact gttaatgctg tocatatcaa tgatactatc catgattttg atgactatcc	3180
	tgctgctatg taccagttca agtatccagc tcctggggaa ccagaattgg caagaaaagt	3240
	agaggaaatt ctgaaaaaat cgggtttcga aacggcggaa actgatcaaa aacgtgggct	3300
30	tgatcatggt gcatgggtac ctctaagtct aatgtatcct gaggtctgata taccagtatg	3360
	tcagctctca gttcagccgc atttagatgg aacataccat tacaacttag gacgagcatt	3420
35	ggctcccttg aaaaacgacg gcgtattaat catttggttca ggaagtgcaa ctcacccttt	3480
	ggatgaaact cctcattatt ttgatggagt tgcaccttgg gcagctgcct ttgattcatg	3540
	gcttcgtaaa gctctcatta atggaagggt tgaagaagtg aatatatatg aaagcaaagc	3600
40	accaaattgg aaattagcac atcctttccc agaacatttt tatccattgc atgttgttct	3660
	tggcgctgct ggtgaaaaat ggaaggcaga gcttattcat agcagttggg atcatggcac	3720
45	cttgtgtcat ggctcctaca agttcacttc agcctaggct tggaatggat cttcgatccc	3780
	gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg	3840
	acgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc	3900
50	atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac	3960
	gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcdc ggtgtcatct	4020
55	atgttactag atcgggaatt gccaaagctaa ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg	4080
	cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt	4140
	tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	4200
60	tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tgggaccgac tcgcgctgtc	4260
	aggaggaatt catttttgac atocctaatt atattgttca cgtaattaag ttttgtggaa	4320

65

ES 2 930 456 T3

	gtgagagagt ccaatthttga taagaaaaga gtcagaaaac gtaatatthtt aaaagtctaa	4380
	atctthttctac aaataagagc aaatthttatthtt atthttthtaat ccaataaaata ttaatggagg	4440
5	acaaattcaa ttcacttggt tgtaaaataa acttaaacca ataaccaaag aactaataaa	4500
	tctgaagtgg aattattaag gataatgtac atagacaatg aagaaataat aggttcgatg	4560
	aattaataat aattaaggat gttacaatca tcatgtgcc aagtatatata caatattcta	4620
10	tgggatttht aatthtcgtha cthtcaatthtt cthtttgcgta aataaaacga attatctgat	4680
	atthttataat aaaacagtha attaagaacc atcatthttthtt acaacataga tatattattth	4740
15	ctaatagthtt aatgatactth ttaaatctthtt taaatthttat gthttctthttta gaaaataaaa	4800
	attcaaaaaa attaaatata thttacaaaaa ctacaatcaa acacaactthc atatatthaaa	4860
	agcaaaatat atthttgaaaa thttcaagtgt cctaacaaat aagacaagag gaaaatgtac	4920
20	gatgagagac ataaagagaa ctaataattg aggagtccta taatatataa taaagthttat	4980
	tagtaaaactth aattattaag gactcctaata atatatgata ggagaaaatg aatgggtgaga	5040
25	gatattggaa aacttaataa ttaaggatat taaaatatat ggtaaaagat aggcmaaagta	5100
	tccattatcc cthttthtaact tgaagtctac ctaggcgcat gtgaaaggtht gattthttthgt	5160
	cacgtcatat agctataacg taaaaaaaaga aagtaaaatt thttaattthtt thttaatatat	5220
30	gacatatthtt aaacgaaata taggacaaaa tgtaaatgaa tagtaaaagga aacaaagatt	5280
	aatactthact ttgtaagaat ttaagataaa thttaaaattth aatagatcaa cthttacgtct	5340
35	agaaagaccc atattctagaa ggaattthcac gaaatcggcc cthtattcaaa aataactthtt	5400
	aaataatgaa thtttaaatthtt taagaaataa tatccaatga ataaatgaca tgtagcattth	5460
	tacctaaata thttcaactat thttaatccaa tattaattthg thtttattccc aacaatagaa	5520
40	agtctthgtgc agacattthaa tctgactthtt ccagtactaa atattaattth tctgaagatt	5580
	thtcgggtthta gtccacaagt thttagtgaga agthtttgctc aaaattthtag gtgagaaggth	5640
45	thtgatattth tctthttgtha aattaattth tctagggtgac tattatttht ttaagtagaa	5700
	attcatatca thtactthttgc caactthgtag tcataatagg agtaggtgta tatgatgaag	5760
	gaataaaacaa gthtcagtga gtgattaaaa taaaatataa thttaggtgta catcaaataa	5820
50	aaacctthaaa gthttagaaag gcaccgaata atthttgcata gaagatatta gtaaatttht	5880
	aaaaataaaa gaaatgtagt tgtcaagtht tctthctthtt thttggataaa aatagcagth	5940
55	ggctthtgtc attctthttac aacctccatg ccactthgtcc aattgthtgc actthactaa	6000
	thtagthttgat tcatgtatga atactaaata atthttthtagg actgactcaa atattthttat	6060
	attatcatag taatatthttat ctaattthttta ggaccactth ttactaaata ataaattaac	6120
60	tactactata thattgtthgt gaaacaacaa cgthttthggtht gthtatgatga acactatatc	6180
65		

ES 2 930 456 T3

	agtatgaaaa attcaaaacg attagtataa attatattga aaatttgata tttttctatt	6240
	cttaatcaga cgtattgggt ttcataTTTT aaaaaggac taaacttaga agagaagttt	6300
5	gtttgaaact acttttgtct ctttcttggt ccctttctc tcttagattt caaaaagtga	6360
	actactttat ctctttcttt gttcacattt tattttattc tattataaat atggcatcct	6420
	catattgaga tttttaatgg atcatgcaac attagcaatg atactagcca tttggttcat	6480
10	ttcttttcat ttcataaaat tacttttttag ccaacaaact accaaacttc ttcctcctgg	6540
	tccaaaacca ttgccaataa ttggtaacat cttagaagtt ggtaaaaaac cccatcgttc	6600
15	atttgctaatt cttgctaaaa ttcacggccc tttaatatcg ttacgtctag gaagtgtaac	6660
	aactattggt gtatcatcag cagatgtagc taaagaaatg ttcttaaaaa aagaccaccc	6720
	tctttctaac cgtactattc ctaattctgt cacggccggt gaccaccata aactcaccat	6780
20	gtcgtggttg ccggtttcgc cgaaatggcg gaattttcgt aagattacag ccgtccattt	6840
	gctttctcct caaagacttg atgcttgcca aacctttcgc catgccaagg tgcaacagct	6900
25	ttatgaatat gtacaagaat gtgcacaaaa aggccaagct gttgatattg gcaaagctgc	6960
	atttactacc tcccttaatt tggtatctaa actattcttt tcagtggaaat tagcccacca	7020
	taaatcacac acttctcaag agtttaagga actaatatgg aacattatgg aagatattgg	7080
30	gaaacctaatt tatgctgatt attttcctat tttaggctgt gttgatccat caggattcgt	7140
	tcgaagatta gcatgtagtt ttgacaagtt gattgcagtt tttcagggtta taatatgtga	7200
	aaggcttgcg cctgattctt caactacaac aacaacgacg actgatgatg tgctagacgt	7260
35	tcttcttcag ctcttcaaac aaaatgagct cactatgggc gagattaacc atttgctcgt	7320
	cgacattttt gatgctggaa cagacactac atcaagtact tttgagtggg tcatgacaga	7380
40	gttaattagg aatcctgaaa tgatggaaaa ggctcaagaa gaaattaagc aagtattggg	7440
	caaagataaa caaattcagg aatcagacat tattaaccta ccttacttac aagccattat	7500
	caaagaaact ttgcgactac atccaccaac tgtatttctt ttgcctcgta aagccgacac	7560
45	tgatgttgaa ctatatggtt atattgtgcc taaagatgca caaatacttg ttaacttatg	7620
	ggctattgga agagatccta atgcatggca aaatgctgat attttttcgc ccgaaagatt	7680
50	tatagggtgt gaaaytgatg tcaaaggaag agattttgga ctcttacctt ttggagccgg	7740
	aagaaggata tgtcctggga tgaatttggc cattagaatg ttaactttga tgctagctac	7800
	tttacttcaa ttcttcaatt ggaagcttga aggagacata agtccaaaag acttagacat	7860
55	ggatgagaaa tttgggattg cggttcaaaa gacaaagcct ttaaaactta ttccaatacc	7920
	taggtattga taataagctt cggccatgct agagtccgca aaaatcacca gtctctctct	7980
60	acaaatctat ctctctctat ttttctccag aataatgtgt gagtagttcc cagataaggg	8040
	aattaggggt cttatagggt ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt	8100

65

ES 2 930 456 T3

	atttgtat	gtaaaata	act tctatca	ataaattt	cttaa	caaaatccag	8160
	tgacctcg	gtcaggagg	tcgacgag	tca gtaataaa	cg gcgtcaa	agggtgcagcc	8220
5	ggcacacac	g agtcgtgt	ttt atcaact	caa agcacaaa	ata cttttcct	caaccta	8280
	aaggcaatta	gccaaaaa	ca actttg	cggtg taaaca	acgc tcaata	acagc tgtcatt	8340
	ttattagcta	ttgcttcacc	gccttagc	tt tctcgt	gacc tagtcgt	cct cgtcttt	8400
10	tcttcttct	ctataaaa	ca ataccc	aaag agctctt	ctt caca	aatt cagatt	8460
	tttctcaaaa	tcttaaaa	caac tttctc	ta tctctc	tac cgtgat	caag gtaaa	8520
	gtgttcctta	ttctctcaa	a atcttc	gatt ttgttt	tcgt tccca	tttctgtat	8580
15	gttctttg	gtttagatt	ctgt ttaat	ccttag atcga	agacg attttc	tggg tttgat	8640
	agatatcatc	ttaatctcg	at taggg	ttt catag	atc atccg	attt ttcaa	8700
20	ttgagtttt	gtogaata	aatt actctt	cgat ttgtg	atttc tatc	tagatc tgggt	8760
	ttctagttt	gtcgatc	gaa tttgt	cgatt aatct	gagtt tttc	tgatta acaga	8820
	cgccattaaa	atgaacac	ca atggt	gaagg tgaa	acacaa catata	actaa tgata	8880
25	catggcgca	gggcattt	ac gtcc	tttcc tggag	cttgct atgtt	ctat ataa	8940
	tcattttatc	attactctt	c ttacta	cccc gctca	atgcg ggttt	cctac gacat	9000
30	tcaccac	cat agctat	tcta gctc	ggggat caga	aattgtc gagtt	acctt tcaac	9060
	caatcatg	gttccac	ctg gcatt	gaaaa cactg	ataaa cttac	actcc cactt	9120
	atcactttt	ctttcaac	ca tttct	ccttgga ccctc	acctt agag	attata tttcc	9180
35	tttctccct	ggcgccctc	ctctgtgt	gt catac	atgat gtgtt	ccttg gttgg	9240
	tcaagttg	ct aaagac	gtgg gctca	actgg ttgt	gtttttt actac	gggtg gcgc	9300
40	tacaagc	gca tatgt	gtcca tttg	gaatga tctg	cctcac caga	attact ctgat	9360
	agagtttcc	g cttcct	ggtt tcccg	gagaa tcata	aattc cgac	gttctc aactt	9420
	gtttctgag	gtatgcc	gatg gatc	agatga ttgg	tcgaaa tattt	ccaac cgca	9480
45	gcaatca	atg aagag	ttttg gatg	gtctatg taatt	cagtt gagg	aaatcg aaac	9540
	gtttagtat	c ctcagg	aact acact	aaact accc	atttgg ggtat	tgagc cgttg	9600
	ttcacctg	t caacatt	cat catct	gataa taac	agtaact ggtg	ccgagttgtt	9660
50	gttgagc	ttg aaaga	accag attct	gtatt atac	atctca tttg	gatcac aga	9720
	ttcacca	acc cagat	gatgg aact	agcagc cggtt	tggag tcaag	tgaga agcc	9780
55	gtgggtg	att cgag	caccat ttggg	ttcga tatc	aatgag gaaat	gagrc caga	9840
	accagagg	ga ttcg	aggagc gaat	gaagg gaaaa	acaa ggaa	agttgg tgtat	9900
60	gggaccac	ag ttgg	agatac ttaac	catga gtca	atcgga ggtt	ccttaa ctcatt	9960
65							

ES 2 930 456 T3

	gtggaattcg atccttgagt cacttcgaga aggtgtgcct atgttagggg ggccattggc	10020
	agccgaacaa gcttataatt tgaagtatct ggaggacgaa atggggggtg cagtcgagtt	10080
5	agcgagggga ttggaaggag agataagtaa agagaaagtg aagagaattg tggagatgat	10140
	tttagagaga aatgaaggaa gtaaaggatg ggaaatgaaa aatagagcag tagaaatggg	10200
	gaagaaactt aaagacgctg tcaatgagga gaaggaactg aagggttctt ctgttaaggc	10260
10	aatagatgat ttcttagatg cggtcatgca agctaagttg gaaccttctc ttcaataagc	10320
	ttcggccatg ctagagtccg caaaaatcac cagtctctct ctacaaatct atctctctct	10380
	atcttctctc agaataatgt gtgagtagtt ccagataag ggaattaggg ttcttatagg	10440
15	gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa cccttagtat gtatttgtat ttgtaaaata	10500
	cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa accaaaatcc agtgacctcg ctgtcatgag	10560
20	acgaattctg acaggatata ttggcgggta aacctaagag aaaagagcgt ttattagaat	10620
	aatcgatat ttaaaagggc gtgaaaaggc ttatccgttc gtccatttgt atgtgcatgc	10680
	caaccacagg gttcccctcg ggatcaaagt actttgatcc aacccctccg ctgctatagt	10740
25	gcagtcggct tctgacgttc agtgcagccg tcatctgaaa acgacatgtc gcacaagtcc	10800
	taagttacgc gacaggctgc cgccctgccc ttttcctggc gttttcttgt cgcgtgtttt	10860
30	agtcgcataa agtagaatac ttgcgactag aaccggagac attacgccat gaacaagagc	10920
	gccgcgctg gcctgctggg ctatgccgcg gtcagcaccg acgaccagga cttgaccaac	10980
	caacggggccg aactgcacgc ggccggctgc accaagctgt tttccgagaa gatcaccggc	11040
35	accaggcgcg accgcccgga gctggccagg atgcttgacc acctacgccc tggcgacgtt	11100
	gtgacagtga ccaggctaga ccgcctggcc cgcagcaccg gcgacctact ggacattgcc	11160
	gagcgcatcc aggaggccgg cgcgggcctg cgtagcctgg cagagccgtg ggccgacacc	11220
40	accacgccgg ccggccgcat ggtgttgacc gtgttcgccc gcattgccga gttcgagcgt	11280
	tccctaatac tcgaccgcac ccggagcggg cgcgaggccg ccaaggcccg aggcgtgaag	11340
45	tttgggcccc gccctaccct caccocggca cagatcgcg acgcccgcga gctgatcgac	11400
	caggaaggcc gcaccgtgaa agaggcggct gcactgcttg gcgtgcatcg ctcgaccctg	11460
	taccgcgcac ttgagcgag cgaggaagtg acgcccaccg aggccaggcg gcgcggtgcc	11520
50	ttccgtgagg acgcattgac cgaggccgac gccctggcgg ccgcccagaa tgaacgcaa	11580
	gaggaacaag catgaaaccg caccaggacg gccaggacga accgtttttc attaccgaag	11640
55	agatcgaggc ggagatgatc gcggccgggt acgtgttcga gccgcccgcg cacctctcaa	11700
	ccgtgcccgt gcatgaaatc ctggccgggt tgtctgatgc caagctggcg gcctggccgg	11760
	ccagcttggc cgctgaagaa accgagcgcc gccgtctaaa aaggtgatgt gtatttgagt	11820
60	aaaacagctt gcgtcatgcg gtcgctgcgt atatgatccg atgagtaaat aaacaaatac	11880

65

ES 2 930 456 T3

	gcaaggggaa	cgcatgaagg	ttatcgctgt	acttaaccag	aaaggcgggt	caggcaagac	11940
	gaccatcgga	acccatctag	cccgcgccct	gcaactcgcc	ggggccgatg	ttctgttagt	12000
5	cgattccgat	ccccagggca	gtgcccgcga	ttgggcggcc	gtgcgggaag	atcaaccgct	12060
	aaccgttgtc	ggcatcgacc	gcccgcacat	tgaccgcgac	gtgaaggcca	tcggccggcg	12120
	cgacttcgta	gtgatcgacg	gagcgcccca	ggcggcggac	ttggctgtgt	ccgcgatcaa	12180
10	ggcagccgac	ttcgtgctga	ttccgggtgca	gccaagccct	tacgacatat	gggccaccgc	12240
	cgacctggtg	gagctggtta	agcagcgcat	tgaggtcacg	gatggaaggc	tacaagcggc	12300
15	ctttgtcgtg	tcgcgggcga	tcaaaggcac	gcgcatacgg	ggtgaggttg	ccgagggcgt	12360
	ggccgggtac	gagctgcccc	ttcttgagtc	ccgtatcacg	cagcgctgta	gctaccagg	12420
	caactgccgc	gccggcacaa	ccgttcttga	atcagaaccc	gagggcgacg	ctgcccgcga	12480
20	ggtccaggcg	ctggccgctg	aaattaaatc	aaaactcatt	tgagttaatg	aggtaaagag	12540
	aaaatgagca	aaagcacaaa	cacgctaagt	gccggccgtc	cgagcgacg	cagcagcaag	12600
25	gctgcaacgt	tggccagcct	ggcagacacg	ccagccatga	agcgggtcaa	ctttcagttg	12660
	ccggcggagg	atcacaccaa	gctgaagatg	tacgcggtac	gccaaggcaa	gaccattacc	12720
	gagctgctat	ctgaatagat	cgcgacgcta	ccagagtaaa	tgagcaaagt	aataaatgag	12780
30	tagatgaatt	ttagcggcta	aaggaggcgg	catggaaaat	caagaacaac	caggcaccga	12840
	cgccgtggaa	tgccccatgt	gtggaggaac	gggcggttgg	ccaggcgtaa	gcccgtgggt	12900
35	tgtctgccgg	ccctgcaatg	gcaactggaac	ccccaaagccc	gaggaatcgg	cgtgacggtc	12960
	gcaaaccatc	cgggcccggt	caaactcggc	gggcgctggg	tgatgacctg	gtggagaagt	13020
	tgaaggccgc	gcaggccgcc	cagcggcaac	gcatcgaggc	agaagcacgc	cccgggtgaat	13080
40	cgtggcaagc	ggccgctgat	cgaatccgca	aagaatcccg	gcaaccgccg	gcagccgggtg	13140
	cgccgtcgat	taggaagccg	cccaagggcg	acgagcaacc	agattttttc	gttccgatgc	13200
45	tctatgacgt	gggcacccgc	gatagtcgca	gcatcatgga	cgtggccggt	ttccgtctgt	13260
	cgaagcgtga	ccgacgagct	ggcgagggtga	tccgctacga	gcttccagac	gggcacgtag	13320
	aggtttccgc	agggccggcc	ggcatggcca	gtgtgtggga	ttacgacctg	gtactgatgg	13380
50	cggtttccca	tctaaccgaa	tccatgaacc	gataccggga	agggaaggga	gacaagcccg	13440
	gccgcgtgtt	ccgtccacac	gttgccggacg	tactcaagtt	ctgccggcga	gccgatggcg	13500
55	gaaagcagaa	agacgacctg	gtagaaacct	gcattcgggt	aaacaccacg	cacgttgcca	13560
	tgcagcgtac	gaagaaggcc	aagaacggcc	gcctgggtgac	ggtatccgag	ggtgaagcct	13620
	tgattagccg	ctacaagatc	gtaaagagcg	aaaccggggcg	gccggagtac	atcgagatcg	13680
60	agctagctga	ttggatgtac	cgcgagatca	cagaaggcaa	gaaccgggac	gtgctgacgg	13740

65

ES 2 930 456 T3

	ttcaccccgga ttacttttttg atcgatcccg gcatcggccg ttttctctac cgcctggcac	13800
	gccgcgccgc aggcaaggca gaagccagat ggttggttcaa gacgatctac gaacgcagtg	13860
5	gcagcgcccg agagttcaag aagttctgtt tcaccgtgcg caagctgacg ggggtcaaatg	13920
	acctgccgga gtacgatttg aaggaggagg cggggcgaggc tggcccgatc ctagtcatgc	13980
	gctaccgcaa cctgatcgag ggcgaagcat ccgccggttc ctaatgtacg gagcagatgc	14040
10	tagggcaaat tgccctagca ggggaaaaag gtcgaaaagg actctttcct gtggatagca	14100
	cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggaa cccgtacatt gggaacccaa	14160
15	agccgtacat tgggaaccgg tcacacatgt aagtgactga tataaaagag aaaaaaggcg	14220
	atTTTTccgc ctaaaactct ttaaaactta ttaaaactct taaaaccgcg ctggcctgtg	14280
	cataactgtc tggccagcgc acagccgaag agctgcaaaa agcgcctacc cttcggtcgc	14340
20	tgcgctccct acgccccgcc gcttcgcgctc ggcctatcgc ggcgctggc cgctcaaaaa	14400
	tggctggcct acggccaggc aatctaccag ggcgcggaca agccgcgcgc tcgccactcg	14460
	accgccggcg ccacatcaa ggcaccctgc ctgcgcgctt tcggtgatga cgggtgaaac	14520
25	ctctgacaca tgcagctccc ggtgacggtc acagcttgctc tgtaagcgga tgcggggagc	14580
	agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc	14640
30	cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg	14700
	tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc	14760
	gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc	14820
35	ggcgagcgggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata	14880
	acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaaccgt aaaaaggccg	14940
40	cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct	15000
	caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa	15060
	gctccctcgt gcgctctcct gttccgacctc tgcgcgttac cggataacctg tccgcctttc	15120
45	tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg	15180
	aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg	15240
50	ccttatccgg taactatcgt cttgagtcga acccggtgaa acacgactta tcgccactgg	15300
	cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcgggtgct acagagttct	15360
	tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc	15420
55	tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg	15480
	ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc	15540
60	aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt	15600
	aagggatttt ggtcatgcat tctaggtgat tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac	15660

65

ES 2 930 456 T3

	tgcaatztat tcatatcagg attatcaata ccatatTTTT gaaaaagccg tttctgtaat	15720
	gaaggagaaa actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg	15780
5	attccgactc gtccaacatc aatacaacct attaatTTTc cctcgtcaaa aataaggTTa	15840
	tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc	15900
10	atttctttcc agacttgTtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca	15960
	tcaaccaaac cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gtcgaaatac gcgatcgctg	16020
	ttaaaaggac aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca	16080
15	tcaacaatat tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttccct	16140
	gggatcgagc tgggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc	16200
20	ggaagaggca taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg	16260
	gcaacgctac ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat	16320
	cggtagattg tcgcacctga ttgcccagaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa	16380
25	tcagcatcca tgttgggaatt taatcgcggc cttgagcaag acgtttcccg ttgaatatgg	16440
	ctcataacag aacttattat ttccttcctc ttttctacag tatttaaaga taccccaaga	16500
30	agctaattat aacaagacga actccaattc actgttcctt gcattctaaa accttaaata	16560
	ccagaaaaca gctttttcaa agttgttttc aaagttggcg tataacatag tatcgacgga	16620
	gccgattttg aaaccgcggt gatcacaggc agcaacgctc tgtcatcggt acaatcaaca	16680
35	tgctaccctc cgcgagatca tccgtgtttc aaaccoggca gcttagttgc cgttcttccg	16740
	aatagcatcg gtaacatgag caaagtctgc cgccttacia cggctctccc gctgacgccg	16800
40	tcccgactg atgggctgcc tgtatcgagt ggtgattttg tgccgagctg ccggtcgggg	16860
	agctgttggc tggctggtgg caggatatat tgtggtgtaa acataacgaa ttcgtctca	16919
45	<210> 21 <211> 15 191 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pX11(CHS)	
50	<400> 21	
	cgctgtcatg agacgaattc tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc	60
55	gtttattaga ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatccgt tcgtccattt	120
	gtatgtgcat gcccaaccaca gggttccctt cgggatcaaa gtactttgat ccaaccctc	180
	cgctgctata gtgcagtcgg cttctgacgt tcagtgcagc cgtcatctga aaacgacatg	240
60	tcgcacaagt cctaagttac gcgacaggct gccgcctgc ccttttcctg gcgttttctt	300

65

ES 2 930 456 T3

	gtcgcgtggt tttagtcgcat aaagtagaat acttgcgact agaaccggag acattacgcc	360
	atgaacaaga gcgccgccgc tggcctgctg ggctatgccc gcgtcagcac cgacgaccag	420
5	gacttgacca accaacgggc cgaactgcac gcggccggct gcaccaagct gttttccgag	480
	aagatcaccc gcaccaggcg cgaccgcccc gagctggcca ggatgcttga ccacctacgc	540
	cctggcgacg ttgtgacagt gaccaggcta gaccgcctgg cccgcagcac ccgcgacct	600
10	ctggacattg ccgagcgcat ccaggaggcc ggccgccccg tgcgtagcct ggagagccg	660
	tgggccgaca ccaccacgcc ggccggccgc atggtgttga ccgtgttcgc cggcattgcc	720
15	gagttcgagc gttccctaata catcgaccgc acccgagcg ggccgcaggc cgccaaggcc	780
	cgaggcgtga agtttgcccc ccgccctacc ctacccccgg cacagatcgc gcacgccccg	840
	gagctgatcg accaggaagg ccgcaccgtg aaagaggcgg ctgcaactgt tggcgtgcat	900
20	cgctcgaccc tgtaccgcgc acttgagcgc agcgagggaag tgacgcccac cgaggccagg	960
	cgccgcgggt ccttccgtga ggacgcattg accgaggccg acgccctggc ggccgcccag	1020
25	aatgaacgcc aagaggaaca agcatgaaac cgcaccagga cggccaggac gaaccgtttt	1080
	tcattaccga agagatcgag gcggagatga tcgcggccgg gtacgtgttc gagccgcccc	1140
	cgcacctctc aaccgtgcgg ctgcatgaaa tcctggccgg tttgtctgat gccaagctgg	1200
30	cgccctggcc ggccagcttg gccgctgaag aaaccgagcg ccgccgtcta aaaaggtgat	1260
	gtgtatttga gtaaaacagc ttgcgtcatg cggtcgctgc gtatatgatc cgatgagtaa	1320
35	ataaacaaat acgcaagggg aacgcatgaa ggttatcgct gtacttaacc agaaaggcgg	1380
	gtcaggcaag acgaccatcg gaacccatct agcccgccgc ctgcaactcg ccggggccga	1440
	tgttctgtta gtcgattccg atccccaggg cagtgcgccg gattggggcg ccgtgcggga	1500
40	agatcaaccg ctaaccgttg tcggcatcga ccgcccgacg attgaccgcg acgtgaaggc	1560
	catcggcccg cgcgacttcg tagtgatcga cggagcgccc caggcgggcg acttggtgt	1620
	gtccgcgatc aaggcagccg acttcgtgct gattccgggt cagccaagcc cttacgacat	1680
45	atgggccacc gccgacctgg tggagctggt taagcagcgc attgaggtca cggatggaag	1740
	gctacaagcg gcctttgtcg tgtcgccggc gatcaaaggc acgcgcacat gcggtgaggt	1800
50	tgccgaggcg ctggccgggt acgagctgcc cattcttgag tcccgatatca cgcagcgct	1860
	gagctacca ggcactgccg ccgccggcac aaccgttctt gaatcagaac ccgagggcga	1920
	cgctgccccg gaggtccagg cgctggccgc tgaaattaaa tcaaaactca tttgagttaa	1980
55	tgaggtaaag agaaaatgag caaaagcaca aacacgctaa gtgccggccg tccgagcgca	2040
	cgcagcagca aggctgcaac gttggccagc ctggcagaca cgccagccat gaagcgggtc	2100
60	aactttcagt tgccggcgga ggatcacacc aagctgaaga tgtacgcggt acgccaaggc	2160
	aagaccatta ccgagctgct atctgaatag atcgcgcagc taccagagta aatgagcaaa	2220

65

ES 2 930 456 T3

	tgaataaatg agtagatgaa ttttagcggc taaaggaggc ggcatggaaa atcaagaaca	2280
	accaggcacc gacgccgtgg aatgccccat gtgtggagga acgggcgggtt ggccaggcgt	2340
5	aagcggctgg gttgtctgcc ggccctgcaa tggcactgga accccaagc ccgaggaatc	2400
	ggcgtgacgg tcgcaaacca tccggcccgg tacaaatcgg cgcggcgctg ggtgatgacc	2460
	tggtggagaa gttgaaggcc gcgcaggccg cccagcggca acgcatcgag gcagaagcac	2520
10	gccccggtga atcgtggcaa gcggccgctg atcgaatccg caaagaatcc cggcaaccgc	2580
	cggcagccgg tgcgccgtcg attaggaagc cggccaaggg cgacgagcaa ccagattttt	2640
15	tcgttccgat gctctatgac gtgggcaccc gcgatagtcg cagcatcatg gacgtggccg	2700
	ttttccgtct gtcgaagcgt gaccgacgag ctggcgaggt gatccgctac gagcttccag	2760
	acgggcacgt agaggtttcc gcagggccgg ccggcatggc cagtgtgtgg gattacgacc	2820
20	tggtactgat ggcggtttcc catctaaccg aatccatgaa ccgataccgg gaagggaagg	2880
	gagacaagcc cggccgcgtg ttccgtccac acgttgccga cgtactcaag ttctgccggc	2940
25	gagccgatgg cgaaaagcag aaagacgacc tggtagaaac ctgcattcgg ttaaaccacca	3000
	cgcacgttgc catgcagcgt acgaagaagg ccaagaacgg ccgcctggtg acggtatccg	3060
	agggtgaagc cttgattagc cgctacaaga tcgtaaagag cgaaaccggg cggccggagt	3120
30	acatcgagat cgagctagct gattggatgt accgcgagat cacagaaggc aagaaccggg	3180
	acgtgctgac ggttcacccc gattactttt tgatogatcc cggcatcggc cgttttctct	3240
35	accgcctggc acgccgcgcc gcaggcaagg cagaagccag atggttggtc aagacgatct	3300
	acgaacgcag tggcagcgcc ggagagttca agaagttctg tttcacctg cgcaagctga	3360
	tcgggtcaaa tgacctgccg gactacgatt tgaaggagga ggcggggcag gctggcccga	3420
40	tcctagtcat gcgctaccgc aacctgatcg agggcggaagc atccgccggg tcctaattgta	3480
	cggagcagat gctagggcaa attgccctag caggggaaaa aggtcgaaaa ggactctttc	3540
45	ctgtggatag cacgtacatt gggaaccaa agccgtacat tgggaaccgg aaccgtaca	3600
	ttgggaaccc aaagccgtac attgggaacc ggtcacacat gtaagtgact gatataaaag	3660
	agaaaaaagg cgatttttcc gcctaaaact ctttaaaact tattaanaact cttaaaaccc	3720
50	gcctggcctg tgcataactg tctggccagc gcacagccga agagctgcaa aaagcgccta	3780
	cccttcggtc gctgcgctcc ctacgccccg ccgcttcgcg tcggcctatc gcggccgctg	3840
55	gccgctcaaa aatggctggc ctacggccag gcaatctacc agggcgcgga caagccgcgc	3900
	cgtcgccact cgaccgccgg cggccacatc aaggcaccct gcctcgcgcg tttcgggtgat	3960
	gacgggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccgggtgacgg tcacagcttg tctgtaagcg	4020
60	gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc	4080

65

ES 2 930 456 T3

	gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat	4140
	cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	4200
5	ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg	4260
	tcgttcgggt gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	4320
	aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	4380
10	gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca	4440
	aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	4500
15	ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc	4560
	tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc	4620
	tcagttcgggt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc	4680
20	ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact	4740
	tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg	4800
25	ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg	4860
	tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca	4920
	aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgagaa	4980
30	aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	5040
	aaaactcacg ttaagggatt ttgggtcatgc attctaggtg attagaaaaa ctcatcgagc	5100
35	atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc	5160
	cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg	5220
	tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca	5280
40	aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcga ctgaatccgg tgagaatggc	5340
	aaaagtttat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctcgatcatc	5400
45	aatcactcg catcaaccaa accggttattc attcgtgatt gcgcctgagc gagtcgaaat	5460
	acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac	5520
	actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat	5580
50	gctgttttcc ctgggatcgc agtggtagt aacctgcat catcaggagt acggataaaa	5640
	tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct	5700
	gtaacatcat tggcaacgct acctttgcc a tgtttcagaa acaactctgg cgcacgggc	5760
55	ttcccataca atcggtagat tgtcgacact gattgcccga cattatcgcg agccattta	5820
	tacccatata aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gccttgagca agacgtttcc	5880
60	cgttgaatat ggctcataac agaacttatt atttccttcc tcttttctac agtatttaaa	5940
	gataccccaa gaagctaatt ataacaagac gaactccaat tcactgttcc ttgcattcta	6000

65

ES 2 930 456 T3

	aaaccttaaa taccagaaaa cagcttttttc aaagttgttt tcaaagttgg cgtataacat	6060
	agtatcgacg gagccgattt tgaaaccgcg gtgatcacag gcagcaacgc tctgtcatcg	6120
5	ttacaatcaa catgctaccc tccgcgagat catccgtgtt tcaaaccggg cagcttagtt	6180
	gccgttcttc cgaatagcat cggtaacatg agcaaagtct gccgccttac aacggctctc	6240
	ccgctgacgc cgtcccggac tgatgggctg cctgtatcga gtggtgattt tgtgccgagc	6300
10	tgccggtcgg ggagctgttg gctggctggg ggcaggatat attgtgggtg aaacataacg	6360
	aattcgtctc aggaggggtt tctggagttt aatgagctaa gcacatacgt cagaaacctat	6420
15	tattgcgcgt tcaaaagtcg cctaaggtca ctatcagcta gcaaatattt cttgtcaaaa	6480
	atgctccact gacgttccat aaattcccct cggtatccaa ttagagtctc atattcactc	6540
	tcaatccaaa taatctgcaa tggcaattac cttatccgca acttctttac ctatttccgc	6600
20	ccggatccgg gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc	6660
	acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc	6720
	ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc	6780
25	gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac	6840
	tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc	6900
30	tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac	6960
	gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagcacg	7020
	tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct	7080
35	cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt	7140
	cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg	7200
40	attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac	7260
	ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	7320
	tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg	7380
45	agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat	7440
	ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc	7500
50	ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca ccccgatcca	7560
	acacttacgt ttgcaacgct caagagcaaa tagaccacga acgccggaag gttgccgcag	7620
	cgtgtggatt gcgtctcaat tctctcttgc aggaatgcaa tgatgaatat gatactgact	7680
55	atgaaacttt gagggaatac tgccatgcac cgtcacctca taacgtgcat catgcatgcc	7740
	ctgacaacat ggaacatcgc tatttttctg aagaattatg ctcgttggag gatgtcgcgg	7800
60	caattgcagc tattgccaac atcgaactac ccctcacgca tgcattcatc aatattattc	7860

ES 2 930 456 T3

	atgcgggggaa aggcaagatt aatccaactg gcaaatcatc cagcgtgatt ggtaacttca	7920
	gttccagcga cttgattcgt tttggtgcta cccacgtttt caataaggac gagatggtgg	7980
5	agtaaagaag gagtgcgtcg aagcagatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag	8040
	attgaatcct gttgccggtc ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa	8100
	gcatgtaata attaacatgt aatgcatgac gttatztatg agatgggttt ttatgattag	8160
10	agtcccgcaa ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga	8220
	taaattatcg cgcgcggtgt catctatggt actagatcga cgctgtcagg agactagagc	8280
	caagctgac tcctttgccc cggagatcac catggacgac tttctctatc tctacgatct	8340
15	aggaagaaag ttcgacggag aaggtgacga taccatgttc accaccgata atgagaagat	8400
	tagcctcttc aatttcagaa agaattgctga cccacagatg gttagagagg cctacgcggc	8460
20	aggtctgac aagacgatct acccgagtaa taatctccag gagatcaaat accttcccaa	8520
	gaaggttaaa gatgcagtca aaagattcag gactaactgc atcaagaaca cagagaaaga	8580
	tatattttctc aagatcagaa gtactattcc agtatggacg attcaaggct tgcttcataa	8640
25	accaaggcaa gtaatagaga ttggagtctc taagaaagta gttcctactg aatcaaaggc	8700
	catggagtca aaaattcaga tgcaggatct aacagaactc gccgtgaaga ctggcgaaca	8760
30	gttcatacag agtccttttac gactcaatga caagaagaaa atcttcgtca acatggtgga	8820
	gcacgacact ctcgctctact ccaagaatat caaagataca gtctcagaag accaaagggc	8880
	tattgagact tttcaacaaa gggtaatata gggaaacctc ctcggtattcc attgccagc	8940
35	tatctgtcac ttcatacaaaa ggacagtaga aaaggaagggt ggcacctaca aatgccatca	9000
	ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc gacagtggtc ccaaagatgg	9060
40	acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacggt ccaaccacgt cttcaaagca	9120
	agtggtattga tgtgatatct cactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc	9180
	gcaagaccct tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggactc cggtattttt	9240
45	acaacaatac cacaacaaaa caaacaacaa acaacattac aattttactat tctagtcgaa	9300
	atgaaaatga tgaatggtga agatgctaata gatcaaatga tcaaagaaag cttcttcata	9360
	acacatggaa acccaatatt aacagtagaa gacacacatc cattaagacc tttctttgaa	9420
50	acttggagag agaaaatctt ttctaagaaa cctaaggcaa ttcttattat ttctggtcat	9480
	tgggaaactg ttaaacctac tgttaatgct gtccatatca atgatactat ccatgatattt	9540
55	gatgactatc ctgctgctat gtaccagttc aagtatccag ctcttgggga accagaattg	9600
	gcaagaaaag tagaggaaat tctgaaaaaa tcgggttttcg aaacggcgga aactgatcaa	9660
	aaacgtgggc ttgatcatgg tgcattgggt cctctaatagc taatgtatcc tgaggctgat	9720
60	ataccagtat gtcagctctc agttcagccg catttagatg gaacatacca ttacaactta	9780

65

ES 2 930 456 T3

	ggacgagcat	tggctccctt	gaaaaacgac	ggcgtattaa	tcattggttc	aggaagtgca	9840
	actcaccctt	tggatgaaac	tcctcattat	tttgatggag	ttgcaccttg	ggcagctgcc	9900
5	tttgattcat	ggcttcgtaa	agctctcatt	aatggaaggt	ttgaagaagt	gaatatatat	9960
	gaaagcaaag	caccaaattg	gaaattagca	catcctttcc	cagaacattt	ttatccattg	10020
	catgttgttc	ttggcgctgc	tggtgaaaaa	tggaaggcag	agcttattca	tagcagttgg	10080
10	gatcatggca	ccttgtgtca	tggctcctac	aagttcactt	cagcctaggc	ttggaatgga	10140
	tcttcgatcc	cgatcgttca	aacatttggc	aataaagttt	cttaagattg	aatcctgttg	10200
15	ccggtcttgc	gacgattatc	atataatttc	tgttgaatta	cgtaagcat	gtaataatta	10260
	acatgtaatg	catgacgtta	tttatgagat	gggtttttat	gattagagtc	ccgcaattat	10320
	acatttaata	cgcgatagaa	aacaaaatat	agcgcgcaaa	ctaggataaa	ttatcgcgcd	10380
20	cggtgtcatc	tatgttacta	gatcgggaa	tgccaaagcta	attcttgaag	acgaaagggc	10440
	ctcgtgatac	gcctattttt	atagggtta	gtcatgataa	taatggtttc	ttagacgtca	10500
25	gggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	acccctatct	gtttattttt	ctaaatacat	10560
	tcaaataatg	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata	atgggaccga	10620
	ctcgcgctgt	caggaggtgc	actgtcaa	tatgtcataa	attctaata	gatgagttta	10680
30	tatagcattt	acaaattcaa	atacttaaaa	aggatactac	aatttggtat	tacgtgtcaa	10740
	attcctgttc	aaagctgatg	ctagagggtg	cagaaatcat	atgcaagaac	gtcaaggcca	10800
35	ttcatttttg	ttcaacagat	tgatgaaaaa	tctaagagcc	tttgatcttg	agaagtaggt	10860
	aaccattaat	ttgtgttgaa	ggtttgctac	gaaaataaaa	aggatgtcac	gtgccatcaa	10920
	gttatagcta	cacgtgatta	ctatctacca	ttctccttta	gggttctcgt	ataaatactc	10980
40	tacaatcccc	atgcaaacca	taacacaata	taaaagatac	ttacacttgt	cacgtactac	11040
	ataaaaaaaaa	aaaaatacca	aacttttttc	aagcaaaaaa	tggatcatgc	aacattagca	11100
45	atgatactag	ccatttggtt	catttctttt	catttcataa	aattactttt	tagccaacaa	11160
	actaccaa	ttcttcctcc	tgggtccaaa	ccattgccaa	taattggtaa	catcttagaa	11220
	gttggtaaaa	aaccccatcg	ttcatttgct	aatcttgcta	aaattcacgg	ccctttaata	11280
50	tcgttacgtc	taggaagtgt	aacaactatt	gttgatatcat	cagcagatgt	agctaaagaa	11340
	atgttcttaa	aaaaagacca	ccctctttct	aaccgtacta	ttcctaattc	tgtcacggcc	11400
55	ggtgaccacc	ataaactcac	catgtcgtgg	ttgcccgttt	cgccgaaatg	gcggaatttt	11460
	cgtaagatta	cagccgtcca	tttgctttct	cctcaaagac	ttgatgcttg	ccaaaccttt	11520
	cgccatgcca	aggtgcaaca	gctttatgaa	tatgtacaag	aatgtgcaca	aaaaggccaa	11580
60	gctgttgata	ttggcaaagc	tgcatttact	acctccctta	atttgttatc	taaactattc	11640

65

ES 2 930 456 T3

	ttttcagtgg aattagccca ccataaatca cacacttctc aagagtttaa ggaactaata	11700
	tggaacatta tggaagatat tgggaaacct aattatgctg attattttcc tatttttaggc	11760
5	tgtgttgatc catcaggtat tcgtcgaaga ttagcatgta gttttgacaa gttgattgca	11820
	gtttttcagg gtataatatg tgaaaggcct gcgcctgatt cttcaactac aacaacaacg	11880
	acgactgatg atgtgctaga cgttcttctt cagctcttca aacaaaatga gctcactatg	11940
10	ggcgagatta accatttgct cgtcgacatt tttgatgctg gaacagacac tacatcaagt	12000
	acttttgagt gggcatgac agagttaatt aggaatcctg aaatgatgga aaaggctcaa	12060
	gaagaaatta agcaagtatt gggcaaagat aaacaaattc aggaatcaga cattattaac	12120
15	ctaccttact tacaagccat tatcaaagaa actttgcgac tacatccacc aactgtattt	12180
	cttttgcttc gtaaagccga cactgatggt gaactatatg gttatatgtt gcctaaagat	12240
20	gcacaaatac ttgttaactt atgggctatt ggaagagatc ctaatgcatg gcaaaatgct	12300
	gatatTTTTT cgcccgaaag atttataggg tgtgaaaytg atgtcaaagg aagagatttt	12360
	ggactcttac cttttggagc cggaagaagg atatgtcctg ggatgaattt ggccattaga	12420
25	atgttaactt tgatgctagc tactttactt caattcttca attggaagct tgaaggagac	12480
	ataagtccaa aagacttaga catggatgag aaatttggga ttgcgttaca aaagacaaag	12540
	cctttaaaac ttattccaat acctaggtat tgataataag cttcggccat gctagagtcc	12600
30	gcaaaaaatca ccagtctctc tctacaaatc tatctctctc tatttttctc cagaataatg	12660
	tgtgagtagt tccagataa ggggaattagg gttcttatag ggtttcgctc atgtgttgag	12720
35	catataagaa acccttagta tgtatttgta tttgtaaaat acttctatca ataaaatttc	12780
	taattcttaa aacccaaatc cagtgcctc gctgtcagga ggtcgacgag tcagtaataa	12840
	acggcgtcaa agtggttgca gccggcacac acgagtcgtg tttatcaact caaagcacia	12900
40	atacttttcc tcaacctaaa aataaggcaa ttagccaaaa acaactttgc gtgtaaaaa	12960
	cgctcaatac acgtgtcatt ttattattag ctattgcttc accgccttag ctttctcgtg	13020
45	acctagtcgt cctcgtcttt tcttcttctt cttctataaa acaataccca aagagctctt	13080
	cttcttcaca attcagattt caatttctca aaatcttaaa aactttctct caattctctc	13140
	taccgtgatc aaggtaaatt tctgtgttcc ttattctctc aaaatcttcg attttgtttt	13200
50	cgttcgatcc caatttcgta tatgttcttt ggtttagatt ctgttaatct tagatcgaag	13260
	acgattttct gggtttgatc gttagatata atcttaattc tcgattaggg tttcatagat	13320
	atcatcogat ttgttcaaat aatttgagtt ttgtogaata attactcttc gatttgtgat	13380
55	ttctatctag atctgggtgtt agtttctagt ttgtgcgac gaatttgtcg attaactctga	13440
	gtttttctga ttaacagaat gaccgccatt aaaatgaaca ccaatggtga aggtgaaaca	13500
60	caacatatatac taatgatacc tttcatggcg caagggcatt tacgtccttt ccttgagctt	13560

65

ES 2 930 456 T3

	gctatgtttc tatataaacg aagtcatttt atcattactc ttcttactac cccgctcaat	13620
	gcgggtttcc tacgacatct ccttcaccac catagctatt ctagctcggg gatcagaatt	13680
5	gtcgagttac ctttcaactc aaccaatcat ggtcttcacac ctggcattga aaacactgat	13740
	aaacttacac tcccacttgt agtatcactt tttcattcaa ccattttctct tgaccctcac	13800
	cttagagatt atatttcccg ccatttctcc cctgcgcgcc ctccctctgtg tgtcatacat	13860
10	gatgtgttcc ttggttgggt tgatcaagtt gctaaagacg tgggctcaac tgggtgtgtt	13920
	tttactacgg gtggcgcgta tgggtacaagc gcatatgtgt ccattttggaa tgatctgcct	13980
	caccagaatt actctgatga tcaagagttt ccgcttcctg gtttcccga gaatacataa	14040
15	ttccgacgtt ctcaacttca tcggtttctg aggtatgccg atggatcaga tgattggtcg	14100
	aaatatttcc aaccgcaatt gaggcaatca atgaagagtt ttggatggct atgtaattca	14160
20	gttgaggaaa tcgaaacact tgggttttagt atcctcagga actacactaa actaccatt	14220
	tggggtattg gaccgttgat agcttcacct gtacaacatt catcatctga taataacagt	14280
	actggtgccg agtttgttca atggttgagc ttgaaagaac cagattctgt attatacatc	14340
25	tcatttggat cacagaacac aatttcacca acccagatga tggaaactagc agccggtttg	14400
	gagtcaagtg agaagccgtt tttgtgggtg attcgagcac catttgggtt cgatatcaat	14460
30	gaggaaatga grccagaatg gctaccagag ggattcgagg agcgaatgaa ggtgaaaaaa	14520
	caaggaaaagt tgggtgtataa gttgggacca cagttggaga tacttaacca tgagtcaatc	14580
	ggaggggttct taactcattg tgggtggaat tcgatccttg agtcacttcg agaaggtgtg	14640
35	cctatgtagt ggtggccatt ggcagccgaa caagcttata atttgaagta tttggaggac	14700
	gaaatggggg ttgcagtcga gttagcgagg ggattggaag gagagataag taaagagaaa	14760
40	gtgaagagaa ttgtggagat gatthttagag agaaatgaag gaagtaaagg atgggaaatg	14820
	aaaaatagag cagtagaaat ggggaagaaa cttaaagacg ctgtcaatga ggagaaggaa	14880
	ctgaaggggt cttctgttaa ggcaatagat gatthtttag atgcggtcat gcaagctaag	14940
45	ttggaacctt ctcttcaata agcttcggcc atgctagagt ccgcaaaaat caccagtctc	15000
	tctctacaaa tctatctctc tctatthttc tccagaataa tgtgtgagta gttcccagat	15060
50	aagggaatta ggggttcttat aggggttctcg tcatgtgttg agcatataag aaacccttag	15120
	tatgtatttg tatttgtaaa atacttctat caataaaaatt tctaattcct aaaacaaaaa	15180
	tccagtgacc t	15191

55 <210> 22
 <211> 19 745
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> pX12
 <400> 22

65

ES 2 930 456 T3

	cgctgtcatg agaccggatc ctgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag	60
	cgtttatttag aataatcgga tattttaaag ggcgtgaaaa ggtttatccg ttcgtccatt	120
5	tgtatgtgca tgccaaccac agggttcccc tcgggatcaa agtactttga tccaaccct	180
	ccgctgctat agtgcagtcg gcttctgacg ttcagtgacg ccgtcatctg aaaacgacat	240
	gtcgcacaag tcctaagtta cgcgacaggc tgccgccttg cccttttcct ggcgttttct	300
10	tgtcgcgtgt tttagtcgca taaagtagaa tacttgcgac tagaaccgga gacattacgc	360
	catgaacaag agcgcgcgcg ctggcctgct gggctatgcc cgcgtcagca ccgacgacca	420
15	ggacttgacc aaccaacggg ccgaactgca cgcggcgggc tgcaccaagc tgttttccga	480
	gaagatcacc ggaccaggc gcgaccgcc ggagctggcc aggatgcttg accacctacg	540
	ccctggcgac gttgtgacag tgaccaggct agaccgcctg gccgcgagca cccgcgacct	600
20	actggacatt gccgagcgca tccaggaggc cggcgcgggc ctgcgtagcc tggcagagcc	660
	gtgggcccgc accaccacgc cggccggccg catggtgttg accgtgttcg ccggcattgc	720
25	cgagttcgag cgttccctaa tcatcgaccg caccgggagc gggcgcgagg ccgccaaggc	780
	ccgaggcgtg aagtttggcc cccgccctac cctcaccocg gcacagatcg cgcacgcccg	840
	cgagctgacg gaccaggaag gccgcaccgt gaaagaggcg gctgcactgc ttggcgtgca	900
30	tcgctcgacc ctgtaccgcg cacttgagcg cagcgaggaa gtgacgcca ccgaggccag	960
	gcggcgcggt gccttccgtg aggacgcatt gaccgaggcc gacgccctgg cggccgcccga	1020
35	gaatgaacgc caagaggaac aagcatgaaa ccgcaccagg acggccagga cgaaccgttt	1080
	ttcattaccg aagagatoga ggcggagatg atcgcgggcg ggtacgtgtt cgagccgccc	1140
	gcgcacctct caaccgtgcg gctgcatgaa atcctggccg gtttgtctga tgccaagctg	1200
40	gcgccctggc cggccagctt ggccgctgaa gaaaccgagc gccgccgtct aaaaagggtga	1260
	tgtgtatttg agtaaaacag cttgcgtcat gcggtcgctg cgtatatgat ccgatgagta	1320
45	aataaacaaa tacgcaaggg gaacgcatga aggttatcgc tgtacttaac cagaaaggcg	1380
	ggtcaggcaa gacgaccatc ggaaccatc tagcccgcg cctgcaactc gccggggccg	1440
	atgttctgtt agtcgattcc gatccccagg gcagtgcccg cgattgggcg gccgtgcggg	1500
50	aagatcaacc gctaaccgtt gtcggcatcg accgcccgc gattgaccgc gacgtgaagg	1560
	ccatcggccg gcgcgacttc gtagtgatcg acggagcgcc ccaggcggcg gacttggtg	1620
55	tgtcccgcat caaggcagcc gacttcgtgc tgattccggt gcagccaagc ccttacgaca	1680
	tatgggccac cgcgcacctg gtggagctgg ttaagcagcg cattgaggtc acggatggaa	1740
	ggctacaagc ggcctttgtc gtgtcgcggg cgatcaaagg cacgcgcatc ggcgggtgagg	1800
60		
65		

ES 2 930 456 T3

	ttgccgaggc gctggccggg tacgagctgc ccattcttga gtcccgtatc acgcagcgcg	1860
	tgagctaccc aggcaactgcc gccgccggca caaccgttct tgaatcagaa cccgagggcg	1920
5	acgctgcccc cgaggtccag gcgctggccg ctgaaattaa atcaaaactc atttgagtta	1980
	atgaggtaaa gagaaaatga gcaaaagcac aaacacgcta agtgccggcc gtccgagcgc	2040
	acgcagcagc aaggctgcaa cggtggccag cctggcagac acgccagcca tgaagcgggt	2100
10	caactttcag ttgccggcgg aggatcacac caagctgaag atgtacgcgg tacgccaagg	2160
	caagaccatt accgagctgc tatctgaata gatcgcgag ctaccagagt aaatgagcaa	2220
15	atgaataaat gagtagatga attttagcgg ctaaaggagg cggcatggaa aatcaagaac	2280
	aaccaggcac cgacgccgtg gaatgcccc tgtgtggagg aacgggcgggt tggccaggcg	2340
	taagcggctg ggttgtctgc cggccctgca atggcactgg aacccccaaag cccgaggaat	2400
20	cggcgtgacg gtgcgaaacc atccggcccc gtacaaatcg gcgcggcgct gggatgatgac	2460
	ctggtggaga agttgaaggc cgcgccaggcc gcccgaggc aacgcacga ggcagaagca	2520
	cgccccgggt aatcgaggca agcggcgct gatcgaaatc gcaagaatc ccggcaaccg	2580
25	ccggcagccg gtgcgccgtc gattaggaag ccgccaagg gcgacgagca accagatttt	2640
	ttcgttccga tgctctatga cgtgggcacc cgcgatagtc gcagcatcat ggacgtggcc	2700
30	gttttccgtc tgtcgaagcg tgaccgacga gctggcgagg tgatccgcta cgagcttcca	2760
	gacgggcacg tagaggtttc cgcagggccg gccggcatgg ccagtgtgtg ggattacgac	2820
	ctggtactga tggcggtttc ccatctaacc gaatccatga accgataccg ggaagggaag	2880
35	ggagacaagc ccggccgcgt gttccgtcca caggttgagg acgtactcaa gttctgcgg	2940
	cgagccgatg gcggaaagca gaaagacgac ctggtagaaa cctgcattcg gttaaacacc	3000
40	acgcacgttg ccatgcagcg tacgaagaag gccagaacg gccgcctggt gacggtatcc	3060
	gaggggtgaag ccttgattag ccgctacaag atcgtaaaga gcgaaaccgg gcggccggag	3120
	tacatcgaga tcgagctagc tgattggatg taccgcgaga tcacagaagg caagaaccgg	3180
45	gacgtgctga cggttcaccc cgattacttt ttgatcgatc ccggcatcgg ccgttttctc	3240
	taccgcctgg cagcccgcg cgcaggcaag gcagaagcca gatggttgtt caagacgac	3300
	tacgaacgca gtggcagcgc cggagagttc aagaagttct gtttcaccgt gcgcaagctg	3360
50	atcgggtcaa atgacctgcc ggagtacgat ttgaaggagg aggcggggca ggctggccc	3420
	atcctagtca tgcgctaccg caacctgatc gagggcgagg catccgcggg ttccctaattgt	3480
55	acggagcaga tgctagggca aattgcccta gcaggggaaa aaggtcgaaa aggactcttt	3540
	cctgtggata gcacgtacat tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg gaacccgtac	3600
60	attgggaacc caaagccgta cattgggaac cggtcacaca tgtaagtgc tgatataaaa	3660

ES 2 930 456 T3

	gagaaaaaag gcgatTTTTc cgcctaaaac tctttaaaac ttattaaaac tcttaaaacc	3720
	cgcttggcct gtgcataact gtctggccag cgcacagccg aagagctgca aaaagcgctt	3780
5	acccttcggt cgctgcgctc cctacgcccc gccgcttcgc gtcggcctat cgcggccgct	3840
	ggccgctcaa aaatggctgg cctacggcca ggcaatctac cagggcgcg gacaagccgcg	3900
	ccgtcgccac tcgaccgccc gcgcccacat caaggcacc tgcctcgcg gtttcggtga	3960
10	tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggtgacg gtcacagctt gtctgtaagc	4020
	ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg	4080
	cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca	4140
15	tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta	4200
	aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg	4260
20	gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca	4320
	gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaa gccagcaaaa ggccaggaac	4380
	cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	4440
25	aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg	4500
	tttcccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac	4560
30	ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat	4620
	ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag	4680
	cccgaaccgt gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac	4740
35	ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcgggt	4800
	gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatattggt	4860
	atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc	4920
40	aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga	4980
	aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac	5040
45	gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg cattctaggt gattatttgc cgactacctt	5100
	ggtgatctcg cctttcacgt agtggacaaa ttcttccaac tgatctgcgc gcgaggccaa	5160
	gcgatcttct tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg	5220
50	ggccggcagg cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttccggcgca ttttgccgggt	5280
	tactgcgctg taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca ttccgctcat caccagccca	5340
	gtcggggcggc gagttocata gcgttaaggt ttcatcttagc gcctcaaata gatcctgttc	5400
55	aggaaccgga tcaaagagtt cctccgcccgc tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct	5460
	tgcttttgtc agcaagatag ccagatcaat gtcgatcgtg gctggctcga agatacctgc	5520
60	aagaatgtca ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgccca	5580

65

ES 2 930 456 T3

	cggaatgatg tcgtcgtgca caacaatggg gactttctaca gcgcggagaa tctcgtctctc	5640
	tccaggggaa gccgaagttt ccaaaaggtc gttgatcaaa gctcgccgcg ttgtttcatc	5700
5	aagccttacg gtcaccgtaa ccagcaaadc aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc	5760
	cactgcggag ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggg tcgagatggc gctcgatgac	5820
	gccaaactacc tctgatagtt gagtcgatac ttcgggcgatc accgcttccc tcataatggt	5880
10	taactttggt ttagggcgac tgccctgctg cgtaacatcg ttgctgctcc ataacatcaa	5940
	acatcgaccc acggcgtaac gcgcttgctg cttgggatgcc cgaggcatag actgtacccc	6000
15	aaaaaaacag tcataacaag ccatgaaaac cgccactgcg ccgttaccac cgctgcgttc	6060
	ggtcaaggtt ctggaccagt tgcgtagagc catacgctac ttgcattaca gcttacgaac	6120
	cgaacaggct tatgtccact gggttcgtgc cttcatccgt ttccacgggtg tgcgtcaccc	6180
20	ggcaaccttg ggtagcagcg aagtcgaggg atttctgtcc tggctggaac agaacttatt	6240
	atttccttcc tcttttctac agtatctaaa gatacccaa gaagctaatt ataacaagac	6300
25	gaactccaat tcaactgttc ttgcattcta aaaccttaaa taccagaaaa cagctttttc	6360
	aaagttggtt tcaaagttgg cgtataacat agtatcgacg gagccgattt tgaaaccgcg	6420
	gtgatcacag gcagcaacgc tctgtcatcg ttacaatcaa catgctaccc tccgcgagat	6480
30	catccgtggt tcaaaccgag cagcttagtt gccgttcttc cgaatagcat cggtaacatg	6540
	agcaaagtct gccgccttac aacggctctc ccgctgacgc cgtcccgagc tgatgggctg	6600
35	cctgtatcga gtgggtgattt tgtgccgagc tgccggctcg ggagctgttg gctggctggt	6660
	ggcaggatat attgtggtgt aaacataacg gatccggtct caggagagcg tcgatctagt	6720
	aacatagatg acaccgcgcg cgataattta tcctagtttg cgcgctatat tttgttttct	6780
40	atcgcgattt aaatgtataa ttgcgggact ctaatcataa aaacccatct cataaataac	6840
	gtcatgcatt acatgttaat tattacatgc ttaacgtaat tcaacagaaa ttatatgata	6900
45	atcatcgcaa gaccggcaac aggattcaat cttaagaaac ttatttgcca aatgtttgaa	6960
	cgatctgctt cgacgcactc cttctttact ccaccatctc gtccttattg aaaacgtggg	7020
	tagcaccaaa acgaatcaag tcgctggaac tgaagttacc aatcacgctg gatgatttgc	7080
50	cagttggatt aatcttgctt ttccccgcat gaataatatt gatgaatgca tgcgtgaggg	7140
	gtagttcgat gttggcaata gctgcaattg ccgcgacatc ctccaacgag cataattctt	7200
	cagaaaaata gcgatgttcc atgttgctag ggcgatgatg atgcacgtta tgaggtgacg	7260
55	gtgctaggca gtattccctc aaagtttcat agtcagtatc atattcatca ttgcattcct	7320
	gcaagagaga attgagacgc aatccacacg ctgcggcaac cttccggcgt tcgtggtcta	7380
60	tttgctcttg gacgttgcaa acgtaagtgt tggatcgggg tgggcgaaga actccagcat	7440

65

ES 2 930 456 T3

	gagatccccg	cgctggagga	tcatccagcc	ggcgtcccgg	aaaacgattc	cgaagcccaa	7500
	cctttcatag	aaggcggcgg	tggaatcgaa	atctcgtgat	ggcaggttgg	gcgtcgcttg	7560
5	gtcggtcatt	tcgaacccca	gagtcccgt	cagaagaact	cgtcaagaag	gcgatagaag	7620
	gcgatgcgct	gcgaatcggg	agcggcgata	ccgtaaagca	cgaggaagcg	gtcagcccat	7680
	tcgccgccaa	gctcttcagc	aatatcacgg	gtagccaacg	ctatgtcctg	atagcgggtc	7740
10	gccacaccca	gccggccaca	gtcgatgaat	ccagaaaagc	ggccattttc	caccatgata	7800
	ttcggcaagc	aggcatcgcc	atgggtcacg	acgagatcct	cgccgtcggg	catgcgcgcc	7860
15	ttgagcctgg	cgaacagttc	ggctggcgcg	agcccctgat	gctcttcgtc	cagatcatcc	7920
	tgatcgacaa	gaccggcttc	catccgagta	cgtgctcgct	cgatgcgatg	tttcgcttgg	7980
	tggtcgaatg	ggcaggtagc	cggatcaagc	gtatgcagcc	gccgcattgc	atcagccatg	8040
20	atggatactt	tctcggcagg	agcaagggtga	gatgacagga	gatcctgccc	cggcacttcg	8100
	cccaatagca	gccagtccct	tcccgtttca	gtgacaacgt	cgagcacagc	tgcgcaagga	8160
	acgcccgtcg	tgccagccca	cgatagccgc	gctgcctcgt	cctgcagttc	attcagggca	8220
25	ccggacaggt	cggtcttgac	aaaaagaacc	gggcgcccct	gcgctgacag	ccggaacacg	8280
	gcggcatcag	agcagccgat	tgtctgttgt	gcccagtcac	agccgaatag	cctctccacc	8340
30	caagcgggccg	gagaacctgc	ccggatccgg	gcggaaatag	gtaaagaagt	tgcggataag	8400
	gtaattgccca	ttgcagatta	tttggtattga	gagtgaatat	gagactctaa	ttggataccg	8460
	aggggaattt	atggaacgtc	agtggagcat	ttttgacaag	aaatatattgc	tagctgatag	8520
35	tgaccttagg	cgacttttga	acgcgcaata	atggtttctg	acgtatgtgc	ttagctcatt	8580
	aaactccaga	aacctctccg	tcaggagact	agagccaagc	tgatctcctt	tgccccggag	8640
	atcaccatgg	acgactttct	ctatctctac	gatctaggaa	gaaagttcga	cggagaaggt	8700
40	gacgatacca	tggttcaccac	cgataatgag	aagattagcc	tcttcaattt	cagaaagaat	8760
	gctgaccac	agatggttag	agaggcctac	gcggcaggtc	tgatcaagac	gatctacccg	8820
45	agtaataatc	tccaggagat	caaatacctt	cccaagaagg	ttaaagatgc	agtcaaaaga	8880
	ttcaggacta	actgcatcaa	gaacacagag	aaagatatat	ttctcaagat	cagaagtact	8940
	attccagtat	ggacgattca	aggcttgctt	cataaaccaa	ggcaagtaat	agagattgga	9000
50	gtctctaaga	aagtagttcc	tactgaatca	aaggccatgg	agtcaaaaat	tcagatcgag	9060
	gatctaacag	aactcgccgt	gaagactggc	gaacagttca	tacagagtct	tttacgactc	9120
55	aatgacaaga	agaaaatctt	cgtcaacatg	gtggagcacg	acactctcgt	ctactccaag	9180
	aatatcaaag	atacagtctc	agaagaccaa	agggtatttg	agacttttca	acaaagggtta	9240
	atatcgggaa	acctcctcgg	attccattgc	ccagctatct	gtcacttcat	caaaaggaca	9300
60	gtagaaaagg	aagggtggcac	ctacaaatgc	catcattgcg	ataaaggaaa	ggctatcgtt	9360

65

ES 2 930 456 T3

	caagatgcct ctgccgacag tgggtcccaaa gatggacccc caccacagag gagcatcgtg	9420
	gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact	9480
5	gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga	9540
	agttcatthc atttgagag gactccggtg tttttacaac aataccacaa caaaacaaac	9600
	aacaaacaac attacaatth actatthctag tcgaaatgaa aatgatgaat ggtgaagatg	9660
10	ctaatgatca aatgatcaaa gaaagctthc tcataacaca tggaaaccca atattaacag	9720
	tagaagacac acatccatta agacctthc ttgaaacttg gagagagaaa atctthctg	9780
15	agaaacctaa ggcaatthc attatthctg gtcattggga aactgttaaa cctactgtta	9840
	atgctgtcca tatcaatgat actatccatg atthtgatga ctatcctgct gctatgtacc	9900
	agttcaagta tccagctcct ggggaaccag aattggcaag aaaagtagag gaaatthctg	9960
20	aaaaatcggg thtcgaaacg gcggaaactg atcaaaaacg tgggcttgat catggtgcat	10020
	gggtacctct aatgctaath tatcctgagg ctgatatacc agtatgtcag ctctcagthc	10080
25	agccgcattt agatggaaca taccattaca acttaggacg agcattggct cccttgaaaa	10140
	acgacggcgt attaatcatt ggttcaggaa gtgcaactca ccctthggat gaaactcctc	10200
	attatthtga tggagthtga cctthggcag ctgcctthtga thcatggctt cgtaaagctc	10260
30	tcattaatgg aaggthtga gaagtgaata tatatgaaag caaagcacca aattggaaat	10320
	tagcacatcc thtccagaa catththtct cattgcatgt tgttcttggc gctgctggtg	10380
35	aaaaatggaa ggcagagctt atthcatagca gthgggatca tggcaccttg tgtcatggct	10440
	cctacaagth cactthcagc taggctthga atggatctth gatcccgatc gthcaaacat	10500
	thggcaataa agththctta gattgaatcc tgttgccggt cthgcgacga thtatcatata	10560
40	atthctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatthtat	10620
	gagatgggtt thtatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgca tagaaaacaa	10680
	aatatagcgc gcaaaactag ataaattatc gcgdcgggtg tcatctatgt tactagatcg	10740
45	ggaattgcca agctaathc tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta ththtatagg	10800
	thaatgtcat gataataath gththcttaga cgtcaggtgg cactthtcgg ggaaatgtgc	10860
50	gcggaacccc taththttha thththctaa tacatthcaa tatgtatccg ctcatgagac	10920
	aataaccctg ataaatgctt caataatggg accgactcgc gctgtcagga gactagagcc	10980
	aagctgatct cctthgcccc ggagatcacc atggacgact thctctatct ctacgatcta	11040
55	ggaagaaagt tcgacggaga aggtgacgat accatgttca ccaccgataa tgagaagatt	11100
	agcctcttca atthcagaaa gaatgctgac ccacagatgg ttagagaggc ctacgcggca	11160
60	ggtctgatca agacgatcta cccgagtaat aatctccagg agatcaaata cththccaa	11220

65

ES 2 930 456 T3

	aagggttaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca tcaagaacac agagaaagat	11280
	atattttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga ttcaaggctt gcttcataaa	11340
5	ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aagaaagtag ttcctactga atcaaaggcc	11400
	atggagtcaa aaattcagat cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag	11460
	ttcatacaga gtctttttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag	11520
10	cacgacactc tcgtctactc caagaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct	11580
	attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct	11640
15	atctgtcact tcatcaaaag gacagtagaa aaggaagggtg gcacctacaa atgccatcat	11700
	tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtgggtcc caaagatgga	11760
	ccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa	11820
20	gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatocca ctatccttog	11880
	caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agaggactcc ggtattttta	11940
25	caacaatacc acaacaaaac aaacaacaaa caacattaca atttactatt ctagtcgaaa	12000
	tggatcatgc aacattagca atgatactag ccatttgggtt catttctttt catttcataa	12060
	aattactttt tagccaacaa actaccaaac ttcttctctc tgggtccaaaa ccattgccaa	12120
30	taattggtaa catcttagaa gttggtaaaa aaccccatcg ttcatttgct aatcttgcta	12180
	aaattcacgg ccctttaata tcgttacgtc taggaagtgt aacaactatt gttgtatcat	12240
	cagcagatgt agctaaagaa atgttcttaa aaaaagacca ccctctttct aaccgtacta	12300
35	ttcctaattc tgtcacggcc ggtgaccacc ataaactcac catgtcgtgg ttgccggtt	12360
	cgccgaaatg gcggaatttt cgtaagatta cagccgtcca tttgctttct cctcaaagac	12420
40	ttgatgcttg ccaaaccctt cgccatgcc aagtgcaaca gctttatgaa tatgtacaag	12480
	aatgtgcaca aaaaggccaa gctgttgata ttggcaaagc tgcatttact acctccctta	12540
	atgtgttatc taaactattc ttttcagtgg aattagccca ccataaatca cacacttctc	12600
45	aagagttaa ggaactaata tggaacatta tggaagatat tgggaaacct aattatgctg	12660
	attattttcc tatttttaggc tgtgttgatc catcaggat tctcgaaga ttagcatgta	12720
50	gttttgacaa gttgattgca gtttttcagg gtataatatg tgaaaggctt gcgcctgatt	12780
	cttcaactac aacaacaacg acgactgatg atgtgctaga cgttcttctt cagctcttca	12840
	aacaaaatga gctcactatg ggcgagatta accatttgct cgtcgacatt tttgatgctg	12900
55	gaacagacac tacatcaagt acttttgagt gggtcatgac agagttaatt aggaatcctg	12960
	aatgatgga aaaggctcaa gaagaaatta agcaagtatt gggcaaagat aaacaaattc	13020
	aggaatcaga cattattaac ctaccttact tacaagccat tatcaaagaa actttgcgac	13080
60	tacatccacc aactgtattt cttttgcctc gtaaagccga cactgatgtt gaactatatg	13140

65

ES 2 930 456 T3

	gttatattgt	gcctaaagat	gcacaaatac	ttgttaactt	atgggctatt	ggaagagatc	13200
	ctaatgcatg	gcaaaatgct	gatatttttt	cgcccgaag	atttataggg	tgtgaaaytg	13260
5	atgtcaaagg	aagagatttt	ggactcttac	cttttggagc	cggaagaagg	atatgtcctg	13320
	ggatgaatth	ggccattaga	atgttaactt	tgatgctagc	tactttactt	caattcttca	13380
	attggaagct	tgaaggagac	ataagtccaa	aagacttaga	catggatgag	aaatttggga	13440
10	ttgcgttaca	aaagacaaag	ccttttaaac	ttattccaat	acctagggtat	tgataataag	13500
	cttgctctca	agatcaaagg	cttaaaaagc	tgggggtttta	tgaatgggat	caaagtthct	13560
15	ttttttcttt	tatatttgct	tctccatttg	tttgthtcat	ttcccttttt	gttttctgtt	13620
	ctatgatgca	cttgtgtgtg	acaaactctc	tgggttttta	cttacgtctg	cgthtcaaaa	13680
	aaaaaaaccg	ctttcgttht	gcgtthttagt	cccattgttt	tgtagctctg	agtgatcgaa	13740
20	ttgatgcctc	thtatttcct	ttgttcccta	taattthctt	caaaactcag	aagaaaaacc	13800
	ttgaaactct	ttgcaatgtt	aatataagta	ttgtataaga	thttttattga	thtggttatt	13860
	agtcttactt	ttgctacctc	catcttcact	tggaaactgat	attctgaata	gttaaagcgt	13920
25	tacatgtctt	ccattcacaa	atgaacttaa	actagcacaa	agtcagatat	thtaagatcg	13980
	caccattthta	tataacccca	atcgtcaatt	ctactgtthc	aagthtttaca	ccaaaacaat	14040
30	tacgaggtgt	atctattcgt	tactctthtc	gcttattaat	cctthttacat	gatgcaaaat	14100
	ataacaaatt	aattthcaat	tgtcctgcac	atthtggtthta	tacatcttga	thccaaaaag	14160
	tcgctgtcag	gaggtcgacg	agtcagtaat	aaacggcgtc	aaagtggthg	cagccggcac	14220
35	acacgagtcg	tgtthtatcaa	ctcaaagcac	aaatacttht	cctcaaccta	aaaataaggc	14280
	aattagccaa	aaacaactth	gcgtgtaaac	aacgctcaat	acacgtgtca	thttattatt	14340
40	agctattgct	tcaccgcctt	agctthtctg	tgacctagtc	gtcctcgtct	thtctthctc	14400
	thtctctata	aaacaatacc	caaagagctc	thtctthtca	caattcagat	thcaattthct	14460
	caaaatctta	aaaactthct	ctcaattctc	tctaccgtga	tcaaggtaaa	thtctgtgtt	14520
45	ccttattctc	tcaaaatctt	cgattthgtt	thcgttcgat	cccaattthcg	tatatgtthct	14580
	thtggtthaga	thtctgttaat	cttagatcga	agacgattth	ctgggtthga	tcgttagata	14640
	tcattcttaat	tctcgattag	ggtthcatag	atatcatccg	atthgttcaa	ataatttgag	14700
50	thttgtcgaa	taattactct	tcgattthgtg	atthctatct	agatctggthg	thagtthtcta	14760
	gtthgtgcga	tcgaattthgt	cgattaatct	gagththtct	gattaacaga	atgaccgcca	14820
55	thaaaatgaa	caccaatggt	gaagggtgaaa	cacaacatat	actaatgata	cctthcatgg	14880
	cgcaagggca	thttacgtcct	thccttgagc	thgctatgtt	tctatataaa	cgaagtcatt	14940
60	thattcattac	thtctthtact	accccgctca	atgcgggtth	cctacgacat	ctcctthcacc	15000

65

ES 2 930 456 T3

	accatagcta	ttctagctcg	gggatcagaa	ttgtcgagtt	acctttcaac	tcaaccaatc	15060
	atggtcttcc	acctggcatt	gaaaacactg	ataaacttac	actoccactt	gtagtatcac	15120
5	tttttcattc	aaccatttct	cttgaccctc	accttagaga	ttatatctcc	cgccatttct	15180
	cccctgcgcg	ccctcctctg	tgtgtcatac	atgatgtggt	ccttggttgg	gttgatcaag	15240
	ttgctaaaga	cgtgggctca	actggtggtg	tttttactac	gggtggcgcg	tatggtacaa	15300
10	gcgcataatg	gtccatttgg	aatgatctgc	ctcaccagaa	ttactctgat	gatcaagagt	15360
	ttccgcttcc	tggtttcccg	gagaatcata	aattccgacg	ttctcaactt	catcggtttc	15420
	tgaggtatgc	cgatggatca	gatgattggt	cgaaatattt	ccaaccgcaa	ttgaggcaat	15480
15	caatgaagag	ttttggatgg	ctatgtaatt	cagttgagga	aatcgaaaca	cttgggttta	15540
	gtatcctcag	gaactacact	aaactaccca	tttgggggat	tggaccgttg	atagcttcac	15600
20	ctgtacaaca	ttcatcatct	gataataaca	gtactggtgc	cgagtttggt	caatggttga	15660
	gcttgaaaga	accagattct	gtattataca	tctcatttgg	atcacagAAC	acaatttcac	15720
	caaccagat	gatggaacta	gcagccggtt	tggagtcaag	tgagaagccg	tttttgtggg	15780
25	tgattcgagc	accatttggg	ttcgatatca	atgaggaaat	gagrcagaa	tggctaccag	15840
	agggattcga	ggagcgaatg	aaggtgaaaa	aacaaggaaa	gttgggtgat	aagttgggac	15900
	cacagttgga	gatacttaac	catgagtcaa	tcggaggggt	cttaactcat	tgtgggtgga	15960
30	attcgatcct	tgagtcaact	cgagaagggt	tgcctatggt	agggtggcca	ttggcagccg	16020
	aacaagctta	taatttgaag	tatttggagg	acgaaatggg	ggttgagtc	gagttagcga	16080
35	ggggattgga	aggagagata	agtaaagaga	aagtgaagag	aattgtggag	atgattttag	16140
	agagaaatga	aggaagtaaa	ggatgggaaa	tgaaaaatag	agcagtagaa	atggggaaga	16200
	aacttaaaga	cgctgtcaat	gaggagaagg	aactgaaggg	ttcttctggt	aaggcaatag	16260
40	atgatttctt	agatgcgggt	atgcaagcta	agttggaacc	ttctcttcaa	taagcttcgg	16320
	ccatgctaga	gtccgcaaaa	atcaccagtc	tctctctaca	aatctatctc	tctctatttt	16380
	tctccagaat	aatgtgtgag	tagttcccag	ataagggaa	tagggttctt	atagggtttc	16440
45	gctcatgtgt	tgagcatata	agaaaccctt	agtatgtatt	tgtatttgta	aaatacttct	16500
	atcaataaaa	tttctaattc	ctaaaaccaa	aatccagtga	cctcgctgtc	aggagactag	16560
50	agccaagctg	atctcctttg	ccccggagat	caccatggac	gactttctct	atctctacga	16620
	tctaggaaga	aagttcgacg	gagaagggtga	cgataccatg	ttcaccaccg	ataatgagaa	16680
	gattagcctc	ttcaatttca	gaaagaatgc	tgaccacacag	atggttagag	aggcctacgc	16740
55	ggcaggtctg	atcaagacga	tctacccgag	taataatctc	caggagatca	aataccttcc	16800
	caagaagggt	aaagatgcag	tcaaaagatt	caggactaac	tgcatacaaga	acacagagaa	16860
60	agatatattt	ctcaagatca	gaagtactat	tccagtatgg	acgattcaag	gcttgcttca	16920

65

ES 2 930 456 T3

	taaaccaagg	caagtaatag	agattggagt	ctctaagaaa	gtagttccta	ctgaatcaaa	16980
	ggccatggag	tcaaaaattc	agatcgagga	tctaacagaa	ctcgccgtga	agactggcga	17040
5	acagttcata	cagagtcttt	tacgactcaa	tgacaagaag	aaaatcttcg	tcaacatggt	17100
	ggagcacgac	actctcgtct	actccaagaa	tatcaaagat	acagtctcag	aagaccaaaag	17160
	ggctattgag	acttttcaac	aaagggtaat	atcgggaaac	ctcctcggat	tccattgccc	17220
10	agctatctgt	cacttcatca	aaaggacagt	agaaaaggaa	ggtggcacct	acaaatgcca	17280
	tcattgcgat	aaaggaaagg	ctatcgttca	agatgcctct	gccgacagtg	gtcccaaaga	17340
15	tggaccccca	cccacgagga	gcatcgtgga	aaaagaagac	gttccaacca	cgtcttcaaa	17400
	gcaagtggat	tgatgtgata	tctccactga	cgtaagggat	gacgcacaat	cccactatcc	17460
	ttcgcaagac	ccttcctcta	tataaggaag	ttcatttcat	ttggagagga	ctccggtatt	17520
20	tttacaacaa	taccacaaca	aaacaaacaa	caaacaacat	tacaatttac	tattctagtc	17580
	gaaatggata	acgcaacact	tgctgtgatc	ctttccattt	tgtttgtgtt	ttaccacatt	17640
	ttcaaatcct	ttttcaccaa	ttcttcatct	cgtaggcttc	ctcctggtcc	caaaccctg	17700
25	ccaatttttg	gcaacatttt	cgatcttggc	gaaaagcctc	atcgatcttt	tgccaatcta	17760
	tctaaaattc	acggcccttt	gattagccta	aagttaggaa	gtgtaacaac	tattgttgtt	17820
30	tcctcggcct	ctgtggccga	ggaaatgttc	cttaaaaaatg	accaagcact	tgctaaccga	17880
	accattcctg	actcggttag	ggctgggtgac	cacgacaaat	tatccatgtc	gtggttgccct	17940
	gtttcccaaa	aatggagaaa	tatgagaaaa	atctccgctg	tccaattact	ctccaaccaa	18000
35	aaacttgatg	ctagtcaacc	tcttagacaa	gctaagggtga	aacaactttt	atcatacgta	18060
	caagtttgtt	ccgaaaaaat	gcaaccctgc	gatattggac	gggccgcatt	tacaacgtca	18120
40	cttaatttat	tatcaaacac	atttttctca	atcgaattag	caagtcatga	atctagtgtc	18180
	tccaagagt	ttaaacaact	catgtggaat	attatggagg	aaattggaag	gcctaattat	18240
	gctgattttt	tcctatttct	tggttacatt	gatccctttg	gtataagacg	tcgtttggct	18300
45	ggttactttg	ataaactcat	tgatgttttc	caagacatta	ttcgtgaaag	acaaaagctt	18360
	cgatcttcta	attcttccgg	cgcaaaacaa	acaaatgaca	ttcttgatac	tcttcttaaa	18420
50	ctccatgaag	ataatgagtt	gagtatgcct	gaaattaatc	accttctcgt	ggatatcttt	18480
	gacgccgga	cagacacaac	agcaagcaca	ttagaatggg	caatggccga	acttggtgaa	18540
	aaccgggaaa	tgatgactaa	agttcaaatt	gaaatcgaac	aagctcttgg	aaaagattgc	18600
55	ttagacatac	aagaatccga	catctcaaaa	ctaccttatt	tacaagccat	tataaaaagaa	18660
	acgttacgtt	tacaccctcc	tactgtgttt	ttgctgcctc	gaaaggcaga	caatgacgta	18720
60	gagttatatg	gctacgttgt	accaaagaat	gctcaagtcc	ttgtcaatct	ttgggcaatt	18780

65

ES 2 930 456 T3

	ggtcgtgatc caaaggtatg gaaaaatccg gaagtatddd ctcccgaaag gtttttagat	18840
	tgcaatatcg attataaagg acgagatttc gaacttttac cctttggtgc tggtagaagg	18900
5	atatgccctg gacttacttt ggcatataga atgttgaact tgatgttggc tactcttctt	18960
	caaaactaca attggaaaact tgaagatggt atcaatccta aggattttaga catggatgag	19020
	aaatttgggg ttacattgca aaagggttaa cctcttcaag ttattccagt tcccagaaac	19080
10	taggcttgct ctcaagatca aaggcttaaa aagctggggg tttatgaatg ggatcaaagt	19140
	ttcttttttt cttttatatt tgcttctcca tttgtttggt tcatttccct ttttgttttc	19200
15	gtttctatga tgcacttggt tgtgacaaac tctctgggtt tttacttacg tctgcgtttc	19260
	aaaaaaaa accgctttcg ttttgcggtt tagtccatt gttttgtagc tctgagtgat	19320
	cgaattgatg cctctttatt ccttttggtc cctataattt ctttcaaac tcagaagaaa	19380
20	aaccttgaaa ctctttgcaa tgttaataa agtattgtat aagattttta ttgatttggg	19440
	tattagtctt acttttgcta cctccatctt cacttggaac tgatattctg aatagttaaa	19500
25	gcgttacatg tcttccattc acaaatgaac ttaaaactagc acaaagtcag atattttaag	19560
	atcgcaccat tttatataac cccaatcgtc aattctactg tttcaagttt tacaccaaaa	19620
	caattacgag gtgtatctat tcgttactct tttcgcttat taatcctttt acatgatgca	19680
30	aaatataaca aattaatttc aaattgtcct gcacatttgg tttatacatc ttgattccaa	19740
	aaagt	19745
35	<210> 23 <211> 13 992 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> pX13	
40	<400> 23	
	cgctgtcatg agacgaattc tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc	60
45	gtttattaga ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatccgt tcgtccattt	120
	gtatgtgcat gccaaaccaca gggttccctt cgggatcaaa gtactttgat ccaaccctc	180
50	cgctgtcata gtgcagtcgg cttctgacgt tcagtgacgc cgtcatctga aaacgacatg	240
	tcgcacaagt cctaagttac gcgacaggct gccgccctgc ccttttcctg gcgttttctt	300
	gtcgcgtggt ttagtcgcat aaagtagaat acttgcgact agaaccggag acattacgcc	360
55	atgaacaaga gcgccgccgc tggcctgctg ggctatgccg gcgtcagcac cgacgaccag	420
	gacttgacca accaacgggc cgaactgcac gcggccgggt gcaccaagct gttttccgag	480
60	aagatcaccg gcaccaggcg cgaccgcccg gagctggcca ggatgcttga ccacctacgc	540
	cctggcgacg ttgtgacagt gaccaggcta gaccgcctgg cccgcagcac ccgcgacctt	600

65

ES 2 930 456 T3

	ctggacattg	ccgagcgc	ccaggaggcc	ggcgcgggcc	tgcgtagcct	ggcagagccg	660
	tgggcccaca	ccaccacgcc	ggccggccgc	atggtgttga	ccgtgttcgc	cggcattgcc	720
5	gagttcgagc	gttcccta	catcgaccgc	acccggagcg	ggcgcgaggc	cgccaaaggcc	780
	cgaggcgtga	agtttgcccc	ccgccctacc	ctcaccgccg	cacagatcgc	gcacgccccgc	840
	gagctgatcg	accaggaagg	ccgcaccgtg	aaagaggcgg	ctgcactgct	tggcgtgcat	900
10	cgctcgaccc	tgtaccgcgc	acttgagcgc	agcgaggaag	tgacgcccac	cgaggccagg	960
	cggcgcggtg	ccttccgtga	ggacgcattg	accgaggccg	acgccctggc	ggccgcccag	1020
15	aatgaacgcc	aagaggaaca	agcatgaaac	cgcaccagga	cggccaggac	gaaccgtttt	1080
	tcattaccga	agagatcgag	gcggagatga	tcgcggccgg	gtacgtgttc	gagccgcccg	1140
	cgcacctctc	aaccgtgcgg	ctgcatgaaa	tcctggccgg	tttgtctgat	gccaaagctgg	1200
20	cggcctggcc	ggccagcttg	gccgctgaag	aaaccgagcg	ccgccgtcta	aaaaggtgat	1260
	gtgtatttga	gtaaaacagc	ttgcgtcatg	cggtcgctgc	gtatatgatc	cgatgagtaa	1320
25	ataaaciaat	acgcaagggg	aacgcatgaa	ggttatcgct	gtacttaacc	agaaaggcgg	1380
	gtcaggcaag	acgaccatcg	gaacccatct	agcccgcgcc	ctgcaactcg	ccggggccga	1440
	tgttctgtta	gtcgattccg	atccccaggg	cagtgcccg	gattgggcgg	ccgtgcccga	1500
30	agatcaaccg	ctaaccgttg	tcggcatcga	ccgcccgacg	attgaccgcg	acgtgaaggc	1560
	catcgcccg	cgcgacttcg	tagtgatcga	cggagcgccc	caggcgccgg	acttggctgt	1620
35	gtccgcgatc	aaggcagccg	acttcgtgct	gattccgggt	cagccaagcc	cttacgacat	1680
	atgggccacc	gccgacctgg	tggagctggt	taagcagcgc	attgaggtca	cggatggaag	1740
	gctacaagcg	gcctttgtcg	tgtcgcgggc	gatcaaaggc	acgcgcatcg	gcggtgaggt	1800
40	tgccgaggcg	ctggccgggt	acgagctgcc	cattcttgag	tcccgtatca	cgcagcgcgt	1860
	gagctacca	ggcactgccg	ccgccggcac	aaccgttctt	gaatcagaac	ccgagggcga	1920
45	cgctgcccg	gaggtccagg	cgctggccgc	tgaataaaa	tcaaaactca	tttgagttaa	1980
	tgaggtaaag	agaaaatgag	caaaagcaca	aacacgctaa	gtgccggccg	tccgagcgca	2040
	cgcagcagca	aggctgcaac	gttggccagc	ctggcagaca	cgccagccat	gaagcgggtc	2100
50	aactttcagt	tgccggcgga	ggatcacacc	aagctgaaga	tgtacgcggt	acgccaaggc	2160
	aagaccatta	ccgagctgct	atctgaatag	atcgcgcagc	taccagagta	aatgagcaaa	2220
55	tgaataaatg	agtagatgaa	ttttagcggc	taaaggaggc	ggcatggaaa	atcaagaaca	2280
	accaggcacc	gacgccgtgg	aatgccccat	gtgtggagga	acgggcgggt	ggccaggcgt	2340
	aagcggctgg	gttgtctgcc	ggccctgcaa	tggcactgga	acccccaagc	ccgaggaatc	2400
60	ggcgtgacgg	tcgcaaacca	tccggcccg	tacaaatcgg	cgcggcgctg	ggtgatgacc	2460

ES 2 930 456 T3

	tggtggagaa gttgaaggcc gcgcaggccg cccagcggca acgcatcgag gcagaagcac	2520
	gccccggtga atcgtggcaa gcggccgctg atcgaatccg caaagaatcc cggcaaccgc	2580
5	cggcagccgg tgcgccgtcg attaggaagc cgcccaaggg cgacgagcaa ccagatTTTT	2640
	tcgttccgat gctctatgac gtgggcaccc gcgatagtcg cagcatcatg gacgtggccg	2700
	ttttccgtct gtcgaagcgt gaccgacgag ctggcgaggt gatccgctac gagcttccag	2760
10	acgggcacgt agaggtttcc gcagggccgg ccggcatggc cagtgtgtgg gattacgacc	2820
	tggtactgat ggcggtttcc catctaaccg aatccatgaa ccgataccgg gaagggaagg	2880
	gagacaagcc cggccgcgtg ttccgtccac acgttgcgga cgtactcaag ttctgccggc	2940
15	gagccgatgg cggaaagcag aaagacgacc tggtagaaac ctgcattcgg ttaaacacca	3000
	cgcacgttgc catgcagcgt acgaagaagg ccaagaacgg ccgcctggtg acggtatccg	3060
20	agggtgaagc cttgattagc cgctacaaga tcgtaaagag cgaaaccggg cggccggagt	3120
	acatcgagat cgagctagct gattggatgt accgcgagat cacagaaggc aagaaccggg	3180
	acgtgctgac ggttcacccc gattactttt tgatcgatcc cggcatcggc cgttttctct	3240
25	accgcctggc acgcgcgcgc gcaggcaagg cagaagccag atggttggtc aagacgatct	3300
	acgaacgcag tggcagcgcc ggagagttca agaagttctg tttcacctg cgcaagctga	3360
30	tcgggtcaaa tgacctgccg gagtacgatt tgaaggagga ggcggggcag gctggccga	3420
	tcctagtcac gcgctaccgc aacctgatcg agggcgaagc atccgcgggt tcctaatagta	3480
	cggagcagat gctagggcaa attgccctag caggggaaaa aggtcgaaaa ggactctttc	3540
35	ctgtggatag cacgtacatt gggaacccaa agccgtacat tgggaaccgg aaccctgaca	3600
	ttgggaaccc aaagccgtac attgggaacc ggtcacacat gtaagtgact gatataaaag	3660
	agaaaaaagg cgatTTTTcc gcctaaaact ctttaaaact tattaanaact cttaaaaccc	3720
40	gcctggcctg tgcataactg tctggccagc gcacagccga agagctgcaa aaagcgccta	3780
	cccttcggtc gctgcgtccc ctacgccccg ccgcttcgcg tcggcctatc gcggccgctg	3840
45	gccgctcaaa aatggctggc ctacggccag gcaatctacc agggcgcgga caagccgcgc	3900
	cgtcgccact cgaccgccgg cgcacacatc aaggcaccct gcctcgcgcg tttcggtgat	3960
	gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggtgacgg tcacagcttg tctgtaagcg	4020
50	gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgggcg gtgtcggggc	4080
	gcagccatga cccagtcacg tagcgatagc ggagtgata ctggcttaac tatgcggcat	4140
55	cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	4200
	ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg ctgcgctcgg	4260
	tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	4320
60	aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	4380

65

ES 2 930 456 T3

	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	4440
	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	acccgacagg	actataaaga	taccaggcgt	4500
5	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	4560
	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggatc	4620
10	tcagttcggg	gtaggtcggt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	cccgttcagc	4680
	ccgaccgctg	cgccttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccgggta	agacacgact	4740
	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggat	gtaggcgggtg	4800
15	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	gtatttggtg	4860
	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	4920
20	aacaaaccac	cgctggtagc	ggtgggtttt	ttgtttgcaa	gcagcagatt	acgcgcagaa	4980
	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	gtctgacgct	cagtggaaacg	5040
	aaaactcacg	ttaagggtat	ttgggtcatgc	attctaggtg	attagaaaaa	ctcatcgagc	5100
25	atcaaataaa	actgcaattt	attcatatca	ggattatcaa	taccatattt	ttgaaaaagc	5160
	cgtttctgta	atgaaggaga	aaactcaccg	aggcagttcc	ataggatggc	aagatcctgg	5220
30	tatcgggtctg	cgattccgac	tcgtccaaca	tcaatacaac	ctattaattt	cccctcgtca	5280
	aaaataaggt	tatcaagtga	gaaatcacca	tgagtgcaga	ctgaatccgg	tgagaatggc	5340
	aaaagtttat	gcattttctt	ccagacttgt	tcaacaggcc	agccattacg	ctcgtcatca	5400
35	aatcactcgc	catcaaccaa	accgttatcc	attcgtgatt	gcgcctgagc	gagtcgaaat	5460
	acgcgatcgc	tggtaaaagg	acaattacaa	acaggaatcg	aatgcaaccg	gcgcaggaac	5520
40	actgccagcg	catcaacaat	attttcacct	gaatcaggat	attcttctaa	tacctggaat	5580
	gctgttttcc	ctgggatcgc	agtggtgagt	aaccatgcat	catcaggagt	acggataaaa	5640
	tgcttgatgg	tcggaagagg	cataaattcc	gtcagccagt	ttagtctgac	catctcatct	5700
45	gtaacatcat	tggcaacgct	acctttgcc	tgtttcagaa	acaactctgg	cgcacggggc	5760
	ttcccataca	atcggtagat	tgtcgcacct	gattgcccga	cattatcgcg	agcccattta	5820
	taccatata	aatcagcatc	catgttgga	tttaatcgcg	gccttgagca	agacgtttcc	5880
50	cgttgaatat	ggctcataac	agaacttatt	atttccttcc	tcttttctac	agtattttaa	5940
	gataccccaa	gaagctaatt	ataacaagac	gaactccaat	tcactgttcc	ttgcattcta	6000
55	aaaccttaaa	taccagaaaa	cagctttttc	aaagttgttt	tcaaagttgg	cgtataacat	6060
	agtatcgacg	gagccgattt	tgaaaccgcg	gtgatcacag	gcagcaacgc	tctgtcatcg	6120
	ttacaatcaa	catgctaccc	tccgcgagat	catccgtgtt	tcaaaccggg	cagcttagtt	6180
60	gccgttcttc	cgaatagcat	cggtaacatg	agcaaagtct	gccgccttac	aacggctctc	6240

65

ES 2 930 456 T3

	ccgctgacgc cgtcccgga c tgatgggctg cctgtatcga gtggtgattt tgtgccgagc	6300
	tgccggctcg ggagctgttg gctggctggg ggcaggatat attgtgggtg aaacataacg	6360
5	aattcgtctc aggagagcgt cgatctagta acatagatga caccgcgcgc gataatttat	6420
	cctagtttgc gcgctatatt ttgttttcta tcgcgtatta aatgtataat tgcgggactc	6480
	taatcataaa aacccatctc ataaataacg tcatgcatta catgttaatt attacatgct	6540
10	taacgtaatt caacagaaat tatatgataa tcatcgcaag accggcaaca ggattcaatc	6600
	ttaagaaact ttattgcaa atgtttgaac gatctgcttc gacgcactcc ttctttactc	6660
	caccatctcg tccttattga aaacgtgggt agcaccaaaa cgaatcaagt cgctggaact	6720
15	gaagttagca atcacgctgg atgatttgcc agttggatta atcttgccct tccccgcag	6780
	aataatattg atgaatgcat gcgtgagggg tagttcgatg ttggcaatag ctgcaattgc	6840
20	cgcgacatcc tccaacgagc ataattcttc agaaaaatag cgatgttcca tgttgtcagg	6900
	gcatgcatga tgcacgttat gaggtgacgg tgctaggcag tattccctca aagtttcata	6960
	gtcagtatca tattcatcat tgcattcctg caagagagaa ttgagacgca atccacacgc	7020
25	tgccggcaacc ttccggcggt cgtgggtctat ttgctcttgg acgttgcaaa cgtaagtgtt	7080
	ggatcggggt gggcgaagaa ctccagcatg agatccccgc gctggaggat catccagccg	7140
	gcgtcccga aaacgattcc gaagcccaac ctttcataga aggcggcggt ggaatcgaaa	7200
30	tctcgtgatg gcaggttggg cgtcgcttgg tcggtcattt cgaacccag agtcccgctc	7260
	agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcgga gcggcgatac	7320
35	cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccag ctcttcagca atatcacggg	7380
	tagccaacgc tatgtcctga tagcgggtcc ccacaccag ccggccacag tcgatgaatc	7440
	cagaaaagcg gccattttcc accatgatat tcggcaagca ggcacgcca tgggtcacga	7500
40	cgagatcctc gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctggcgca	7560
	gccctgatg ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac	7620
45	gtgctcgctc gatgcgatgt ttcgcttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg	7680
	tatgcagccg ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctccggcagga gcaaggtag	7740
	atgacaggag atcctgcccc ggcacttcgc ccaatagcag ccagtccctt cccgcttcag	7800
50	tgacaacgtc gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgctcg gccagccac gatagccgcg	7860
	ctgcctcgtc ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg	7920
	ggcgccctcg cgctgacagc cggaacacgg cggcacatcaga gcagccgatt gtctgttgtg	7980
55	cccagtcata gccgaatagc ctctccaccc aagcggccgg agaacctgcc cggatccggg	8040
	cggaaatagg taaagaagtt gcggataagg taattgccat tgcagattat ttggattgag	8100
60	agtgaatatg agactctaatt tggataccga ggggaattta tggaacgtca gtggagcatt	8160

65

ES 2 930 456 T3

	tttgacaaga aatatttgct agctgatagt gaccttaggc gacttttgaa cgcgcaataa	8220
	tggtttctga cgtatgtgct tagctcatta aactccagaa acccctccgt caggagacta	8280
5	gagccaagct gatctccttt gcccgggaga tcaccatgga cgactttctc tatctctacg	8340
	atctaggaag aaagttcgac ggagaaggtg acgataccat gttcaccacc gataatgaga	8400
	agattagcct cttcaatttc agaaagaatg ctgaccacac gatgggttaga gaggcctacg	8460
10	cggcaggtct gatcaagacg atctaccoga gtaataatct ccaggagatc aaataccttc	8520
	ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa ctgcatcaag aacacagaga	8580
15	aagatatatt tctcaagatc agaagtacta ttccagtatg gacgattcaa ggcttgcttc	8640
	ataaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaagaa agtagttcct actgaatcaa	8700
	aggccatgga gtcaaaaatt cagatcgagg atctaacaga actcgccgtg aagactggcg	8760
20	aacagttcat acagagtctt ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg	8820
	tggagcacga cactctcgtc tactccaaga atatcaaaga tacagtctca gaagaccaa	8880
	gggctattga gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa cctcctcgga ttccattgcc	8940
25	cagctatctg tcacttcac caaaaggacag tagaaaagga aggtggcacc taaaaatgcc	9000
	atcattgcga taaaggaaag gctatcgctc aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag	9060
30	atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa	9120
	agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa tcccactatc	9180
	cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagagg actccggtat	9240
35	ttttacaaca ataccacaac aaaacaaaca acaacaaca ttacaattta ctattctagt	9300
	cgaatgaaa atgatgaatg gtgaagatgc taatgatcaa atgatcaaag aaagcttctt	9360
	cataacacat ggaacccaa tattaacagt agaagacaca catccattaa gaccttctt	9420
40	tgaaacttgg agagagaaaa tcttttctaa gaaacctaag gcaattctta ttatttctgg	9480
	tcattgggaa actgttaaac ctactgttaa tgctgtccat atcaatgata ctatccatga	9540
45	ttttgatgac tatcctgctg ctatgtacca gttcaagtat ccagctcctg gggaaccaga	9600
	attggcaaga aaagtagagg aaattctgaa aaaatcgggt ttcgaaacgg cggaactga	9660
	tcaaaaacgt gggcttgatc atggtgcatg ggtacctcta atgctaattg atcctgaggc	9720
50	tgatatacca gtatgtcagc tctcagttca gccgcattta gatggaacat accattacaa	9780
	cttaggacga gcattggctc ccttgaaaaa cgacggcgta ttaatcattg gttcaggaag	9840
	tgcaactcac cctttggatg aaactcctca ttattttgat ggagttgcac cttgggcagc	9900
55	tgcccttgat tcatggcttc gtaaagctct cattaatgga aggtttgaag aagtgaatat	9960
	atatgaaagc aaagcaccaa attggaaatt agcacatcct ttcccagaac atttttatcc	10020
60		
65		

ES 2 930 456 T3

	attgcatggt gttcttggcg ctgctggtga aaaatggaag gcagagctta ttcatagcag	10080
	ttgggatcat ggcaccttgt gtcattggctc ctacaagttc acttcagcct aggcttggaa	10140
5	tggatcttcg atcccgatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct	10200
	gttgccggtc ttgcgacgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata	10260
	attaacatgt aatgcatgac gttatttatg agatgggttt ttatgattag agtcccgcaa	10320
10	ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg	10380
	cgcdcggtgt catctatgtt actagatcgg gaattgccaa gctaattctt gaagacgaaa	10440
15	gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac	10500
	gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaacctt atttgtttat ttttctaaat	10560
	acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataacctga taaatgcttc aataatggga	10620
20	ccgactcgcg ctgtcaggag actagagcca agctgatctc ctttgccccg gagatcacca	10680
	tggacgactt tctctatctc tacgatctag gaagaaagtt cgacggagaa ggtgacgata	10740
	ccatgttcac caccgataat gagaagatta gcctcttcaa tttcagaaag aatgctgacc	10800
25	cacagatggt tagagaggcc tacgcggcag gtctgatcaa gacgatctac ccgagtaata	10860
	atctccagga gatcaaatac cttcccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga	10920
30	ctaactgcat caagaacaca gagaaagata tattttctcaa gatcagaagt actattccag	10980
	tatggacgat tcaaggcttg cttcataaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta	11040
	agaaagtagt tctactgaa tcaaaggcca tggagtcaaa aattcagatc gaggatctaa	11100
35	cagaactcgc cgtgaagact ggccaacagt tcatacagag tcttttacga ctcaatgaca	11160
	agaagaaaat cttcgtcaac atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca	11220
40	aagatacagt ctacagaagc caaagggtta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg	11280
	gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcaaaagg acagtagaaa	11340
	aggaagggtg cacctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg	11400
45	cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc gtggaaaaag	11460
	aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa	11520
	gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagaccttc ctctatataa ggaagttcat	11580
50	ttcatttgga gaggactccg gtatttttac aacaatacca caacaaaaca aacaacaaac	11640
	aacattacaa tttactattc tagtcgaaat ggataacgca acacttgctg tgatcctttc	11700
55	cattttgttt gtgttttacc acattttcaa atcctttttc accaattctt catctcgtag	11760
	gcttcctcct ggtcccaaac ccgtgccaat ttttggcaac attttcgatc ttggcgaaaa	11820
	gcctcatcga tcttttgcca atctatctaa aattcacggc cctttgatta gcctaagttt	11880
60	aggaagtgta acaactattg ttgtttcctc ggccctctgtg gccgaggaaa tgttccttaa	11940

65

ES 2 930 456 T3

	aaatgaccaa gcacttgcta accgaaccat tcctgactcg gttagggctg gtgaccacga	12000
	caaattatoc atgtcgtggt tgcctgtttc ccaaaaatgg agaaatatga gaaaaatctc	12060
5	cgctgtccaa ttactctcca accaaaaact tgatgctagt caacctctta gacaagctaa	12120
	ggtgaaacaa cttttatcat acgtacaagt ttgttccgaa aaaatgcaac ccgtcgatat	12180
	tggacgggco gcattttacaa cgtcacttaa tttattatca aacacatttt totcaatcga	12240
10	attagcaagt catgaatcta gtgcttccca agagttttaa caactcatgt ggaatattat	12300
	ggaggaaatt ggaaggccta attatgctga ttttttccct attccttggtt acattgatcc	12360
	ctttggtata agacgtcgtt tggctgggta ctttgataaa ctcatatgat ttttccaaga	12420
15	cattattcgt gaaagacaaa agcttcgacg ttctaattct tccggcgcaa aacaaacaaa	12480
	tgacattcct gatactcttc ttaaactcca tgaagataat gagttgagta tgcctgaaat	12540
20	taatcacctt ctctgtggata tctttgacgc cggaacagac acaacagcaa gcacattaga	12600
	atgggcaatg gccgaacttg tgaaaaaccc ggaatgatg actaaagtgc aaattgaaat	12660
	cgaacaagct cttggaaaag attgcttaga catacaagaa tccgacatct caaaactacc	12720
25	ttatttacia gccattataa aagaaacggt acgtttacac cctcctactg tgtttttgct	12780
	gcctcgaaag gcagacaatg acgtagagtt atatggctac gttgtaccaa agaattgctca	12840
	agtccttgct aatctttggg caattggtcg tgatccaaag gtatggaaaa atccggaagt	12900
30	atctttctct gaaaggtttt tagattgcaa tatcgattat aaaggacgag atttcgaact	12960
	tttacccttt ggtgctggta gaaggatatg ccctggactt actttggcat atagaatgtt	13020
35	gaacttgatg ttggctactc ttcttcaaaa ctacaattgg aaacttgaag atggtatcaa	13080
	tcctaaggat ttagacatgg atgagaaatt tgggattaca ttgcaaaagg ttaaactctc	13140
	tcaagttatt ccagttccca gaaactaggc ttgctctcaa gatcaaaggc ttaaaaagct	13200
40	ggggttttat gaatgggacg aaagtttctt tttttctttt atatttgctt ctccatttgt	13260
	ttgtttcatt tccctttttg ttttcgtttc tatgatgcac ttgtgtgtga caaactctct	13320
	gggtttttac ttacgtctgc gtttcaaaaa aaaaaaccgc tttcgttttg cgttttagtc	13380
45	ccattgtttt gtagctctga gtgatcgaat tgatgcctct ttattccttt tgttccctat	13440
	aatttctttc aaaactcaga agaaaaacct tgaaactcct tgcaatgtta atataagtat	13500
50	tgtataagat ttttattgat ttggttatta gtcttacttt tgctacctcc atcttcaact	13560
	ggaactgata ttctgaatag ttaaagcggt acatgtcttc cattcacaaa tgaacttaaa	13620
	ctagcacaaa gtcagatatt ttaagatcgc accattttat ataaccccaa tcgtcaattc	13680
55	tactgtttca agttttacac caaaacaatt acgaggtgta tctattcgtt actcttttcg	13740
	cttattaatc cttttacatg atgcaaaata taacaaatta atttcaaatt gtctgcaca	13800
	tttggtttat acatcttgat tccaaaaagt cgctgtcagg agtctcaatg gtaactttac	13860
60	tctttattta accatacatt tttttttatt tttttcactt tgttcttcat ccactattgt	13920
	tctttgttca tcttgaacaa aagctccctc cttctttggt cttcatccac cattgttctt	13980
65	catcaatcat tt	13992

<210> 24
 <211> 11 797
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Vector de sobreexpresión pDOPA1

<400> 24

10	cgctgtcatg agaccggatc ctgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag	60
	cgtttatttag aataatcggg tattttaaag ggcgtgaaaa ggtttatccg ttcgtccatt	120
	tgtatgtgca tgccaaccac agggttcccc tcgggatcaa agtactttga tccaaccctt	180
15	ccgctgctat agtgcagtcg gcttctgacg ttcagtgcag ccgtcatctg aaaacgacat	240
	gtcgcacaag tcctaagtta cgcgacaggc tgccgccctg cccttttcct ggcgttttct	300
20	tgtcgcgtgt tttagtcgca taaagtagaa tacttgcgac tagaaccgga gacattacgc	360
	catgaacaag agcgcgcccg ctggcctgct gggctatgcc cgcgtcagca ccgacgacca	420
	ggacttgacc aaccaacggg ccgaactgca cgcggccggc tgcaccaagc tgttttccga	480
25	gaagatcacc ggcaccaggc gcgaccgccg ggagctggcc aggatgcttg accacctacg	540
	ccctggcgac gttgtgacag tgaccaggct agaccgcctg gcccgagca cccgcgacct	600
30	actggacatt gccgagcgca tccaggaggc cggcgccggc ctgcgtagcc tggcagagcc	660
	gtgggccgac accaccacgc cggccggccg catggtgttg accgtgttcg ccggcattgc	720
	cgagttcgag cgttccctaa tcatcgaccg caccgggagc gggcgcgagg ccgccaaggc	780
35	ccgaggcgtg aagtttgcc cccgccctac cctcaccocg gcacagatcg cgcacgcccg	840
	cgagctgac gaccaggaag gccgcaccgt gaaagaggcg gctgcaactg ttggcgtgca	900
40	tcgctcgacc ctgtaccgag cacttgagcg cagcgaggaa gtgacgcca ccgaggccag	960
	gcggcgccgt gccttccgtg aggacgcatt gaccgaggcc gacgccctgg cggccgccga	1020
	gaatgaacgc caagaggaac aagcatgaaa ccgcaccagg acggccagga cgaaccgttt	1080
45	ttcattaccg aagagatcga ggcgagatg atcgcgcccg ggtacgtgtt cgagccgccc	1140
	gcgcacctct caaccgtgag gctgcatgaa atcctggccg gtttgtctga tgccaagctg	1200
50	gcggccctggc cggccagctt ggccgctgaa gaaaccgagc gccgccgtct aaaaaggtga	1260
	tgtgtatttg agtaaacag cttgcgtcat gcggctcgtg cgtatatgat ccgatgagta	1320
55	aataaaca aa tacgcaaggg gaacgcatga aggttatcgc tgtacttaac cagaaaggcg	1380

60

65

ES 2 930 456 T3

	ggtcaggcaa gacgaccatc ggaacccatc tagcccgcg cctgcaactc gccggggccg	1440
	atgttctgtt agtcgattcc gatccccagg gcagtgcccg cgattgggcg gccgtgcggg	1500
5	aagatcaacc gctaaccgtt gtccggcatcg accgcccagc gattgaccgc gacgtgaagg	1560
	ccatcgcccg gcgcgacttc gtagtgatcg acggagcgcc ccaggcggcg gacttggtg	1620
	tgtccgcgat caaggcagcc gacttcgtgc tgattccggt gcagccaagc ccttacgaca	1680
10	tatgggccac cgccgacctg gtggagctgg ttaagcagcg cattgaggtc acggatggaa	1740
	ggctacaagc ggcctttgtc gtgtcgcggg cgatcaaagg cacgcgcacg gccgggtgagg	1800
	ttgccgaggc gctggccggg tacgagctgc ccattcttga gtcccgatc acgcagcgcg	1860
15	tgagctaccc aggcaactgcc gccgccggca caaccgttct tgaatcagaa cccgagggcg	1920
	acgctgcccg cgagggtccag gcgctggccg ctgaaattaa atcaaaactc atttgagtta	1980
20	atgaggtaaa gagaaaatga gcaaaagcac aaacacgcta agtgccggcc gtccgagcgc	2040
	acgcagcagc aaggctgcaa cgttggccag cctggcagac acgccagcca tgaagcgggt	2100
	caactttcag ttgccggcgg aggatcacac caagctgaag atgtacgcgg tacgccaagg	2160
25	caagaccatt accgagctgc tatctgaata gatcgcgag ctaccagagt aaatgagcaa	2220
	atgaataaat gagtagatga attttagcgg ctaaaggagg cggcatggaa aatcaagaac	2280
30	aaccaggcac cgacgccgtg gaatgcccc tgtgtggagg aacgggcggg tggccaggcg	2340
	taagcggtcg ggttgtctgc cggccctgca atggcactgg aacccccaaag cccgaggaat	2400
	cggcgtgacg gtcgcaaacc atccggcccgt gtacaaatcg gcgcggcgct ggggtgatgac	2460
35	ctggtggaga agttgaaggc cgcgcaggcc gccagcggc aacgcacga ggcagaagca	2520
	cgccccggtg aatcgtggca agcggccgct gatcgaatcc gcaaagaatc ccggcaaccg	2580
	ccggcagccg gtgcgcgctc gattaggaag ccgcccagc gcgacgagca accagatttt	2640
	ttcgttccga tgctctatga cgtgggcacc cgcgatagtc gcagcatcat ggacgtggcc	2700
	gttttccgtc tgtcgaagcg tgaccgacga gctggcgagg tgatccgcta cgagcttcca	2760
45	gacgggacag tagaggttcc cgcagggccg gccggcatgg ccagtgtgtg ggattacgac	2820
	ctggtactga tggcggtttc ccatctaacc gaatccatga accgataccg ggaagggaag	2880
	ggagacaagc ccggccgcgt gttccgtcca cacgttgcg acgtactcaa gttctgccg	2940
	cgagccgatg gcggaagca gaaagacgac ctggtagaaa cctgcattcg gttaaacc	3000
	acgcacgttg ccatgcagcg tacgaagaag gccagaacg gccgcctggt gacggtatcc	3060
55	gagggtgaag ccttgattag ccgctacaag atcgtaaaga gcgaaaccgg gcggccggag	3120
	tacatcgaga tcgagctagc tgattggatg taccgcgaga tcacagaagg caagaacc	3180
60	gacgtgctga cggttcacc cgttacttt ttgatcgatc ccggcatcgg ccgttttctc	3240

65

ES 2 930 456 T3

	taccgcctgg	cacgccgcgc	cgcaggcaag	gcagaagcca	gatggttggt	caagacgatc	3300
	tacgaacgca	gtggcagcgc	cggagagttc	aagaagttct	gtttcaccgt	gcgcaagctg	3360
5	atcgggtcaa	atgacctgcc	ggagtacgat	ttgaaggagg	aggcggggca	ggctggcccg	3420
	atcctagtca	tgcgtaccg	caacctgac	gagggcgaag	catccgccgg	ttcctaattgt	3480
	acggagcaga	tgctagggca	aattgcccta	gcaggggaaa	aaggctcga	aggactcttt	3540
10	cctgtggata	gcacgtacat	tgggaaccca	aagccgtaca	ttgggaaccg	gaacccgtac	3600
	attggaacc	caaagccgta	cattgggaac	cggtcacaca	tgtaatgtac	tgatataaaa	3660
	gagaaaaaag	gcgatttttc	cgcctaaaac	tctttaaaac	ttattaaaac	tcttaaaacc	3720
15	cgcctggcct	gtgcataact	gtctggccag	cgcacagccg	aagagctgca	aaaagcgcct	3780
	acccttogg	cgtgcgcctc	cctacgcccc	gccgcttcgc	gtcggcctat	cgcggccgct	3840
20	ggccgctcaa	aaatggctgg	cctacggcca	ggcaatctac	cagggcgccg	acaagccgcg	3900
	ccgtcgccac	tgcaccgccg	gcgcccacat	caaggcacc	tgcctcgccg	gtttcgggtga	3960
	tgacgggtga	aacctctgac	acatgcagct	cccgggtgac	gtcacagctt	gtctgtaagc	4020
25	ggatgccggg	agcagacaag	cccgtcaggg	cgcgtcagcg	ggtgttggcg	ggtgtcgggg	4080
	cgcagccatg	accagctcac	gtagcgatag	cggagtgtat	actggcttaa	ctatgcggca	4140
30	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgcgggtgtg	aaataccgca	cagatgcgta	4200
	aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	gcttccctcg	tcactgactc	gctgcgctcg	4260
	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	4320
35	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	4380
	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgcagcatcac	4440
	aaaaatogac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccogacag	gactataaag	ataccaggcg	4500
40	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	4560
	ctgtccgctt	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	4620
45	ctcagttcgg	tgtaggctgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	cccgttcag	4680
	cccgaccgct	gcgccttatc	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	4740
	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	4800
50	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	4860
	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	4920
	aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	4980
55	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	5040
	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	cattctaggt	gattatttgc	cgactacctt	5100
60	ggtgatctcg	cctttcacgt	agtggacaaa	ttcttccaac	tgatctgcgc	gcgaggccaa	5160

65

ES 2 930 456 T3

	gcgatcttct tcttgtccaa gataagcctg tctagcttca agtatgacgg gctgatactg	5220
	ggccggcagg cgctccattg cccagtcggc agcgacatcc ttcggcgga ttttgccggt	5280
5	tactgcgctg taccaaatgc gggacaacgt aagcactaca tttcgctcat caccagccca	5340
	gtcgggaggc gagttccata gcgttaaggt ttcatcttagc gcctcaaata gatcctgttc	5400
	aggaaccgga tcaaagagtt cctccgcccg tggacctacc aaggcaacgc tatgttctct	5460
10	tgcttttgtc agcaagatag ccagatcaat gtcgatcgtg gctggctcga agatacctgc	5520
	aagaatgtca ttgcgctgcc attctccaaa ttgcagttcg cgcttagctg gataacgcca	5580
15	cggaatgatg tcgtcgtgca caacaatggt gacttctaca gcgcggagaa tctcgctctc	5640
	tccaggggaa gccgaagttt ccaaaaggtc gttgatcaaa gctcgccgag ttgtttcatc	5700
	aagccttacg gtcaccgtaa ccagcaaata aatatcactg tgtggcttca ggccgccatc	5760
20	cactgcggag ccgtacaaat gtacggccag caacgtcggg tcgagatggc gctcgatgac	5820
	gccaaactacc tctgatagtt gagtcgatac ttcggcgatc accgcttccc tcataatgtt	5880
25	taactttgtt ttagggcgac tgccctgctg cgtaacatcg ttgctgctcc ataacatcaa	5940
	acatcgaccc acggcgtaac gcgcttgctg cttggatgcc cgaggcatag actgtacccc	6000
	aaaaaaacag tcataacaag ccatgaaaac cgccactgag ccgttaccac cgctgcgttc	6060
30	ggtcaagggt ctggaccagt tgcgtgagcg catacgctac ttgcattaca gcttacgaac	6120
	cgaacagggt tatgtccact ggggttcgtg cttcatccgt ttccacgggtg tgcgtcacc	6180
	ggcaaccctg ggtagcagcg aagtcgaggc atttctgtcc tggctggaac agaacttatt	6240
35	atttccttcc tcttttctac agtatctaaa gatccccaa gaagctaatt ataacaagac	6300
	gaactccaat tcaactgttc ttgcattcta aaaccttaaa taccagaaaa cagctttttc	6360
40	aaagttgttt tcaaagttgg cgtataacat agtatcgacg gagccgattt tgaaaccgag	6420
	gtgatcacag gcagcaacgc tctgtcatcg ttacaatcaa catgctaccc tccgcgagat	6480
	catccgtgtt tcaaaccgag cagcttagtt gccgttcttc cgaatagcat cggtaacatg	6540
45	agcaaagtct gccgccttac aacggctctc ccgctgacgc cgtcccgagc tgatgggctg	6600
	cctgtatcga gtgggtgattt tgtgccgagc tgccgggtcg ggagctgttg gctggctggt	6660
50	ggcaggatat attgtggtgt aaacataacg gatccggtct caggagagcg tcgatctagt	6720
	aacatagatg acaccgagcg cgataattta tcctagtttg cgcgctatat tttgttttct	6780
	atcgcgattt aaatgtataa ttgcgggact ctaatcataa aaacccatct cataaataac	6840
55	gtcatgcatt acatgttaat tattacatgc ttaacgtaat tcaacagaaa ttatatgata	6900
	atcatcgcaa gaccggcaac aggattcaat cttaagaaac tttattgcca aatgtttgaa	6960
60	cgatctgctt cgacgcactc cttctttact ccaccatctc gtccttattg aaaacgtggg	7020

ES 2 930 456 T3

	tagcaccaaa	acgaatcaag	tcgctggaac	tgaagttacc	aatcacgctg	gatgatttgc	7080
	cagttggatt	aatcttgcct	ttccccgcat	gaataatatt	gatgaatgca	tgcgtgaggg	7140
5	gtagttcgat	gttggcaata	gctgcaattg	ccgcgacatc	ctccaacgag	cataattctt	7200
	cagaaaaata	gcgatgttcc	atgtttgtcag	ggcatgcatg	atgcacgtta	tgaggtgacg	7260
	gtgctaggca	gtattccctc	aaagtttcat	agtcagtatc	atattcatca	ttgcattcct	7320
10	gcaagagaga	attgagacgc	aatccacacg	ctgcggcaac	cttccggcgt	tcgtggtcta	7380
	tttgctcttg	gacgttgcaa	acgtaagtgt	tggatcgggg	tgggcgaaga	actccagcat	7440
15	gagatccccg	cgctggagga	tcatccagcc	ggcgtcccg	aaaacgattc	cgaagcccaa	7500
	cctttcatag	aaggcggcgg	tggaatcgaa	atctcgtgat	ggcaggttgg	gcgtcgcttg	7560
	gtcggtcatt	tcgaacccca	gagtcgccgt	cagaagaact	cgtcaagaag	gcgatagaag	7620
20	gcgatgcgct	gcgaatcggg	agcggcgata	ccgtaaagca	cgaggaagcg	gtcagcccat	7680
	tcgccgccaa	gctcttcagc	aatatcacgg	gtagccaacg	ctatgtcctg	atagcgggcc	7740
25	gccacaccca	gccggccaca	gtcgatgaat	ccagaaaagc	ggccattttc	caccatgata	7800
	ttcggcaagc	aggcatcgcc	atgggtcacg	acgagatcct	cgccgtcggg	catgcgcgcc	7860
	ttgagcctgg	cgaacagttc	ggctggcgcg	agcccctgat	gctcttcgtc	cagatcatcc	7920
30	tgatcgacaa	gaccggcttc	catccgagta	cgtgctcgct	cgatgcgatg	tttcgcttgg	7980
	tggtcgaatg	ggcaggtagc	cggatcaagc	gtatgcagcc	gccgcattgc	atcagccatg	8040
	atggatactt	tctcggcagg	agcaaggtga	gatgacagga	gatcctgccc	cggcacttcg	8100
35	cccaatagca	gccagtccct	tcccgttca	gtgacaacgt	cgagcacagc	tgcgcaaggga	8160
	acgcccgtcg	tggccagcca	cgatagccgc	gctgcctcgt	cctgcagttc	attcagggca	8220
40	ccggacaggt	cggctcttgac	aaaaagaacc	gggcgcccct	gcgctgacag	ccggaacacg	8280
	gcggcatcag	agcagccgat	tgtctgttgt	gcccagtcac	agccgaatag	cctctccacc	8340
	caagcggccg	gagaacctgc	ccggatccgg	gcggaaatag	gtaaagaagt	tgcggataag	8400
45	gtaattgcca	ttgcagatta	tttggattga	gagtgaatat	gagactctaa	ttggataccg	8460
	aggggaatth	atggaacgtc	agtggagcat	ttttgacaag	aaatatttgc	tagctgatag	8520
50	tgaccttagg	cgacttttga	acgcgcaata	atggtttctg	acgtatgtgc	ttagctcatt	8580
	aaactccaga	aaccctccg	tcaggagact	agagccaagc	tgatctcctt	tgccccggag	8640
	atcaccatgg	acgactttct	ctatctctac	gatctaggaa	gaaagttoga	cggagaaggt	8700
55	gacgatacca	tggttcaccac	cgataatgag	aagattagcc	tcttcaattt	cagaaagaat	8760
	gctgaccac	agatggttag	agaggcctac	gcggcaggtc	tgatcaagac	gatctacccg	8820
60	agtaataatc	tccaggagat	caaatacctt	cccaagaagg	ttaaagatgc	agtcaaaaga	8880
	ttcaggacta	actgcatcaa	gaacacagag	aaagatatat	ttctcaagat	cagaagtact	8940

65

ES 2 930 456 T3

	attccagtat	ggacgattca	aggcttgctt	cataaaccaa	ggcaagtaat	agagattgga	9000
	gtctctaaga	aagtagttcc	tactgaatca	aaggccatgg	agtcaaaaat	tcagatcgag	9060
5	gatctaacag	aactcgccgt	gaagactggc	gaacagttca	tacagagtct	tttacgactc	9120
	aatgacaaga	agaaaatctt	cgtcaacatg	gtggagcacg	acactctcgt	ctactccaag	9180
	aatatcaaag	atacagtctc	agaagaccaa	agggctattg	agacttttca	acaaagggtg	9240
10	atatcgggaa	acctcctcgg	attccattgc	ccagctatct	gtcacttcat	caaaaggaca	9300
	gtagaaaagg	aaggtggcac	ctacaaatgc	catcattgcg	ataaaggaaa	ggctatcggt	9360
15	caagatgcct	ctgccgacag	tgggtcccaa	gatggacccc	cacccacgag	gagcatcggt	9420
	gaaaaagaag	acgttccaac	cacgtcttca	aagcaagtgg	attgatgtga	tatctccact	9480
	gacgtaaggg	atgacgcaca	atcccactat	ccttcgcaag	acccttcctc	tatataagga	9540
20	agttcatttc	atttgagag	gactccggta	tttttacaac	aataccacaa	caaaacaaac	9600
	aacaaacaac	attacaattt	actattctag	tcgaaatgga	taacgcaaca	cttgctgtga	9660
	tcctttccat	tttgtttgtg	ttttaccaca	ttttcaaate	ctttttcacc	aattcttcat	9720
25	ctcgtaggct	tcctcctggt	cccaaaccgg	tgccaatttt	tggaacatt	ttcgatcttg	9780
	gcgaaaagcc	tcatcgatct	tttgccaatc	tatctaaaat	tcacggccct	ttgattagcc	9840
30	taaagttagg	aagtgtgaac	actattgttg	tttcctcggc	ctctgtggcc	gaggaaatgt	9900
	tccttaaaaa	tgaccaagca	cttgctaacc	gaaccattcc	tgactcgggt	agggtcgggt	9960
	accacgacaa	attatccatg	tcgtgggtgc	ctgtttccca	aaaatggaga	aatatgagaa	10020
35	aaatctccgc	tgtccaatta	ctctccaacc	aaaaacttga	tgctagtcaa	cctcttagac	10080
	aagctaaggt	gaaacaactt	ttatcatagc	tacaagtttg	ttccgaaaaa	atgcaacccg	10140
40	tcgatattgg	acgggccgca	tttacaacgt	cacttaattt	attatcaaac	acatttttct	10200
	caatcgaatt	agcaagtcat	gaatctagt	cttcccaaga	gtttaacaa	ctcatgtgga	10260
	atattatgga	ggaaattgga	aggcctaatt	atgctgattt	ttccctatt	cttggttaca	10320
45	ttgatccctt	tggtataaga	cgtcgtttgg	ctggttactt	tgataaactc	attgatgttt	10380
	tccaagacat	tattcgtgaa	agacaaaagc	ttcgatcttc	taattcttcc	ggcgcaaaac	10440
	aaacaaatga	cattcttgat	actcttctta	aactccatga	agataatgag	ttgagtatgc	10500
50	ctgaaattaa	tcaccttctc	gtggatatct	ttgacgccgg	aacagacaca	acagcaagca	10560
	cattagaatg	ggcaatggcc	gaacttgtga	aaaacccgga	aatgatgact	aaagtcaaa	10620
55	ttgaaatcga	acaagctctt	ggaaaagatt	gcttagacat	acaagaatcc	gacatctcaa	10680
	aactacctta	tttacaagcc	attataaaag	aaacgttacg	tttacaccct	cctactgtgt	10740
60	ttttgctgcc	tcgaaaggca	gacaatgacg	tagagttata	tggtacggt	gtaccaaaga	10800

65

ES 2 930 456 T3

	atgctcaagt ccttgtcaat ctttgggcaa ttggtcgtga tccaaaggta tggaaaaatc	10860
	cggaagtatt ttctcctgaa aggttttttag attgcaatat cgattataaa ggacgagatt	10920
5	tcgaactttt acccttttgt gctggtagaa ggatatgcc tggacttact ttggcatata	10980
	gaatgttgaa cttgatgttg gctactcttc ttcaaaacta caattggaaa cttgaagatg	11040
	gtatcaatcc taaggattta gacatggatg agaaatttgg gattacattg caaaaggtta	11100
10	aacctcttca agttattcca gttcccagaa actaggcttg ctctcaagat caaaggctta	11160
	aaaagctggg gttttatgaa tgggatcaaa gtttcttttt ttcttttata tttgcttctc	11220
15	catttgtttg tttcatttcc ctttttgttt tcgtttctat gatgcacttg tgtgtgacaa	11280
	actctctggg tttttactta cgtctgcgtt tcaaaaaaaa aaaccgcttt cgttttgcgt	11340
	tttagtccca ttgttttgta gctctgagt atcgaattga tgcctcttta ttccttttgt	11400
20	ttcctataat ttctttcaaa actcagaaga aaaaccttga aactctttgc aatgttaata	11460
	taagtattgt ataagatttt tattgatttg gttattagtc ttacttttgc tacctccatc	11520
25	ttcacttgga actgatattc tgaatagtta aagcggtaca tgtcttccat tcacaaatga	11580
	acttaaaacta gcacaaagtc agatatttta agatcgcacc attttatata accccaatcg	11640
	tcaattctac tgtttcaagt ttacaccaa aacaattacg aggtgtatct attcgttact	11700
30	cttttcgctt attaatcctt ttacatgatg caaaatataa caaattaatt tcaaattgtc	11760
	ctgcacatth ggtttatata tcttgattcc aaaaagt	11797
35	<210> 25 <211> 13 626 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Vector de sobreexpresión pDOPA2	
40	<400> 25	
	cgctgtcatg agaccggatc ctgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag	60
45	cgtttattag aataatcgga tattttaaag ggcgtgaaaa ggtttatccg ttcgtccatt	120
	tgtatgtgca tgccaaccac agggttcccc tcgggatcaa agtactttga tccaaccct	180
50	ccgctgctat agtgcagtcg gcttctgacg ttcagtgcag ccgtcatctg aaaacgacat	240
	gtcgcacaag tcctaagtta cgcgacaggc tgccgccctg cccttttcct ggcgttttct	300
	tgtcgcgtgt tttagtcgca taaagtagaa tacttgcgac tagaaccgga gacattacgc	360
55	catgaacaag agcgcgcgag ctggcctgct gggctatgcc cgcgtcagca ccgacgacca	420
	ggacttgacc aaccaacggg ccgaactgca cgcggccggc tgcaccaagc tgttttccga	480
60	gaagatcacc ggcaccaggc gcgaccgccc ggagctggcc aggatgcttg accacctacg	540
	ccctggcgac gttgtgacag tgaccaggct agaccgcctg gcccgagca cccgcgacct	600

65

ES 2 930 456 T3

	actggacatt gccgagcgca tccaggagggc cggcgcggggc ctgcgtagcc tggcagagccc	660
	gtggggccgac accaccacgc cggccgggccg catggtgttg accgtgttcg ccggcattgc	720
5	cgagttcgag cgttccctaa tcatcgaccg caccgggagc gggcgcgagg ccgccaaggc	780
	ccgaggcggtg aagtttggtc cccgccctac cctcaccgcc gcacagatcg cgcacgcccg	840
	cgagctgacg gaccaggaag gccgcaccgt gaaagaggcg gctgcaactgc ttggcggtgca	900
10	tcgctcgacc ctgtaccgcg cacttgagcg cagcgaggaa gtgacgcccga ccgaggccag	960
	gcggcgcggt gccttccgtg aggacgcatt gaccgaggcc gacgcccctgg cggccgcccga	1020
15	gaatgaacgc caagaggaac aagcatgaaa ccgcaccagg acggccaggga cgaaccgttt	1080
	ttcattaccg aagagatcga ggcgagagatg atcgcgggccg ggtacgtgtt cgagccgccc	1140
	gcgcacctct caaccgtgcg gctgcatgaa atcctggccg gtttgtctga tgccaagctg	1200
20	gcggcctggc cggccagctt ggccgctgaa gaaaccgagc gccgccgtct aaaaaggtga	1260
	tgtgtatattg agtaaaacag cttgcgtcat gcggtcgctg cgtatatgat ccgatgagta	1320
25	aataaacaaa tacgcaaggg gaacgcatga aggttatcgc tgtacttaac cagaaaggcg	1380
	ggtcaggcaa gacgaccatc ggaacccatc tagcccgcg cctgcaactc gccggggccg	1440
	atgttctgtt agtcgattcc gatccccagg gcagtgcgcg cgattggggc gccgtgcggg	1500
30	aagatcaacc gctaaccgtt gtcggcatcg accgcccgac gattgaccgc gacgtgaagg	1560
	ccatcggccg gcgcgacttc gtagtgatcg acggagcgcc ccaggcgggc gacttggtcg	1620
35	tgtccgcgat caaggcagcc gacttcgtgc tgattccggt gcagccaagc ccttacgaca	1680
	tatgggccac cgccgacctg gtggagctgg ttaagcagcg cattgaggtc acggatggaa	1740
	ggctacaagc ggcctttgtc gtgtcgcggg cgatcaaagg cacgcgcacg ggcgggtgagg	1800
40	ttgccgaggc gctggccggg tacgagctgc ccattcttga gtcccgtatc acgcagcgcg	1860
	tgagctaccc aggcaactgc gccgccggca caaccgttct tgaatcagaa cccgagggcg	1920
45	acgctgcccg cgagggtccag gcgctggccg ctgaaattaa atcaaaaactc atttgagtta	1980
	atgaggtaaa gagaaaatga gcaaaagcac aaacacgcta agtgccggcc gtccgagcgc	2040
	acgcagcagc aaggctgcaa cgttggccag cctggcagac acgccagcca tgaagcgggt	2100
50	caactttcag ttgccggcgg aggatcacac caagctgaag atgtacgcgg tacgccaagg	2160
	caagaccatt accgagctgc tatctgaata gatcgcgag ctaccagagt aatgagcaa	2220
55	atgaataaat gagtagatga attttagcgg ctaaaggagg cggcatggaa aatcaagaac	2280
	aaccaggcac cgacgccgtg gaatgcccc tgtgtggagg aacgggcggg tggccaggcg	2340
	taagcggtcg ggttgtctgc cggccctgca atggcactgg aacccccaaag cccgaggaat	2400
60	cggcggtgacg gtcgcaaacc atccggcccc gtacaaatcg gcgcggcgct ggggtgatgac	2460

ES 2 930 456 T3

	ctggttgaga agttgaaggc cgcgcaggcc gcccagcggc aacgcacgca ggcagaagca	2520
	cgccccggtg aatcgtggca agcggccgct gatcgaatcc gcaaagaatc ccggcaaccg	2580
5	ccggcagccg gtgcgccgtc gattaggaag ccgccaagg gcgacgagca accagatttt	2640
	ttcgttccga tgctctatga cgtgggcacc cgcgatagtc gcagcatcat ggacgtggcc	2700
	gttttccgtc tgtcgaagcg tgaccgacga gctggcgagg tgatccgcta cgagcttcca	2760
10	gacgggcacg tagaggtttc cgcagggccg gccggcatgg ccagtgtgtg ggattacgac	2820
	ctggtactga tggcggtttc ccatctaacc gaatccatga accgataccg ggaagggaag	2880
15	ggagacaagc ccggcccgct gttccgtcca cacgttgccg acgtactcaa gttctgccgg	2940
	cgagccgatg gcggaaagca gaaagacgac ctggtagaaa cctgcattcg gttaaacacc	3000
	acgcacgttg ccatgcagcg tacgaagaag gccagaacg gccgcctggt gacggtatcc	3060
20	gaggggtgaag ccttgattag ccgctacaag atcgtaaaga gcgaaaccgg gcggccggag	3120
	tacatcgaga tcgagctagc tgattggatg taccgcgaga tcacagaagg caagaaccog	3180
	gacgtgctga cggttcaccc cgattacttt ttgatcgatc ccggcatcgg ccgttttctc	3240
25	taccgcctgg cacgccgcgc cgcaggcaag gcagaagcca gatggttgtt caagacgac	3300
	tacgaacgca gtggcagcgc cggagagttc aagaagttct gtttcaccgt gcgcaagctg	3360
30	atcgggtcaa atgacctgcc ggagtacgat ttgaaggagg aggcggggca ggctggcccg	3420
	atcctagtca tgcgctaccg caacctgacg gagggcgaag catccgccgg ttcctaattgt	3480
	acggagcaga tgctagggca aattgcccta gcaggggaaa aaggtcgaaa aggactcttt	3540
35	cctgtggata gcacgtacat tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg gaaccgtac	3600
	attgggaacc caaagccgta cattgggaac cgttcacaca tgtaagtgc tgatataaaa	3660
40	gagaaaaaag gcgatttttc cgcctaaaac tctttaaaac ttattaaaac tcttaaaacc	3720
	cgcctggcct gtgcataact gtctggccag cgcacagccg aagagctgca aaaagcgcc	3780
	acccttcggt cgctgcgctc cctacgcccc gccgcttcgc gtcggcctat cgcggccgct	3840
45	ggccgctcaa aaatggctgg cctacggcca ggcaatctac cagggcgcg gacaagccgg	3900
	ccgtcgccac tcgaccgccc gcgccacat caaggcacc tcgcctcgcg gtttcggtga	3960
	tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggtgacg gtcacagctt gtctgtaagc	4020
50	ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg	4080
	cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca	4140
55	tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta	4200
	aggagaaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg	4260
	gtcgttcggc tcgggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca	4320
60	gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaa gccagcaaaa ggccaggaac	4380

65

ES 2 930 456 T3

	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	4440
	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccogacag	gactataaag	ataccaggcg	4500
5	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	4560
	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtagggtat	4620
	ctcagttcgg	tgtaggctcg	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcaacgaacc	ccccgttcag	4680
10	cccgaccgct	gcgccttata	cggttaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	4740
	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	4800
15	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	4860
	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	4920
	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtgggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	4980
20	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	5040
	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcattg	cattctaggt	gattatttgc	cgactacctt	5100
25	ggtgatctcg	cctttcacgt	agtggacaaa	ttcttccaac	tgatctgcgc	gcgaggccaa	5160
	gcgatcttct	tcttgtccaa	gataagcctg	tctagcttca	agtatgacgg	gctgatactg	5220
	ggccggcagg	cgctccattg	cccagtcggc	agcgacatcc	ttcggcgcgga	ttttgccggt	5280
30	tactgcgctg	taccaaagtc	gggacaacgt	aagcactaca	tttcgctcat	caccagccca	5340
	gtcggggcggc	gagttccata	gcgttaaggt	ttcatcttagc	gcctcaaata	gatcctgttc	5400
	aggaaccgga	tcaaagagtt	cctccgcgcg	tggacctacc	aaggcaacgc	tatgttctct	5460
35	tgctttttgtc	agcaagatag	ccagatcaat	gtcgatcgtg	gctggctcga	agatacctgc	5520
	aagaatgtca	ttgcgctgcc	attctccaaa	ttgcagttcg	cgcttagctg	gataacgcca	5580
40	cggaatgatg	tcgtcgtgca	caacaatggt	gacttctaca	gcgcggagaa	tctcgctctc	5640
	tccaggggaa	gccgaagttt	ccaaaaggtc	gttgatcaaa	gctcgccgcg	ttgtttcatc	5700
	aagccttacg	gtcaccgtaa	ccagcaaata	aatatcactg	tgtggcttca	ggccgccatc	5760
45	cactgcggag	ccgtacaaat	gtacggccag	caacgtcggg	tcgagatggc	gctcgatgac	5820
	gccaactacc	tctgatagtt	gagtcgatac	ttcggcgatc	accgcttccc	tcataatggt	5880
50	taactttggt	ttagggcgac	tgccctgctg	cgtaacatcg	ttgctgctcc	ataacatcaa	5940
	acatcgaccc	acggcgtaac	gcgcttgctg	cttggtatgcc	cgaggcatag	actgtacccc	6000
	aaaaaaacag	tcataacaag	ccatgaaaac	cgccactgcg	ccgttaccac	cgctgcgttc	6060
55	ggtcaagggt	ctggaccagt	tgctgagcg	catacgctac	ttgcattaca	gcttacgaac	6120
	cgaacaggct	tatgtccact	gggttcgtgc	cttcatccgt	ttccaagggtg	tgcgtaaccc	6180
60	ggcaaccttg	ggtagcagcg	aagtcgaggg	atctctgtcc	tggctggaac	agaacttatt	6240
65							

ES 2 930 456 T3

	atttccttcc	tcttttctac	agtattttaa	gataccccaa	gaagctaatt	ataacaagac	6300
	gaactccaat	tactgttcc	ttgcattcta	aaacctttaa	taccagaaaa	cagctttttc	6360
5	aaagttgttt	tcaaagttgg	cgtataacat	agtatcgacg	gagccgattt	tgaaacgcg	6420
	gtgatcacag	gcagcaacgc	tctgtcatcg	ttacaatcaa	catgctaccc	tccgcgagat	6480
	catccgtgtt	tcaaaccggg	cagcttagtt	gccgttcttc	cgaatagcat	cggtaacatg	6540
10	agcaaagtct	gccgccttac	aacggctctc	ccgctgacgc	cgtcccggac	tgatgggctg	6600
	cctgtatcga	gtggtgattt	tgtgccgagc	tgccggctcg	ggagctgttg	gctggctggt	6660
	ggcaggatat	attgtgggtg	aaacataacg	gatccggctc	caggagagcg	tcgatctagt	6720
15	aacatagatg	acaccgcgcg	cgataattta	tcctagtttg	cgcgctatat	tttgttttct	6780
	atcgcgtatt	aaatgtataa	ttgcgggact	ctaatacata	aaacccatct	cataaataac	6840
20	gtcatgcatt	acatgttaat	tattacatgc	ttaacgtaat	tcaacagaaa	ttatatgata	6900
	atcatcgcaa	gaccggcaac	aggattcaat	cttaagaaac	tttattgcca	aatgtttgaa	6960
	cgatctgctt	cgacgcactc	cttctttact	ccaccatctc	gtccttattg	aaaacgtggg	7020
25	tagcaccaaa	acgaatcaag	tcgctggaac	tgaagttacc	aatcacgctg	gatgatttgc	7080
	cagttggatt	aatcttgcct	ttccccgcat	gaataatatt	gatgaatgca	tgcgtgaggg	7140
30	gtagttcgat	gttggcaata	gctgcaattg	ccgcgacatc	ctccaacgag	cataattctt	7200
	cagaaaaata	gcgatgttcc	atgttgtcag	ggcatgcatg	atgcacgtta	tgaggtgacg	7260
	gtgctaggca	gtattccctc	aaagtttcat	agtcagtatc	atattcatca	ttgcattcct	7320
35	gcaagagaga	attgagacgc	aatccacacg	ctgcggcaac	cttccggcgt	tcgtgggtcta	7380
	tttgctcttg	gacgttgcaa	acgtaagtgt	tggatcgggg	tgggcgaaga	actccagcat	7440
	gagatccccg	cgctggagga	tcataccagc	ggcgtcccgg	aaaacgattc	cgaagcccaa	7500
40	cctttcatag	aaggcggcgg	tggaatcgaa	atctcgtgat	ggcaggttgg	gcgtcgcttg	7560
	gtcggtcatt	tcgaacccca	gagtcccgct	cagaagaact	cgtcaagaag	gcgatagaag	7620
45	gcgatgcgct	gcgaatcggg	agcggcgata	ccgtaaagca	cgaggaagcg	gtcagcccat	7680
	tcgccgccaa	gctcttcagc	aatatcacgg	gtagccaacg	ctatgtcctg	atagcgggtc	7740
	gccacaccca	gccggccaca	gtcgatgaat	ccagaaaagc	ggccattttc	caccatgata	7800
50	ttcggcaagc	aggcatcgcc	atgggtcacg	acgagatcct	cgccgtcggg	catgcgcgcc	7860
	ttgagcctgg	cgaacagttc	ggctggcgcg	agccoctgat	gctcttcgtc	cagatcatcc	7920
55	tgatcgacaa	gaccggcttc	catccgagta	cgtgctcgct	cgatgcgatg	tttcgcttgg	7980
	tggtcgaatg	ggcaggtagc	cggatcaagc	gtatgcagcc	gccgcattgc	atcagccatg	8040
	atggatactt	tctcggcagg	agcaaggtga	gatgacagga	gatcctgccc	cggcaacttcg	8100
60	cccaatagca	gccagtccct	tcccgcttca	gtgacaacgt	cgagcacagc	tgcgcaagga	8160

65

ES 2 930 456 T3

	acgcccgtcg	tggccagcca	cgatagccgc	gctgcctcgt	cctgcagttc	attcagggca	8220
	ccggacaggt	cggctctgac	aaaaagaacc	gggcgcccct	gcgctgacag	ccggaacacg	8280
5	gcggcatcag	agcagccgat	tgtctgttgt	gccagtcac	agccgaatag	cctctccacc	8340
	caagcggccg	gagaacctgc	ccggatccgg	gcggaaatag	gtaaagaagt	tgcggataag	8400
	gtaattgcc	ttgcagatta	tttggattga	gagtgaatat	gagactctaa	ttggataccg	8460
10	aggggaattt	atggaacgtc	agtggagcat	ttttgacaag	aaatatttgc	tagctgatag	8520
	tgaccttagg	cgacttttga	acgcgcaata	atggtttctg	acgtatgtgc	ttagctcatt	8580
	aaactccaga	aaccctccg	tcaggaggtc	aactacccca	atttaaattt	tatttgatta	8640
15	agatatTTTT	atggacctac	tttataatta	aaaatatttt	ctatttgaaa	aggaaggaca	8700
	aaaatcatac	aatttttggtc	caactactcc	tctctttttt	tttttggtt	tataaaaaag	8760
20	gaaagtgatt	agtaataaat	aattaaataa	tgaaaaaagg	aggaaataaa	attttcgaat	8820
	taaaaatgta	aagagaaaaa	ggagagggag	taatcattgt	ttaactttat	ctaaagtacc	8880
	ccaattogat	tttacctgta	tatcaaatta	tacaaatatt	ttattaaaaat	atagatatgt	8940
25	aataatttta	ttattcttga	acatgtaaat	aaaaattatc	tattatttca	atttttatat	9000
	aaactattat	ttgaaatctc	aattatgatt	ttttaatatc	actttctatc	catgataatt	9060
30	tcagcttaaa	aagttttgtc	aataattaca	ttaattttgt	tgatgaggat	gacaagattt	9120
	cggtcaccaa	ttacatatat	acaaattgaa	atagtaagca	acttgatttt	ttttctcata	9180
	atgataatga	caaagacacg	aaaagacaat	tcaatattca	cattgattta	tttttatatg	9240
35	ataataatta	caataataat	attcttataa	agaaagagat	caattttgac	tgatccaaaa	9300
	atttatttat	ttttactata	ccaacgtcac	taattatata	taataatgta	aaacaattca	9360
	atcttactta	aatattaatt	tgaaataaac	tattttttata	acgaaattac	taaatttatc	9420
40	caataacaaa	aaggtcttaa	gaagacataa	attctttttt	tgtaatgctc	aaataaattt	9480
	gagtaaaaaa	gaatgaaatt	gagtgttttt	tttttaatac	taagaaaata	aataattaat	9540
45	ttcaatataa	taaaacagta	atataatttc	ataaatggaa	ttcaataactt	acctcttaga	9600
	tataaaaaat	aaatataaaa	ataaagtgtt	tctaataaac	ccgcaattta	aataaaatat	9660
	ttaatatattt	caatcaaatt	taaataatta	tattaaaata	tcgtagaaaa	agagcaatat	9720
50	ataatacaag	aaagaagatt	taagtacaat	tatcaactat	tattatactc	taattttgtt	9780
	atattttaatt	tcttacgggt	aaggtcatgt	tcacgataaa	ctcaaaatac	gctgtatgag	9840
	gacatatattt	aaatttttaac	caataataaa	actaagttat	tttttagtata	tttttttgtt	9900
55	taacgtgact	taatttttct	tttctagagg	agcgtgtaag	tgtcaacctc	attctcctaa	9960
	ttttcccaac	cacataaaaa	aaaaataaag	gtagcttttg	cgtgttgatt	tggtacacta	10020
60							
65							

ES 2 930 456 T3

	cacgtcatta ttacacgtgt tttcgtatga ttggttaatc catgaggcgg tttcctctag	10080
	agtcggccat accatctata aaataaagct ttctgcagct catTTTTTca tcttctatct	10140
5	gatttctatt ataatttctc tgaattgcct tcaaatttct ctttcaaggt tagaattttt	10200
	ctctatTTTT tggTTTTtgt ttgttttagat tctgagttta gttaatcagg tgctgttaaa	10260
	gccctaaatt ttgagttttt ttcggttggt ttgatggaaa atacctaaca attgagtttt	10320
10	ttcatgttgt tttgtcggag aatgcctaca attggagttc ctttcggtgt tttgatgaga	10380
	aagcccctaa tttgagtggt tttccgtcga tttgatttta aaggtttata ttcgagtttt	10440
15	tttcgtcggg ttaatgagaa ggcctaaaat aggagttttt ctggttgatt tgactaaaaa	10500
	agccatggaa ttttgtgttt ttgatgtcgc tttggttctc aaggcctaag atctgagttt	10560
	ctccggttgt tttgatgaaa aagcccctaa attggagttt ttatcttggtg ttttaggttg	10620
20	ttttaatcct tataatttga gttttttcgt tgttctgatt gttgttttta tgaattttgc	10680
	agaatggata acgcaacact tgctgtgatc ctttccattt tgtttgtgtt ttaccacatt	10740
25	ttcaaactct ttttcaccaa ttcttcatct cgtaggcttc ctccctggtcc caaaccctg	10800
	ccaatttttg gcaacatttt cgatcttggc gaaaagcctc atcgatcttt tgccaatcta	10860
	tctaaaattc acggcccttt gattagccta aagttaggaa gtgtaacaac tattgttggt	10920
30	tcctcggcct ctgtggccga ggaaatgttc cttaaaaaatg accaagcact tgctaaccga	10980
	accattcctg actcggttag ggctggtgac cacgacaaat tatccatgtc gtggttgcc	11040
	gtttcccaaa aatggagaaa tatgagaaaa atctccgctg tccaattact ctccaaccaa	11100
35	aaacttgatg ctagtcaacc tcttagacaa gctaagggtga aacaactttt atcatacgta	11160
	caagtttggt ccgaaaaaat gcaaccctgc gatattggac gggccgcatt tacaacgtca	11220
40	cttaatttat tatcaaacac atttttctca atcgaattag caagtcatga atctagtgt	11280
	tccaagagt ttaaacaact catgtggaat attatggagg aaattggaag gcctaattat	11340
	gctgattttt tcctatttct tggttacatt gatcccttg gtataagacg tcgtttggct	11400
45	ggttactttg ataaactcat tgatgttttc caagacatta ttcgtgaaag acaaaagctt	11460
	cgatcttcta attcttccgg cgcaaaacaa acaaatgaca ttcttgatac tcttcttaaa	11520
50	ctccatgaag ataatgagtt gagtatgcct gaaattaatc accttctcgt ggatatcttt	11580
	gacgccggaa cagacacaac agcaagcaca ttagaatggg caatggccga acttgtgaaa	11640
	aaccgggaaa tgatgactaa agttcaaatt gaaatcgaac aagctcttgg aaaagattgc	11700
55	ttagacatac aagaatccga catctcaaaa ctaccttatt tacaagccat tataaaagaa	11760
	acgttacgtt tacaccctcc tactgtgttt ttgctgcctc gaaaggcaga caatgacgta	11820
	gagttatatg gctacgttgt accaaagaat gctcaagtcc ttgtcaatct ttgggcaatt	11880
60	ggtcgtgatc caaaggatat gaaaaatccg gaagtatttt ctccctgaaag gtttttagat	11940

65

ES 2 930 456 T3

	tgcaatatcg attataaagg acgagatttc gaactttttac ccttttggtgc tggtagaagg	12000
	atatgccctg gacttacttt ggcataataga atgttgaact tgatggtggc tactcttctt	12060
5	caaaactaca attggaaact tgaagatggt atcaatccta aggatttaga catggatgag	12120
	aaatttggga ttacattgca aaagggttaa cctcttcaag ttattccagt tcccagaaac	12180
	taggcttggt gtggttgtct ggttgcgctc gttgcccggt gtctggtgcc cattgtggtg	12240
10	gttgtgtttg tatgatggtc gttaaggatc atcaatgtgt ttctcgctttt tgttccattc	12300
	tgtttctcat ttgtgaataa taatggtatc tttatgaata tgcagtttgt ggtttctttt	12360
	ctgattgcag ttctgagcat tttgtttttg cttccgttta ctataccact tacagtttgc	12420
15	actaatttag ttgatatgcg agccatctga tgtttgatga ttcaaaggc gtttatgtaa	12480
	ctcgtacccg agtggatgga gaagagctcc attgccggtt tgtttcatgg gtggcggagg	12540
20	gcaactcctg ggaaggaaca aaagaaaaac cgtgatacga gttcatgggt gagagctcca	12600
	gcttgatccc ttctctgtcg atcaaatttg aatttttggg tcacggcagg ctcaacaagat	12660
	aatccaaagt aaaacataat gaatagtact tctcaatgat cacttatttt tagcaaatca	12720
25	gcaattgtgc atgtcaaagc atttcgggtg aagagaaaga gttgatgaat caaaatatct	12780
	gtagctggat caagaatctg aggcagttgt atgtatcaat gatctttccg ctacaatgat	12840
30	gttagctatc cgagtcaaag tgtttagtaa ttgcatactt cggcatcaca ttctggatga	12900
	cataataaat aggaagtctt cagatcccta aaaaattgag agctaataac attagtccta	12960
	gatgtaactg ggtgacaacc aagaaagaga catgcaaata ctacttttgt ttgaaggagc	13020
35	atccctgggt tgacatatct tttctgaata tcaaactttg aaactctacc tagtctaagt	13080
	tctaacgaca gatcttactg gtttaactgc agtgatatct actatctttt ggaatgtttt	13140
40	ctccttcagt tatacatcaa gttccaagat gcagggtgtgc ttgattgatg tacatggctg	13200
	tgagaagtgc atcctgatgt tcagatgatg gttcattcta atgtcttttc cttcaatcag	13260
	ttttctcagt ctgacttagc ttgtttcatc tgcagtgttg aatgttcggt tactcatagt	13320
45	aattgcattt ttgtagcaga acatatcatt ggtcatgggt tcaactgtgc gcgagtctta	13380
	tgtttattca aactaggaag gcctccgtct agaggggtaca cgagttgttg ctctgtgtgc	13440
	gtcagtccat agtattaatc ttgctagtgt tagtatattg tttatgtgga ctcggaattc	13500
50	atcatatgct ccttctttgc atcaagtaag gcaaggtaat gtatagaagc tttttaactc	13560
	tttcatggaa gctggccttt gccagcatac catccagaag atatcaaccc tgcactcttg	13620
55	ctgccg	13626

<210> 26

<211> 16 818

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector de sobreexpresión pDOPA3

<400> 26

65

ES 2 930 456 T3

	cgctgtcatg agacgaattc tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc	60
	gtttattaga ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatccgt tcgtccattt	120
5	gtatgtgcat gccaacca gggttcccct cgggatcaaa gtactttgat ccaaccctc	180
	cgctgtctata gtgcagtcgg cttctgacgt tcagtgcagc cgtcatctga aaacgacatg	240
	tcgcacaagt cctaagttac gcgacaggct gccgccctgc ccttttcctg gcgttttctt	300
10	gtcgcgtgtt ttagtcgcat aaagtagaat acttgcgact agaaccggag acattacgcc	360
	atgaacaaga gcgccgccgc tggcctgctg ggctatgccc gcgtcagcac cgacgaccag	420
15	gacttgacca accaacgggc cgaactgcac gcggccggct gcaccaagct gttttccgag	480
	aagatcacccg gcaccaggcg cgaccgcccg gagctggcca ggatgcttga ccacctacgc	540
	cctggcgacg ttgtgacagt gaccaggcta gaccgcctgg cccgcagcac ccgcgacct	600
20	ctggacattg ccgagcgcat ccaggaggcc ggccggggcc tgcgtagcct ggcagagccg	660
	tgggccgaca ccaccacgcc ggccggccgc atggtgttga ccgtgttcgc cggcattgcc	720
25	gagttcgagc gttccctaata catcgaccgc acccgagagc ggccgcaggc cgccaaggcc	780
	cgaggcgtga agtttgggcc ccgccctacc ctacccccgg cacagatcgc gcacgcccgc	840
	gagctgatcg accaggaag ccgcaccgtg aaagaggcgg ctgcactgct tggcgtgcat	900
30	cgctcgacct tgtaccgcgc acttgagcgc agcgaggaag tgacgcccac cgaggccagg	960
	cggcgcggtg ccttccgtga ggacgcattg accgaggccg acgccctggc ggccgccgag	1020
35	aatgaacgcc aagaggaaca agcatgaaac cgcaccagga cggccaggac gaaccgtttt	1080
	tcattaccga agagatcgag gcggagatga tcgcggccgg gtacgtgttc gagccgcccg	1140
	cgcacctctc aaccgtgcgg ctgcatgaaa tcctggccgg tttgtctgat gccaagctgg	1200
40	cggcctggcc ggccagcttg gccgctgaag aaaccgagcg ccgccgtcta aaaaggtgat	1260
	gtgtatattga gtaaaacagc ttgcgtcatg cggtcgctgc gtatatgatc cgatgagtaa	1320
45	ataaacaat acgcaagggg aacgcatgaa ggttatcgct gtacttaacc agaaaggcgg	1380
	gtcaggcaag acgaccatcg gaaccatct agcccgcgcc ctgcaactcg ccggggccga	1440
	tgttctgtta gtcgattccg atccccaggg cagtgcgccg gattgggcgg ccgtgcggga	1500
50	agatcaaccg ctaaccgttg tcggcatcga ccgcccgacg attgaccgag acgtgaaggc	1560
	catcgggccg cgcgacttcg tagtgatcga cggagcgccc caggcggcgg acttggtgt	1620
	gtccgcgatc aaggcagccg acttcgtgct gattccggtg cagccaagcc cttacgacat	1680
55	atgggcccacc gccgacctg tggagctggt taagcagcgc attgaggtca cggatggaag	1740

60

65

ES 2 930 456 T3

	gctacaagcg gcctttgtcg tgtcgcgggc gatcaaaggc acgcgcacatcg gcggtgaggt	1800
	tgccgaggcg ctggccgggt acgagctgcc cattcttgag tcccgtatca cgcagcgcgt	1860
5	gagctacca ggcactgccg ccgccggcac aaccgttctt gaatcagaac ccgagggcga	1920
	cgctgcccgc gaggtccagg cgctggccgc tgaattataa tcaaaactca tttgagttaa	1980
	tgaggtaaag agaaaatgag caaaagcaca aacacgctaa gtgccggccg tccgagcgca	2040
10	cgcagcagca aggctgcaac gttggccagc ctggcagaca cgccagccat gaagcgggtc	2100
	aactttcagt tgccggcgga ggatcacacc aagctgaaga tgtacgcggt acgccaaggc	2160
15	aagaccatta ccgagctgct atctgaatag atcgcgagc taccagagta aatgagcaaa	2220
	tgaataaatg agtagatgaa ttttagcggc taaaggaggc ggcatggaaa atcaagaaca	2280
	accaggcacc gacgccgtg aatgccccat gtgtggagga acgggcgggtt ggccagcgct	2340
20	aagcggcttg gttgtctgcc ggccctgcaa tggcactgga accccaagc ccgaggaatc	2400
	ggcgtgacgg tcgcaaacca tccggcccgc taaaaatcg cgcggcgctg ggtgatgacc	2460
	tggtggagaa gttgaaggcc gcgcaggccg ccagcggca acgcacgag gcagaagcac	2520
25	gccccggtga atcgtggcaa gcggccgctg atcgaatccg caaagaatcc cggcaaccgc	2580
	cggcagccgg tcgcccgtcg attaggaagc cgcccaagg cgacgagcaa ccagattttt	2640
30	tcgttccgat gctctatgac gtgggcaccc gcgatagtcg cagcatcatg gacgtggccg	2700
	ttttccgtct gtcgaagcgt gaccgacgag ctggcgaggt gatccgctac gagcttccag	2760
	acgggcacgt agaggtttcc gcagggccgg ccggcatggc cagtgtgtgg gattacgacc	2820
35	tggtactgat ggcggtttcc catctaaccg aatccatgaa ccgataaccg gaagggaagg	2880
	gagacaagcc cggccgcgtg ttccgtccac acgttgcgga cgtactcaag ttctgccggc	2940
40	gagccgatgg cggaaagcag aaagacgacc tggtagaaac ctgcattcgg ttaaacacca	3000
	cgcacgttgc catgcagcgt acgaagaagg ccaagaacgg ccgcctggtg acggtatccg	3060
	agggtgaagc cttgattagc cgctacaaga tcgtaaagag cgaaaccggg cggccggagt	3120
45	acatcgagat cgagctagct gattggatgt accgcgagat cacagaaggc aagaaccggg	3180
	acgtgctgac gggtcacccc gattactttt tgatcgatcc cggcatcggc cgttttctct	3240
	accgcctggc acgccgcgcc gcaggcaagg cagaagccag atggttggtc aagacgatct	3300
50	acgaacgcag tggcagcgcc ggagagttca agaagttctg tttcacctg cgcaagctga	3360
	tcgggtcaaa tgacctgccg gactacgatt tgaaggagga ggcggggcag gctggcccga	3420
55	tcctagtcac gcgctaccgc aacctgatcg agggcgaagc atccgcgggt tcctaagtga	3480
	cggagcagat gctagggcaa attgccctag caggggaaaa aggtcgaaaa ggactctttc	3540
60	ctgtggatag cacgtacatt gggaacccaa agccgtacat tgggaaccgg aaccctgata	3600

65

ES 2 930 456 T3

	ttgggaaccc aaagccgtac attgggaacc ggtcacacat gtaagtgact gatataaaag	3660
	agaaaaaagg cgatTTTTcc gcctaaaact ctttaaaact tattaaaact cttaaaaccc	3720
5	gcctggcctg tgcataactg tctggccagc gcacagccga agagctgcaa aaagcgccta	3780
	cccttcggtc gctgcgctcc ctacgccccg ccgcttcgcg tcggcctatc gcggccgctg	3840
	gccgctcaaa aatggctggc ctacggccag gcaatctacc agggcgcgga caagccgcgc	3900
10	cgtcgccact cgaccgccgg cgcccacatc aaggcaccct gcctcgcgcg ttctcgtgat	3960
	gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggtgacgg tcacagcttg tctgtaagcg	4020
15	gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc	4080
	gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat	4140
	cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	4200
20	ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttcgg ctccctcgct cactgactcg ctgcgctcgg	4260
	tcgttcgggt gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	4320
	aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	4380
25	gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtTTTTcc ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca	4440
	aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	4500
30	ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc	4560
	tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc	4620
	tcagttcgggt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc	4680
35	ccgaccgctg cgcccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggtg agacacgact	4740
	tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg gtaggcggtg	4800
40	ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg	4860
	tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca	4920
	aacaaaccac cgctggtagc ggtggTTTTt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa	4980
45	aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	5040
	aaaactcacg ttaagggatt ttgggtcatgc attctaggtg attagaaaaa ctcatcgagc	5100
50	atcaaagtaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc	5160
	cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg	5220
	tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgta	5280
55	aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgacga ctgaatccgg tgagaatggc	5340
	aaaagtttat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctcgatcatca	5400
	aatcactcg catcaaccaa accgttatct attcgtgatt gcgcctgagc gagtcgaaat	5460
60	acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac	5520

65

ES 2 930 456 T3

	actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat	5580
	gctgttttcc ctgggatcgc agtgggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa	5640
5	tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct	5700
	gtaacatcat tggcaacgct acctttgccg tgtttcagaa acaactctgg cgcacgggc	5760
	ttcccataca atcggtagat tgtcgcacct gattgcccgga cattatcgcg agcccattta	5820
10	tacccatata aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gccttgagca agacgtttcc	5880
	cgttgaatat ggctcataac agaacttatt atttccttcc tcttttctac agtatttaaa	5940
15	gataccccaa gaagctaatt ataacaagac gaactccaat tcaactgttcc ttgcattcta	6000
	aaaccttaaa taccagaaaa cagctttttc aaagtgtgtt tcaaagttgg cgtataacat	6060
	agtatcgacg gagccgattt tgaaaccgcg gtgatcacag gcagcaacgc tctgtcatcg	6120
20	ttacaatcaa catgctaccc tccgcgagat catccgtgtt tcaaaccgcg cagcttagtt	6180
	gccgttcttc cgaatagcat cggtaacatg agcaaagtct gccgccttac aacggctctc	6240
25	ccgctgacgc cgtcccgac tgatgggctg cctgtatcga gtggtgattt tgtgccgagc	6300
	tgccggtcgg ggagctgttg gctggctggt ggcaggatat attgtggtgt aacataacg	6360
	aattcgtctc aggagagcgt cgatctagta acatagatga caccgcgcgc gataatttat	6420
30	cctagtttgc gcgctatatt ttgttttcta tcgcgtatta aatgtataat tgcgggactc	6480
	taatcataaa aaccatctc ataaataacg tcatgcatta catgttaatt attacatgct	6540
35	taacgtaatt caacagaaat tatatgataa tcatcgcaag accggcaaca ggattcaatc	6600
	ttaagaaact ttattgcaa atgtttgaac gatctgcttc gacgcactcc ttctttactc	6660
	caccatctcg tccttattga aaacgtgggt agcaccaaaa cgaatcaagt cgctggaact	6720
40	gaagttacca atcacgctgg atgatttgcc agttggatta atcttgccct tccccgcatg	6780
	aataatattg atgaatgcat gcgtgagggg tagttcgatg ttggcaatag ctgcaattgc	6840
	cgcgacatcc tccaacgagc ataattcttc agaaaaatag cgatgttcca tgttgtcagg	6900
45	gcatgcatga tgcacgttat gaggtgacgg tgctaggcag tattccctca aagtttcata	6960
	gtcagtatca tattcatcat tgcattcctg caagagagaa ttgagacgca atccacacgc	7020
50	tgccggcaacc ttccggcggt cgtggtctat ttgctcttgg acgttgcaaa cgtaagtgtt	7080
	ggatcgggggt gggcgaagaa ctccagcatg agatccccgc gctggaggat catccagccg	7140
	gcgtcccggg aaacgattcc gaagcccaac ctttcataga aggcggcggt ggaatcgaaa	7200
55	tctcgtgatg gcaggttggg cgtcgcttgg tcggtcattt cgaaccccag agtcccgcctc	7260
	agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcggga gcggcgatac	7320
60	cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaaag ctcttcagca atatcacggg	7380

65

ES 2 930 456 T3

	tagccaacgc	tatgtcctga	tagcgggtccg	ccacacccag	ccggccacag	togatgaatc	7440
	cagaaaagcg	gccattttcc	accatgatat	tcggcaagca	ggcatcgcca	tgggtcacga	7500
5	cgagatcctc	gccgtcgggc	atgcgcgcct	tgagcctggc	gaacagttcg	gctggcgcgga	7560
	gcccctgatg	ctcttcgtcc	agatcatcct	gatcgacaag	accggcttcc	atccgagtac	7620
	gtgctcgctc	gatgcgatgt	ttcgcttggt	ggtcgaatgg	gcaggtagcc	ggatcaagcg	7680
10	tatgcagccg	ccgcattgca	tcagccatga	tggatacttt	ctcggcagga	gcaaggtgag	7740
	atgacaggag	atcctgcccc	ggcacttcgc	ccaatagcag	ccagtccctt	cccgccttcag	7800
15	tgacaacgtc	gagcacagct	gcgcaaggaa	cgcccgtcgt	ggccagccac	gatagccgcg	7860
	ctgcctcgtc	ctgcagttca	ttcagggcac	cggacaggtc	ggtcttgaca	aaaagaaccg	7920
	ggcgcccctg	cgctgacagc	cggaacacgg	cggcatcaga	gcagccgatt	gtctgttgtg	7980
20	cccagtcata	gccgaatagc	ctctccaccc	aagcggccgg	agaacctgcc	cggatccggg	8040
	cggaaatagg	taaagaagtt	gcggataagg	taattgccat	tgcagattat	ttggattgag	8100
25	agtgaatatg	agactctaata	tggataaccga	ggggaattta	tggaacgtca	gtggagcatt	8160
	tttgacaaga	aatatttgct	agctgatagt	gaccttaggc	gacttttgaa	cgcgcaataa	8220
	tggtttctga	cgtatgtgct	tagctcatta	aactccagaa	acctctccgt	caggagacta	8280
30	gagccaagct	gatctccttt	gccccggaga	tcaccatgga	cgactttctc	tatctctacg	8340
	atctaggaag	aaagttcgac	ggagaagggtg	acgataccat	gttcaccacc	gataatgaga	8400
35	agattagcct	cttcaatttc	agaaagaatg	ctgacccaca	gatgggttaga	gaggcctacg	8460
	cggcaggtct	gatcaagacg	atctacccga	gtaataatct	ccaggagatc	aaataccttc	8520
	ccaagaaggt	taaagatgca	gtcaaaagat	tcaggactaa	ctgcatcaag	aacacagaga	8580
40	aagatatatt	tctcaagatc	agaagtacta	ttccagtatg	gacgattcaa	ggcttgcttc	8640
	ataaaccaag	gcaagtaata	gagattggag	tctctaagaa	agtagttcct	actgaatcaa	8700
45	aggccatgga	gtcaaaaatt	cagatcgagg	atctaacaga	actcgccgtg	aagactggcg	8760
	aacagttcat	acagagtctt	ttacgactca	atgacaagaa	gaaaatcttc	gtcaacatgg	8820
	tggagcacga	cactctcgtc	tactccaaga	atatcaaaga	tacagtctca	gaagaccaa	8880
50	gggctattga	gacttttcaa	caaagggtaa	tatcgggaaa	cctcctcgga	ttccattgcc	8940
	cagctatctg	tcacttcac	aaaaggacag	tagaaaagga	aggtggcacc	tacaaatgcc	9000
55	atcattgcga	taaaggaaag	gctatcgttc	aagatgcctc	tgccgacagt	ggtcccaaag	9060
	atggaccccc	accacgagg	agcatcggtg	aaaaagaaga	cgttccaacc	acgtcttcaa	9120
	agcaagtgga	ttgatgtgat	atctccactg	acgtaaggga	tgacgcacaa	tcccactatc	9180
60	cttcgcaaga	cccttctct	atataaggaa	gttcatttca	tttgagagg	actccggtat	9240
	ttttacaaca	ataccacaac	aaaacaaaca	acaaacaaca	ttacaattta	ctattctagt	9300
65							

ES 2 930 456 T3

	cgaaatggat aacgcaacac ttgctgtgat cctttccatt ttgtttgtgt tttaccacat	9360
	tttcaaatcc tttttcacca attcttcacg tcgtaggctt cctcctgggc ccaaaccggt	9420
5	gccaattttt ggcaacattt tcgatcttgg cgaaaagcct catcgatctt ttgccaatct	9480
	atctaaaatt cacggccctt tgattagcct aaagttagga agtgtaacaa ctattgttgt	9540
10	ttcctcggcc tctgtggccg aggaaatgtt ccttaaaaaat gaccaagcac ttgctaaccg	9600
	aaccattcct gactcgggta gggctgggtga ccacgacaaa ttatccatgt cgtgggttgc	9660
	tgtttcccaa aaatggagaa atatgagaaa aatctccgct gtccaattac tctccaacca	9720
15	aaaacttgat gctagtcaac ctcttagaca agctaagggtg aaacaacttt tatcatacgt	9780
	acaagtttgt tccgaaaaaa tgcaaccggt cgatattgga cggggccgcat ttacaacgtc	9840
20	acttaattta ttatcaaaca cttttttctc aatcgaatta gcaagtcatt aatctagtgc	9900
	ttccaagag ttttaacaac tcatgtggaa tattatggag gaaattggaa ggcctaatta	9960
	tgctgatttt ttccctattc ttgggttacct tgatcccttt ggtataagac gtcgtttggc	10020
25	tggttacttt gataaactca ttgatgtttt ccaagacatt attcgtgaaa gacaaaagct	10080
	tcgatcttct aattcttccg gcgcaaaaaca aacaaatgac attcttgata ctcttcttaa	10140
30	actccatgaa gataatgagt tgagtatgcc tgaaattaat caccttctcg tggatatctt	10200
	tgacgccgga acagacacaa cagcaagcac attagaatgg gcaatggccg aacttgtgaa	10260
	aaaccgggaa atgatgacta aagttcaaat tgaaatcgaa caagctcttg gaaaagattg	10320
35	cttagacata caagaatccg acatctcaaa actaccttat ttacaagcca ttataaaaga	10380
	aacgttacgt ttacaccctc ctactgtgtt tttgctgcct cgaaaggcag acaatgacgt	10440
40	agagttatat ggctacgttg taccaaagaa tgctcaagtc cttgtcaatc tttgggcaat	10500
	tggtcgtgat ccaaagggtat ggaaaaatcc ggaagtattt tctcctgaaa ggtttttaga	10560
	ttgcaatatc gattataaag gacgagattt cgaactttta ccctttgggtg ctggtagaag	10620
45	gatatgccct ggacttactt tggcatatag aatggtgaac ttgatgttgg ctactcttct	10680
	tcaaaactac aattggaaac ttgaagatgg tatcaatcct aaggatttag acatggatga	10740
50	gaaatttggtg attacattgc aaaagggttaa acctcttcaa gttattccag ttcccagaaa	10800
	ctaggcttgc tctcaagatc aaaggcttaa aaagctgggg ttttatgaat gggatcaaag	10860
	tttctttttt tctttttatat ttgcttctcc atttggttgt ttcatttccc tttttgtttt	10920
55	cgtttctatg atgcacttgt gtgtgacaaa ctctctgggt ttttacttac gtctgcgttt	10980
	caaaaaaaaa aaccgctttc gttttgcgtt ttagtcccat tgttttgtag ctctgagtga	11040
60	tcgaattgat gcctctttat tccttttgtt ccctataatt tctttcaaaa ctcagaagaa	11100
	aaaccttgaa actctttgca atgttaatat aagtattgta taagattttt attgatttgg	11160

65

ES 2 930 456 T3

	ttattagtct tacttttgct acctccatct tcacttggaa ctgatattct gaatagttaa	11220
	agcgttacat gtcttccatt cacaaatgaa cttaaactag cacaaagtca gatattttaa	11280
5	gatcgacca ttttatataa cccaatcgt caattctact gtttcaagtt ttacaccaaa	11340
	acaattacga ggtgtatcta ttcgttactc ttttcgctta ttaatccttt tacatgatgc	11400
	aaaatataac aaattaattht caaattgtcc tgcacatttg gtttatacat cttgattcca	11460
10	aaaagtcgct gtcaggagat acatgagaat taaggaggatc acggtatgac ccccgccgat	11520
	gacgcgggac aagccgtttt acgtttggaa ctgacagaac cgcaacggtg aaggagccac	11580
15	tgagccgagg gtttctggag tttaatgagc taagcacata cgtcagaaac cattattgag	11640
	cgttcaaaag tgcctaagg tcactatcag ctagcaaata tttcttgtca aaaatgctcc	11700
	actgacgttc cataaattcc cctcggtatc caattagagt ctcatattca ctctcaactc	11760
20	gatcgaggca atgatggcta tggaagtggg ttatcttcgg cactcgacaa cgatcaccaa	11820
	cggactgtgt tgtaactgtg atccgaagcc ccgaggagca cgtcgtgtac agactaggct	11880
	gcctggcacc ctgtgtctcg tcaaggatac ctttacctct agcaaagcta aactaaaaaa	11940
25	gccgtcgag agagaaatct ttctaacaag taggaagagg ctgaatcaga tacaagctgt	12000
	ttcaacggct gaaaaggaga gagaggcaga caaaacatcc actccaccta ttcccagtag	12060
30	catccacgat atttcaaatg gagatcacat tcttggcttc ggagccgatt tgaccgaaga	12120
	tcacctggc taccatgatc ttgaatataa gaggaggcgt agtcgtattg ctgaccttgc	12180
	gaagatacat aaaatagggtg aacccattcc ttgctgggac tacacatcgg aagagattcg	12240
35	tgtgtgggggt catgtgttag atactctagt ggacctctac ccaactcatg cttgtaagga	12300
	atacctgaat tgctacgagc tgtttaactt caagccaaac tatattccac agctgcaaga	12360
40	actttcggag gtccctggaac ggagcacagg atggcacatc cggccagtag ctggactcct	12420
	ccaccctcgt gacttcctaa acgggtctagc cttccgcact ttccattcaa cccagtatgt	12480
	tcggcatggc agcaatccca tgtacacccc cgagccagac atttgtcacg aggttttagg	12540
45	ccacgtcccc attctggctg atccggaggtt tgctgactta gcttgggcca ttggccaagc	12600
	ttctctgggt gcttcagaga aggatatctg gcaccttacg aagctctact ggtacactgt	12660
	ggagtttggc acagtaaagg aaggtaacga gattaaagcg ttcggtgcag gccttctgtc	12720
50	tagttttggg gagctgaagc acatgcgggt ggggacggat ggattcatgc ctgagttcgt	12780
	ggagcttgac ccgtttaaga agatgoccaa gatgagctac aaagacgggt accagaagag	12840
55	gtattttcta tgcgagagct ttgcagatgc agcggcaaag cttagggcgt attccagaag	12900
	cattctgaag cctgaggtgc agtccatcaa gtttgagat acgccaatcc ggctctaagc	12960
	ttatatgaag atgaagatga aatatttgggt gtgtcaaata aaaagcttgt gtgcttaagt	13020
60	ttgtgttttt ttcttggctt gttgtgttat gaatttgtgg ctttttctaa tattaaatga	13080

65

ES 2 930 456 T3

	atgtaagatc	tcattataat	gaataaacia	atgtttctat	aatccattgt	gaatgttttg	13140
	ttggatctct	tctgcagcat	ataactactg	tatgtgctat	ggtatggact	atggaatatg	13200
5	attaaagata	agcgctgtca	ggagccgtac	aaaattgatt	attgatgtca	caaatcaatc	13260
	agagctaaat	tccaaaaaaa	atatgatctt	tgaactttgc	atcaataact	aacgattcta	13320
	ggaagagccc	atttcgattt	caacaaaaag	atgagagctt	gattacatat	aaaatcaaga	13380
10	gaaattaacg	acattgaaga	gaattcgatc	tcgaaaccgg	aaacaaagac	ttataagtcg	13440
	attagtctaa	ttcaatgcag	aagaaagaat	accaggtttg	gccttcacga	tggaaagctt	13500
15	cggatttggg	gccaaagtct	ataaacgcc	ttgtggaaga	aagtcttgag	ttggtggtaa	13560
	tgtaacagag	tagtaagaac	agagaagaga	gagagtgtga	gatacatgaa	ttgtcgggca	13620
	acaaaaatcc	tgaacatctt	attttagcaa	agagaaagag	ttccgagtct	gtagcagaag	13680
20	agtgaggaga	aatttaagct	cttggacttg	tgaattgttc	cgcctcttga	atacttcttc	13740
	aatcctcata	tattcttctt	ctatgttacc	tgaaaaccgg	catttaatct	cgcgggttta	13800
25	ttccggttca	acatTTTTTT	tgttttgagt	tattatctgg	gcttaataac	gcaggcctga	13860
	aataaattca	aggcccaact	gttttttttt	ttaagaagtt	gctgttaaaa	aaaaaaaaag	13920
	ggaattaaca	acaacaacia	aaaaagataa	agaaaataat	aacaattact	ttaattgtag	13980
30	actaaaaaaaa	catagatttt	atcatgaaaa	aaagagaaaa	gaaataaaaa	cttgatcaa	14040
	aaaaaaaaaac	atacagatct	tctaattatt	aacttttctt	aaaaattagg	tcctttttcc	14100
	caacaattag	gttttagagt	ttggaattaa	acaaaaaaga	ttgttctaaa	aaatactcaa	14160
35	atttggtaga	taagtttcct	tattttaatt	agtcaatggt	agatactttt	ttttcttttc	14220
	tttattagag	tagattagaa	tcttttatgc	caagtattga	taaattaaat	caagaagata	14280
40	aactatcata	atcaacatga	aattaaaaga	aaaatctcat	atatagtatt	agtattctct	14340
	atataatatta	tgattgctta	ttcttaatgg	gttgggttaa	ccaagacata	gtcttaatgg	14400
	aaagaatctt	ttttgaactt	tttccttatt	gattaaattc	ttctatagaa	aagaaagaaa	14460
45	ttatttgagg	aaaagtatat	acaaaaagaa	aaatagaaaa	atgtcagtga	agcagatgta	14520
	atggatgacc	taatccaacc	accaccatag	gatgtttcta	cttgagtcgg	tcttttaaaa	14580
50	acgcacggtg	gaaaatatga	cacgtatcat	atgattcctt	ccttttagttt	cgtgataata	14640
	atcctcaact	gatattctcc	tttttttggt	ttggctaaag	atattttatt	ctcattaata	14700
	gaaaagacgg	ttttgggctt	ttggtttgcg	atataaagaa	gaccttcgtg	tggaaagataa	14760
55	taattcatcc	tttcgtcttt	ttctgactct	tcaatctctc	ccaaagccta	aagcgatctc	14820
	tgcaaactct	tcgcgactct	ctctttcaag	gtatattttc	tgattctttt	tgtttttgat	14880
60	tcgtatctga	tctccaattt	ttgttatgtg	gattattgaa	tcttttgtat	aaattgcttt	14940

65

ES 2 930 456 T3

	tgacaatatt gttcgtttcg tcaatccagc ttctaaatth tgtcctgatt actaagatat	15000
	cgattcgttag tgtttacatc tgtgtaatth cttgcttgat tgtgaaatta ggattttcaa	15060
5	ggacgatcta ttcaatthtt gtgttttctt tgttcgattc tctctgttht aggtttctta	15120
	tgttttagatc cgthttctctt tgggtgttgtt ttgatttctc ttacggcttht tgatttggtta	15180
	tatgttcgct gattggthtc tacttgthtc attgtthttat ttcagaatgg cttctatgat	15240
10	atcctcttca gctgtgacta cagtcagccg tgcttctacg gtgcaatcgg ccgcggtggc	15300
	tccattcggc ggcctcaaht ccatgactgg attcccagtht aagaaggtca acactgacat	15360
15	tacttccatt acaagcaatg gtggaagagt aaagtgcath ctgatgaatt atcagaacga	15420
	cgattttacgc atcaaagaaa tcaaagagtht acttccctct gtcgcattgc tggaaaaatt	15480
	ccccgctact gaaaatgccg cgaatacggtht tgcccathgc cgaaaagcga tccataagat	15540
20	cctgaaaggt aatgatgatc gcctgttggt tgtgattggc ccatgctcaa ttcathatcc	15600
	tgtcgcggca aaagagtatg ccaactcgctt gctggcgctg cgtgaagagc tgaaagatga	15660
25	gctggaaatc gtaatgcgcg tctatthttga aaagccgcgt accacggtgg gctggaaagg	15720
	gctgattaac gatccgcata tggataatag cttccagatc aacgacggtht tgcgtatagc	15780
	ccgtaaattg ctgcttgata ttaacgacag cggctctgcca gcggcaggtg agthttctcga	15840
30	tatgatcacc ccacatathc tcgctgacct gatgagctgg ggcgcaattg gcgcacgtac	15900
	caccgaatcg caggtgcacc gcgaacaggc atcagggtctt tcttgtccgg tcggcttcaa	15960
35	aatggcacc gacggtacga ttaagtggtc tatcgatgcc attaatgccg ccggtgcgcc	16020
	gcaactgcttc ctgtccgtaa cgaaatgggg gcattcggcg attgtgaata ccagcggtaa	16080
	cggcgattgc catatcattht tgcgcggcggt taaagagcct aactacagcg cgaagcacgt	16140
40	tgctgaagtg aaagaagggc tgaacaaagc aggcctgcca gcacaggtga tgatcgattt	16200
	cagccatgct aactcgthca aacaattcaa aaagcagatg gatgtttgtg ctgacgttht	16260
45	ccagcagatt gccggtggcg aaaaggccat tattggcgtht atggtggaaa gccatctggt	16320
	ggaaggcaat cagagcctcg agagcgggga gccgctggcc tacggttaaga gcatcaccga	16380
	tgctgcathc ggctgggaag ataccgatgc tctgttacgt caactggcga atgcagtaaa	16440
50	agcgcgtcgc ggggaattca tctthttacc atacgatgtht cctgactatg cgggctatcc	16500
	ctatgacgthc ccggactatg caggatccta tccathatgac gthccagatt acgctgctca	16560
55	gtaggcttht atgaagatga agatgaaata tttggtgtgt caaataaaaa gcttgtgtgc	16620
	ttaagthttgt gththththct tggcttgtht tgthtatgaat ttgtggcttht ttctaatatt	16680
	aatgaatgt aagatctcat tataatgaat aaacaaatgt ttctataathc cattgtgaat	16740
60	gtthttgttg atctctctg cagcatataa ctactgtatg tgctatggta tggactatgg	16800
	aatatgatta aagataag	16818

<210> 27
 <211> 18 647
 <212> ADN

ES 2 930 456 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Vector de sobreexpresión pDOPA4

5 <400> 27

	cgctgtcatg agacgaattc tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc	60
	gtttattaga ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatccgt tcgtccattt	120
10	gtatgtgcat gccaaaccaca gggttcccct cgggatcaaa gtactttgat ccaaccctc	180
	cgctgctata gtgcagtcgg cttctgacgt tcagtgcagc cgtcatctga aaacgacatg	240
15	tcgcacaagt cctaagttac gcgacaggct gccgccctgc ccttttctctg gcgttttctt	300
	gtcgcgtgtt ttagtcgcat aaagtagaat acttgcgact agaaccggag acattacgcc	360
	atgaacaaga gcgccgccgc tggcctgctg ggctatgcc gcgtcagcac cgacgaccag	420
20	gacttgacca accaacgggc cgaactgcac gcggccggct gcaccaagct gttttccgag	480
	aagatcaccg gcaccaggcg cgaccgcccg gagctggcca ggatgcttga ccacctacgc	540
25	cctggcgacg ttgtgacagt gaccaggcta gaccgcctgg ccgcagcac ccgcgacct	600
	ctggacattg ccgagcgcat ccaggaggcc ggcgcggggc tgcgtagcct ggagagccg	660
	tgggccgaca ccaccacgcc ggccggccgc atggtgttga ccgtgttcgc cggcattgcc	720
30	gagttcgagc gttccctaata catcgaccgc acccgagcgc ggccgcaggc cgccaaggcc	780
	cgaggcgtga agtttgggcc ccgccctacc ctacccccgc cacagatcgc gcacgcccgc	840
35	gagctgatcg accaggaagg ccgcaccgtg aaagaggcgc ctgcactgct tggcgtgcat	900
	cgctcgacct tgtaccgcgc acttgagcgc agcgaggag tgacgcccac cgaggccagg	960
	cggcgcggtg ccttccgtga ggacgcattg accgaggccg acgccctggc ggccgccgag	1020
40	aatgaacgcc aagaggaaca agcatgaaac cgcaccagga cggccaggac gaaccgtttt	1080
	tcattaccga agagatcgag gcggagatga tcgcggccgc gtacgtgttc gagccgcccg	1140
	cgcacctctc aaccgtgcgc ctgcatgaaa tcctggccgc tttgtctgat gccaaagctg	1200
45	cggcctggcc ggccagcttg gccgctgaag aaaccgagcgc ccgccgtcta aaaaggtgat	1260
	gtgtatttga gtaaaacagc ttgcgtcatg cggtcgctgc gtatatgatc cgatgagtaa	1320
50	ataaacaat acgcaagggg aacgcataaa ggttatcgct gtacttaacc agaaaggcgc	1380
	gtcaggcaag acgaccatcg gaaccatct agcccgccgc ctgcaactcg ccggggccga	1440
	tgttctgtta gtcgattccg atccccaggc cagtgccgc gattgggcgc ccgtgcggga	1500
55	agatcaaccg ctaaccgttg tcggcatcga ccgcccgacg attgaccgcg acgtgaaggc	1560
60		
65		

ES 2 930 456 T3

	catcggccgg	cgcgacttcg	tagtgatcga	cggagcgccc	caggcggcgg	acttggtgt	1620
	gtccgcgatc	aaggcagccg	acttcgtgct	gattccggtg	cagccaagcc	cttacgacat	1680
5	atgggccacc	gccgacctgg	tggagctggt	taagcagcgc	attgaggtca	cggatggaag	1740
	gctacaagcg	gcctttgtcg	tgctcgccgg	gatcaaaggc	acgcgcacatc	gcggtgaggt	1800
	tgccgagggc	ctggccgggt	acgagctgcc	cattcttgag	tcccgtatca	cgcagcgcgt	1860
10	gagctacca	ggcactgccg	ccgccggcac	aaccgttctt	gaatcagaac	ccgagggcga	1920
	cgtgcccgc	gaggtccagg	cgctggccgc	tgaattaaa	tcaaaactca	tttgagttaa	1980
	tgaggtaaag	agaaaatgag	caaaagcaca	aacacgctaa	gtgccggccg	tccgagcgca	2040
15	cgcagcagca	aggctgcaac	gttggccagc	ctggcagaca	cgccagccat	gaagcgggtc	2100
	aactttcagt	tgccggcgga	ggatcacacc	aagctgaaga	tgtacgcggt	acgccaaaggc	2160
20	aagaccatta	ccgagctgct	atctgaatag	atcgcgagc	taccagagta	aatgagcaaa	2220
	tgaataaatg	agtagatgaa	ttttagcggc	taaaggaggc	ggcatggaaa	atcaagaaca	2280
	accaggcacc	gacgccgtgg	aatgccccat	gtgtggagga	acgggcgggt	ggccaggcgt	2340
25	aagcggctgg	gttgtctgcc	ggccctgcaa	tggcactgga	acccccaagc	ccgaggaatc	2400
	ggcgtgacgg	tcgcaaacca	tccggcccgg	tacaaatcgg	cgcggcgctg	ggtgatgacc	2460
30	tggtggagaa	gttgaaggcc	gcgcaggccg	cccagcggca	acgcacagag	gcagaagcac	2520
	gccccggtga	atcgtggcaa	gcggccgctg	atcgaatccg	caaagaatcc	cggcaaccgc	2580
	cggcagccgg	tgccgcgtcg	attaggaagc	cgcaccaagg	cgcagagcaa	ccagattttt	2640
35	tcgttccgat	gctctatgac	gtgggcaccc	gcgatagtcg	cagcatcatg	gacgtggccg	2700
	ttttccgtct	gtcgaagcgt	gaccgacgag	ctggcgaggt	gatccgctac	gagcttccag	2760
	acgggcacgt	agagggtttcc	gcagggccgg	ccggcatggc	cagtgtgtgg	gattacgacc	2820
40	tggtactgat	ggcggtttcc	catctaaccg	aatccatgaa	ccgataccgg	gaagggaagg	2880
	gagacaagcc	cggccgcgtg	ttccgtccac	acgttgccga	cgtactcaag	ttctgcgggc	2940
45	gagccgatgg	cggaaagcag	aaagacgacc	tggtagaaac	ctgcattcgg	ttaaacacca	3000
	cgcacgttgc	catgcagcgt	acgaagaagg	ccaagaacgg	ccgcctgggt	acggtatccg	3060
	agggtgaagc	cttgattagc	cgtacaaga	tcgtaaagag	cgaaccggg	cggccggagt	3120
50	acatcgagat	cagagctagct	gattggatgt	accgcgagat	cacagaaggc	aagaaccggg	3180
	acgtgctgac	ggttcacccc	gattactttt	tgatogatcc	cggcatcggc	cgttttctct	3240
	accgcctggc	acgccgcgcc	gcaggcaagg	cagaagccag	atggttggtc	aagacgatct	3300
55	acgaacgcag	tggcagcgcc	ggagagttca	agaagttctg	tttcaccgtg	cgaagctga	3360
	tcgggtcaaa	tgacctgccg	gagtacgatt	tgaaggagga	ggcggggcag	gctggcccga	3420
60	tcctagtcac	gcgctaccgc	aacctgatcg	agggcgaagc	atccgcgggt	tcctaagtga	3480

65

ES 2 930 456 T3

	cggagcagat gctagggcaa attgccctag caggggaaaa aggtcgaaaa ggactctttc	3540
	ctgtggatag cacgtacatt gggaacccaa agccgtacat tgggaaccgg aaccctaca	3600
5	ttgggaaccc aaagccgtac attgggaacc ggtcacacat gtaagtgact gatataaaag	3660
	agaaaaaagg cgatTTTTcc gcctaaaact ctttaaaact tattaaaact cttaaaaccc	3720
	gcctggcctg tgcataactg tctggccagc gcacagccga agagctgcaa aaagcgcta	3780
10	cccttcggtc gctgcgtcc ctacgccccg ccgcttcgcg tcggcctatc gcggccgctg	3840
	gccgctcaaa aatggctggc ctacggccag gcaatctacc agggcgcgga caagccgcg	3900
15	cgtcgccact cgaccgccgg cgcccacatc aaggcacccct gcctcgcgcg tttcggtgat	3960
	gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggtgacgg tcacagcttg tctgtaagcg	4020
	gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc	4080
20	gcagccatga ccagtcacg tagcgatagc ggagtgtata ctggcttaac tatgcggcat	4140
	cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa	4200
25	ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcg	4260
	tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	4320
	aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	4380
30	gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtTTTTcc ataggtccg cccccctgac gagcatcaca	4440
	aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	4500
35	ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc	4560
	tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtag cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc	4620
	tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc	4680
40	ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact	4740
	tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg taggcgggtg	4800
	ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg	4860
45	tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca	4920
	aacaaaccac cgctggtagc ggtggTTTT ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa	4980
50	aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	5040
	aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatgc attctaggtg attagaaaaa ctcatcgagc	5100
	atcaaatgaa actgcaattt attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc	5160
55	cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg	5220
	tatcggtctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgta	5280
60	aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcga ctgaatccgg tgagaatggc	5340

65

ES 2 930 456 T3

	aaaagtttat	gcattttcttt	ccagacttgt	tcaacaggcc	agccattacg	ctcgtcatca	5400
	aaatcactcg	catcaaccaa	accgttattc	attcgtgatt	gcgcctgagc	gagtcgaaat	5460
5	acgcgatcgc	tgttaaaagg	acaattacaa	acaggaatcg	aatgcaaccg	gcgcaggaac	5520
	actgccagcg	catcaacaat	attttcacct	gaatcaggat	attcttctaa	tacctggaat	5580
	gctgttttcc	ctgggatcgc	agtggtgagt	aaccatgcat	catcaggagt	acggataaaa	5640
10	tgcttgatgg	tcggaagagg	cataaattcc	gtcagccagt	ttagtctgac	catctcatct	5700
	gtaacatcat	tggaacgct	acctttgcc	tgtttcagaa	acaactctgg	cgcacggggc	5760
	ttcccataca	atcggtagat	tgctgcacct	gattgcccga	cattatcgcg	agcccattta	5820
15	tacccatata	aatcagcatc	catgttgga	tttaatcgcg	gccttgagca	agacgtttcc	5880
	cgttgaatat	ggctcataac	agaacttatt	atttccttcc	tcttttctac	agtattttaa	5940
20	gataccccaa	gaagctaatt	ataacaagac	gaactccaat	tcaactgttc	ttgcattcta	6000
	aaaccttaaa	taccagaaaa	cagctttttc	aaagttgttt	tcaaagttgg	cgtataacat	6060
	agtatcgacg	gagccgattt	tgaaaccgcg	gtgatcacag	gcagcaacgc	tctgtcatcg	6120
25	ttacaatcaa	catgctaccc	tccgcgagat	catccgtggt	tcaaaccggg	cagcttagtt	6180
	gccgttcttc	cgaatagcat	cggtaacatg	agcaaagtct	gccgccttac	aacggctctc	6240
30	ccgctgacgc	cgtcccgagc	tgatgggctg	cctgtatcga	gtgggtgattt	tgtgccgagc	6300
	tgccggctcg	ggagctgttg	gctggctggg	ggcaggatat	attgtggtgt	aaacataacg	6360
	aattcgtctc	aggagagcgt	cgatctagta	acatagatga	caccgcgcgc	gataatttat	6420
35	cctagtttgc	gcgctatatt	ttgttttcta	tcgcgtatta	aatgtataat	tgccgggactc	6480
	taatcataaa	aacccatctc	ataaataacg	tcatgcatta	catgttaatt	attacatgct	6540
	taacgtaatt	caacagaaat	tatatgataa	tcacgcgaag	accggcaaca	ggattcaatc	6600
40	ttaagaaact	ttattgccaa	atgtttgaac	gatctgcttc	gacgcactcc	ttctttactc	6660
	caccatctcg	tccttattga	aaacgtgggt	agcaccaaaa	cgaatcaagt	cgttggaact	6720
45	gaagttacca	atcacgctgg	atgatttgcc	agttggatta	atcttgcttc	tcccgcgatg	6780
	aataatattg	atgaatgcat	gcgtgagggg	tagttcgatg	ttggcaatag	ctgcaattgc	6840
	cgcgacatcc	tccaacgagc	ataattcttc	agaaaaatag	cgatgttcca	tggtgtcagg	6900
50	gcatgcatga	tgcaagttat	gaggtgacgg	tgctaggcag	tattccctca	aagtttcata	6960
	gtcagtatca	tattcatcat	tgcatctctg	caagagagaa	ttgagacgca	atccacacgc	7020
55	tgccggcaacc	ttccggcggt	cgtggtctat	ttgctcttgg	acgttgcaaa	cgtaagtgtt	7080
	ggatcggggg	gggcgaagaa	ctccagcatg	agatccccgc	gctggaggat	catccagccg	7140
	gcgtcccga	aaacgattcc	gaagcccaac	ctttcataga	aggcggcggt	ggaatcgaaa	7200
60	tctcgtgatg	gcagggtggg	cgctcgcttg	tcgggtcattt	cgaaccccag	agtcccgcctc	7260

65

ES 2 930 456 T3

	agaagaactc	gtcaagaagg	cgatagaagg	cgatgcgctg	cgaatcggga	gcggcgatac	7320
	cgtaaagcac	gaggaagcgg	tcagcccatt	cgccgccaaag	ctcttcagca	atatcacggg	7380
5	tagccaacgc	tatgtcctga	tagcgggtccg	ccacacccag	ccggccacag	tcgatgaatc	7440
	cagaaaagcg	gccattttcc	accatgatat	tcggcaagca	ggcatcgcca	tgggtcacga	7500
	cgagatcctc	gccgtcgggc	atgcgcgcct	tgagcctggc	gaacagttcg	gctggcgcg	7560
10	gcccctgatg	ctcttcgtcc	agatcatcct	gatcgacaag	accggcttcc	atccgagtac	7620
	gtgctcgctc	gatgcgatgt	ttcgcttggt	ggtcgaatgg	gcaggtagcc	ggatcaagcg	7680
15	tatgcagccg	ccgcattgca	tcagccatga	tggatacttt	ctcggcagga	gcaaggtgag	7740
	atgacaggag	atcctgcccc	ggcacttcgc	ccaatagcag	ccagtccctt	cccgttcag	7800
	tgacaacgtc	gagcacagct	gcgcaaggaa	cgcccgtcgt	ggccagccac	gatagccgcg	7860
20	ctgcctcgtc	ctgcagttca	ttcagggcac	cggacaggtc	ggtcttgaca	aaaagaaccg	7920
	ggcgcccctg	cgctgacagc	cggaacacgg	cggcatcaga	gcagccgatt	gtctgttgtg	7980
25	cccagtcata	gccgaatagc	ctctccaccc	aagcggccgg	agaacctgcc	cggatccggg	8040
	cggaaatagg	taaagaagtt	gcggataagg	taattgccat	tcagagttat	ttggattgag	8100
	agtgaatatg	agactcta	tggtatccga	ggggaattta	tggaaacgtca	gtggagcatt	8160
30	tttgacaaga	aatatttgct	agctgatagt	gaccttaggc	gacttttgaa	cgcgcaataa	8220
	tggtttctga	cgtatgtgct	tagctcatta	aactccagaa	accctccgt	caggaggtca	8280
35	actaccccaa	tttaaatttt	atgtgattaa	gatattttta	tggacctact	ttataattaa	8340
	aaatattttc	tatttgaaaa	ggaaggacaa	aaatcataca	attttggtcc	aactactcct	8400
	ctcttttttt	ttttggcttt	ataaaaaagg	aaagtgatta	gtaataaata	attaaataat	8460
40	gaaaaaagga	ggaaataaaa	ttttcgaatt	aaaatgtaaa	agagaaaaag	gagagggagt	8520
	aatcattggt	taactttatc	taaagtaccc	caattcgatt	ttacatgtat	atcaaattat	8580
45	acaaatattt	tattaaaata	tagatattga	ataattttat	tattcttgaa	catgtaaata	8640
	aaaattatct	attatttcaa	tttttatata	aactattatt	tgaaatctca	attatgattt	8700
	tttaatatca	ctttctatcc	atgataattt	cagcttaaaa	agttttgtca	ataattacat	8760
50	taattttggt	gatgaggatg	acaagatttc	ggtcatcaat	tacatataca	caaattgaaa	8820
	tagtaagcaa	cttgattttt	tttctcataa	tgataatgac	aaagacacga	aaagacaatt	8880
55	caatattcac	attgattttat	ttttatatga	taataattac	aataataata	ttcttataaa	8940
	gaaagagatc	aattttgact	gatccaaaaa	tttattttatt	tttactatac	caacgtcact	9000
	aattatatct	aataatgtaa	aacaattcaa	tcttacttaa	atattaattt	gaaataaact	9060
60	atttttataa	cgaaattact	aaatttatcc	aataacaaaa	aggtcttaag	aagacataaa	9120

65

ES 2 930 456 T3

	ttcttttttt	gtaatgctca	aataaatttg	agtaaaaaag	aatgaaattg	agtgattttt	9180
	ttttaatcat	aagaaaataa	ataattaatt	tcaatataat	aaaacagtaa	tataatttca	9240
5	taaatggaat	tcaatactta	cctcttagat	ataaaaaata	aatataaaaa	taaagtgttt	9300
	ctaataaacc	cgcaatttaa	ataaaatatt	taatattttc	aatcaaattt	aaataattat	9360
10	attaaaatat	cgtagaaaaa	gagcaatata	taatacaaga	aagaagattt	aagtacaatt	9420
	atcaactatt	attatactct	aattttgtta	tattttaattt	cttacggtta	aggtcatggt	9480
	cacgataaac	tcaaaatacg	ctgtatgagg	acatatttta	aatttttaacc	aataataaaa	9540
15	ctaagttatt	tttagtatat	ttttttgttt	aacgtgactt	aatttttctt	ttctagagga	9600
	gcgtgtaagt	gtcaacctca	ttctccta	tttcccaacc	acataaaaaa	aaaataaagg	9660
20	tagcttttgc	gtgttgattt	ggtacactac	acgtcattat	tacacgtggt	ttcgtatgat	9720
	tggttaatcc	atgaggcggt	ttcctctaga	gtcggccata	ccatctataa	aataaagctt	9780
	tctgcagctc	attttttcat	cttctatctg	atttctatta	taatttctct	gaattgcctt	9840
25	caaatttctc	tttcaagggt	agaatttttc	tctatttttt	ggtttttgtt	tgttttagatt	9900
	ctgagtttag	ttaatcaggt	gctgttaaag	ccctaaattt	tgagtttttt	tcggttggtt	9960
30	tgatggaaaa	tacctaaaca	ttgagttttt	tcatgttggt	ttgtcggaga	atgcctacaa	10020
	ttggagttcc	tttcggtggt	ttgatgagaa	agccccta	ttgagtggtt	ttccgtcgat	10080
	ttgattttaa	aggtttatat	tcgagttttt	ttcgtcgggt	taatgagaag	gcctaaaata	10140
35	ggagtttttc	tggttgattt	gactaaaaaa	gccatggaat	tttgtgtttt	tgatgtcgct	10200
	ttggttctca	aggcctaaga	tctgagtttc	tcggttggtt	ttgatgaaaa	agccctaaaa	10260
40	ttggagtttt	tatcttggtg	tttaggttgt	tttaatcctt	ataatttgag	ttttttcggt	10320
	gttctgattg	ttgtttttat	gaattttgca	gaatggataa	cgcaacactt	gctgtgatcc	10380
	tttccatttt	gtttgtgttt	taccacattt	tcaaatacct	tttcaccaat	tcttcatctc	10440
45	gtaggcttcc	tcctggtccc	aaacccgtgc	caatttttgg	caacattttc	gatcttgggc	10500
	aaaagcctca	tcgatctttt	gccaatctat	ctaaaattca	cggccctttg	attagcctaa	10560
50	agttaggaag	tgtaacaact	attgttggtt	cctcggcctc	tgtggccgag	gaaatgttcc	10620
	ttaaaaatga	ccaagcactt	gctaaccgaa	ccattcctga	ctcggttagg	gctggtgacc	10680
	acgacaaatt	atccatgtcg	tggttgccct	tttcccaaaa	atggagaaat	atgagaaaaa	10740
55	tctccgctgt	ccaattactc	tccaacccaa	aacttgatgc	tagtcaacct	cttagacaag	10800
	ctaaggtgaa	acaactttta	tcatacgtac	aagtttggtc	cgaaaaaatg	caaccgctcg	10860
60	atattggacg	ggccgcattt	acaacgtcac	ttaatttatt	atcaaacaca	tttttctcaa	10920
	tcgaattagc	aagtcattgaa	tctagtgcct	cccaagaggt	taaacaactc	atgtggaata	10980
65	ttatggagga	aattggaagg	cctaattatg	ctgatttttt	ccctattctt	ggttacattg	11040

ES 2 930 456 T3

	atcccttttg tataagacgt cgtttggctg gttactttga taaactcatt gatgttttcc	11100
	aagacattat tcttgaaaga caaaagcttc gatcttctaa ttcttcgggc gcaaaacaaa	11160
5	caaatacat tcttgatact ctctttaaac tccatgaaga taatgagttg agtatgcctg	11220
	aaattaatca ccttctcgtg gatattcttg acgccggaac agacacaaca gcaagcacat	11280
	tagaatgggc aatggccgaa ctgttgaaaa acccggaat gatgactaaa gttcaaattg	11340
10	aaatcgaaca agctcttgga aaagattgct tagacataca agaaccgac atctcaaac	11400
	taccttattt acaagccatt ataaaagaaa cgttacgttt acaccctcct actgtgtttt	11460
15	tgctgcctcg aaaggcagac aatgacgtag agttatatgg ctacgttgta ccaaagaatg	11520
	ctcaagtcct tgtcaatctt tgggcaattg gtcgtgatcc aaaggtatgg aaaaatccgg	11580
	aagtattttc tcctgaaagg ttttttagatt gcaatatcga ttataaagga cgagatttcg	11640
20	aacttttacc ctttggtgct ggtagaagga tatgccctgg acttactttg gcatatagaa	11700
	tgttgaactt gatgttggt actcttcttc aaaactacaa ttggaaactt gaagatggta	11760
	tcaatcctaa ggatttagac atggatgaga aatttgggat tacattgcaa aaggttaaac	11820
25	ctcttcaagt tattccagtt cccagaaact aggccttggtg tggttgtctg gttgcgtctg	11880
	ttgcccggtg tctgttgccc attgtggtgg ttgtgtttgt atgatggctg ttaaggatca	11940
30	tcaatgtgtt ttgcgttttt gttccattct gtttctcatt tgtgaataat aatggtatct	12000
	ttatgaatat gcagtttggt gtttcttttc tgattgcagt tctgagcatt ttgtttttgc	12060
	ttccgtttac tataccactt acagtttgca ctaatttagt tgatatgcga gccatctgat	12120
35	gtttgatgat tcaaatggcg tttatgtaac tcgtaccgga gtggatggag aagagctcca	12180
	ttgccggttt gtttcatggg tggcggaggg caactcctgg gaaggaacaa aagaaaaacc	12240
40	gtgatacgag ttcatgggtg agagctccag cttgatccct tctctgtcga tcaaatttga	12300
	atttttggat caccgagcg tcacaagata atccaaagta aaacataatg aatagtactt	12360
	ctcaatgatc acttattttt agcaaactcag caattgtgca tgtcaaata tttcgggtga	12420
45	agagaaagag ttgatgaatc aaaatatctg tagctggatc aagaatctga ggcagttgta	12480
	tgtatcaatg atctttccgc tacaatgatg ttagctatcc gagtcaaatt gttgtagaat	12540
50	tgcatacttc ggcatcacat tctggatgac ataataaata ggaagtcttc agatccctaa	12600
	aaaattgaga gctaataaca ttagtcctag atgtaactgg gtgacaacca agaaagagac	12660
	atgcaaatac tacttttggt tgaaggagca tccctgggtt gacatatttt ttctgaatat	12720
55	caaactttga aactctacct agtctaattgt ctaacgacag atcttactgg tttactgca	12780
	gtgatatcta ctatcttttg gaatgttttc tccttcagtt atacatcaag ttccaagatg	12840
60	caggtgtgct tgattgatgt acatggctgt gagaagtgca tcctgatgtt cagatgatgg	12900

65

ES 2 930 456 T3

	ttcattctaa tgtcttttcc ttcaatcagt tttctcagtc tgacttagct tgtttcatct	12960
	gcatgtttga atgttcgttt actcatagta attgcatttt tgtagcagaa catatcattg	13020
5	gtcatggttt caactgtgcg cgagtccttat gcttattcaa actaggaaag cctccgtcta	13080
	gagggtacac gagttgttgc tctgtgtgcg tcagtcacata gtattaatct tgctagtgtg	13140
	agtatattgt ttatgtggac tcggaattca tcatatgctc cttctttgca tcaagtaagg	13200
10	caaggtaatg tatagaagct ttttaactct ttcatggaag ctggcctttg ccagcatacc	13260
	atccagaaga tatcaaccct gcatcttggc tgccgcgctg tcaggagata catgagaatt	13320
15	aaggagtgca cggtagtacc cccgccgatg acgcgggaca agccgtttta cgtttggaac	13380
	tgacagaacc gcaacgttga aggagccact gagccgcggg tttctggagt ttaatgagct	13440
	aagcacatac gtcagaaacc attattgctg gttcaaaagt cgcctaaggc cactatcagc	13500
20	tagcaaatat ttcttgtcaa aaatgctcca ctgacgttcc ataaattccc ctcggtatcc	13560
	aattagagtc tcatattcac tctcaactcg atcgaggcaa tgatggctat ggaagtgggt	13620
25	tatcttcggc actcgacaac gatcaccaac ggactgtgtt gtaactgtga tccgaagccc	13680
	cgaggagcac gtcgtgtaca gactaggctg cctggcacc cgtgtctcgt caaggatacc	13740
	ttacctcta gcaaagctaa actaaaaag ccgtcgcaga gagaaatctt tctaacaagt	13800
30	aggaagaggc tgaatcagat acaagctgtt tcaacggctg aaaaggagag agaggcagac	13860
	aaaacatcca ctccacctat tcccagtagc atccaagata tttcaaatgg agatcacatt	13920
	cttggcttcg gagccgattt gaccgaagat catcctggct accatgatct tgaatataag	13980
35	aggaggcgta gtcgtattgc tgaccttgcg aagatacata aaatagggtga acccattcct	14040
	tgctgtggact acacatcgga agagattcgt gtgtggggctc atgtgttaga tactctagtg	14100
40	gacctctacc caactcatgc ttgtaaggaa tacctgaatt gctacgagct gtttaacttc	14160
	aagccaaact atattccaca gctgcaagaa ctttcggagg tcctggaacg gagcacagga	14220
	tggcacatcc gccagtagc tggactcctc caccctcgtg acttcctaaa cggcttagcc	14280
45	ttccgcactt tccattcaac ccagtatgtt cggcatggca gcaatcccat gtacaccccc	14340
	gagccagaca tttgtcacga ggttttaggc cacgtcccca ttctggctga tccggagttt	14400
50	gctgacttag cttgggccat tggccaagct tctctgggtg cttcagagaa ggatatctgg	14460
	caccttacga agctctactg gtacactgtg gagtttggca cagtaaagga aggtaacgag	14520
	attaaagcgt tcggtgcagg ccttctgtct agttttgggg agctgaagca catgcgggtg	14580
55	gggacggatg gattcatgcc tgagtctgtg gagcttgacc cgtttaagaa gatgcccaag	14640
	atgagctaca aagacgggta ccagaagagg tattttctat gcgagagctt tgcatatgca	14700
60	gcggcaaaagc ttagggcgta ttccagaagc attctgaagc ctgaggtgca gtccatcaag	14760
	tttgagagata cgccaatccg gctctaagct tatatgaaga tgaagatgaa atatttggtg	14820

65

ES 2 930 456 T3

	tgtcaaataa aaagcttgtg tgcttaagtt tgtgtttttt tcttggttg ttgtgttatg	14880
	aatttgtggc tttttctaata attaaatgaa tgtaagatct cattataatg aataaacaaa	14940
5	tgtttctata atccattgtg aatgttttgt tggatctctt ctgcagcata taactactgt	15000
	atgtgctatg gtatggacta tggaatatga ttaaagataa gcgctgtcag gagccgtaca	15060
10	aaattgatta ttgatgtcac aaatcaatca gagctaaatt ccaaaaaaaaa tatgatcttt	15120
	gaaacttgca tcaataacta acgattctag gaagagccca tttcgatttc aacaaaaaga	15180
	tgagagcttg attacatata aaatcaagag aaattaacga cattgaagag aattcgatct	15240
15	cgaaaccgga aacaaagact tataagtcga ttagtctaata tcaatgcaga agaaagaata	15300
	ccaggtttgg ccttcacgat ggaaagcttc ggatttggag ccaagtctca taaacgccat	15360
20	tgtggaagaa agtcttgagt tgggtggaat gtaacagagt agtaagaaca gagaagagag	15420
	agagtgtgag atacatgaat tgtcgggcaa caaaaatcct gaacatctta ttttagcaaa	15480
	gagaaagagt tccgagtctg tagcagaaga gtgaggagaa atttaagctc ttggacttgt	15540
25	gaattgttcc gcctcttgaa tacttcttca atcctcatat attcttcttc tatgttacct	15600
	gaaaaccggc atttaatctc gcgggtttat tccggttcaa catttttttt gttttgagtt	15660
30	attatctggg cttaataacg caggcctgaa ataaattcaa ggcccaactg tttttttttt	15720
	taagaagttg ctgttaaaaa aaaaaaagg gaattaacaa caacaacaaa aaaagataaa	15780
	gaaaataata acaattactt taattgtaga ctaaaaaac atagatttta tcatgaaaaa	15840
35	aagagaaaag aaataaaaac ttggatcaaa aaaaaaaca tacagatctt ctaattatta	15900
	acttttctta aaaattaggt cttttttccc aacaattagg ttttagagttt tggaattaaa	15960
40	ccaaaaagat tgttctaaaa aatactcaaa tttggtagat aagtttcctt attttaatta	16020
	gtcaatggta gatacttttt tttcttttct ttattagagt agattagaat cttttatgcc	16080
	aagtattgat aaattaaatc aagaagataa actatcataa tcaacatgaa attaaaagaa	16140
45	aaatctcata tatagtatta gtattctcta tatatattat gattgcttat tcttaatggg	16200
	ttgggttaac caagacatag tcttaatgga aagaatcttt tttgaacttt ttccttattg	16260
50	attaaattct tctatagaaa agaaagaaat tatttgagga aaagtatata caaaaagaaa	16320
	aatagaaaaa tgtcagtga gcatgtgaa tggatgacct aatccaacca ccaccatagg	16380
	atgtttctac ttgagtcggt cttttaaaaa cgcacggtgg aaaatatgac acgtatcata	16440
55	tgattccttc ctttagtttc gtgataataa tcctcaactg atatcttcct ttttttgttt	16500
	tggctaaaga tatttttattc tcattaatag aaaagacggt tttgggcttt tgggttgcca	16560
	tataaagaag accttcgtgt ggaagataat aattcatcct ttcgtctttt tctgactctt	16620
60	caatctctcc caaagcctaa agcgatctct gcaaatctct cgcgactctc tctttcaagg	16680

65

ES 2 930 456 T3

	tatatatttct gattcttttt gtttttgatt cgtatctgat ctccaatttt tgttatgtgg	16740
	attattgaat cttttgtata aattgctttt gacaatattg ttcgtttcgt caatccagct	16800
5	tctaaatttt gtcctgatta ctaagatatt gattcgtagt gtttacatct gtgtaatttc	16860
	ttgcttgatt gtgaaattag gattttcaag gacgatctat tcaatttttg tgttttcttt	16920
10	gttcgattct ctctgtttta ggtttcttat gtttagatcc gtttctcttt ggtgttggtt	16980
	tgatttctct tacggctttt gatttggtat atgttcgctg attggtttct acttgttcta	17040
	ttgttttatt tcagaatggc ttctatgata tcctcttcag ctgtgactac agtcagccgt	17100
15	gcttctacgg tgcaatcggc cgcggtggct ccattcggcg gcctcaaatt catgactgga	17160
	ttcccagtta agaaggtcaa cactgacatt acttccatta caagcaatgg tggaagagta	17220
20	aagtgcattg tgatgaatta tcagaacgac gattttacgca tcaaagaaat caaagagtta	17280
	cttcctcctg tcgcattgct ggaaaaattc cccgctactg aaaatgccgc gaatacgggt	17340
	gcccattgcc gaaaagcgat ccataagatc ctgaaaggta atgatgatcg cctgttggtt	17400
25	gtgattggcc catgctcaat tcattgatct gtcgcgga aagagtatgc cactcgcttg	17460
	ctggcgctgc gtgaagagct gaaagatgag ctggaaatcg taatgcgcgt ctattttgaa	17520
	aagccgcgta ccacggtggg ctggaaaggg ctgattaacg atccgcatat ggataatagc	17580
30	ttccagatca acgacgggtc gcgtatagcc cgtaaattgc tgcttgatat taacgacagc	17640
	ggtctgccag cggcagggtga gtttctcgat atgatcacc cacaatatct cgctgacctg	17700
35	atgagctggg gcgcaattgg cgcacgtacc accgaatcg aggtgcaccg cgaacaggca	17760
	tcagggtctt cttgtccggt cggcttcaaa aatggcaccg acggtacgat taaagtggct	17820
	atcgatgcca ttaatgccgc cgggtgcgcc cactgcttcc tgtccgtaac gaaatggggg	17880
40	cattcggcga ttgtgaatac cagcggtaac ggcgattgcc atatcattct gcgcggcggt	17940
	aaagagccta actacagcgc gaagcacgtt gctgaagtga aagaagggtt gaacaaagca	18000
45	ggcctgccag cacagggtgat gatcgatttc agccatgcta actcgtccaa acaattcaaa	18060
	aagcagatgg atgtttgtgc tgacgtttgc cagcagattg ccggtggcga aaaggccatt	18120
	attggcgtga tgggtggaaag ccatctgggt gaaggcaatc agagcctcga gagcggggag	18180
50	ccgctggcct acggtgaagag catcacgcat gcctgcattc gctgggaaga taccgatgct	18240
	ctgttacgtc aactggcgaa tgcagtaaaa gcgcgtcgcg gggaattcat cttttacca	18300
55	tacgatgttc ctgactatgc gggctatccc tatgaogtcc cggactatgc aggatcctat	18360
	ccatattgacg ttccagatta cgctgctcag taggcttata tgaagatgaa gatgaaatat	18420
	ttggtgtgtc aaataaaaag cttgtgtgct taagtttgtg ttttttctt ggcttggtgt	18480
60	gttatgaatt tgtggctttt tctaataatta aatgaatgta agatctcatt ataataata	18540
	aacaaatgtt tctataatcc attgtgaatg ttttggtgga tctcttctgc agcatataac	18600
65	tactgtatgt gctatggtat ggactatgga atatgattaa agataag	18647

ES 2 930 456 T3

<210> 28
 <211> 1050
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido que codifica el mutante AroG175 de E Coli

<400> 28

10	atgaattatc agaacgacga tttacgcac aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc	60
	gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga	120
	aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggccca	180
15	tgctcaattc atgatcctgt cgcggcaaaa gagtatgcca ctcgcttgct ggcgctgcgt	240
	gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct attttgaaaa gccgcgtacc	300
20	acggtgggct ggaaagggct gattaacgat ccgcatatgg ataatagctt ccagatcaac	360
	gacggtctgc gtatagcccc taaattgctg cttgatatta acgacagcgg tctgccagcg	420
	gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc	480
25	gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aacaggcatc agggctttct	540
	tgtccggctc gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt	600
	aatgccgcgg gtgcgccgca ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt	660
30	gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac	720
	tacagcgcca agcacgttgc tgaagtgaag gaagggctga acaaagcagg cctgccagca	780
35	caggtgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat	840
	gtttgtgctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgtgatg	900
	gtggaaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac	960
40	ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata ccgatgctct gttacgtcaa	1020
	ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg	1050

<210> 29
 <211> 1185
 <212> ADN
 <213> Physcomitrella patens

<400> 29

50	atggctatgg aagtgggtta tcttcggcac tcgacaacga tcaccaacgg actgtgttgt	60
	aactgtgatc cgaagccccg aggagcacgt cgtgtacaga ctaggctgcc tggcaccctg	120
55	tgtctcgtca aggatacctt tacctctagc aaagctaaac taaaaaagcc gtctcagaga	180
	gaaatctttc taacaagtag gaagaggctg aatcagatac aagctgtttc aacggctgaa	240

ES 2 930 456 T3

	aaggagagag aggcagacaa aacatccact ccacctattc ccagtagcat ccacgatatt	300
	tcaaattggag accacattct tggcttcgga gccgatttga ccgaagatca tcctggctac	360
5	catgatcttg aatataagag gaggcgtagt cgtattgctg accttgcgaa gatacataaa	420
	ataggtgaac ccattccttg cgtggactac acatcggaag agattcgtgt gtggggtcat	480
	gtgttagata ctctagtga cctctaccca actcatgctt gtaaggaata cctgaattgc	540
10	tacgagctgt ttaacttcaa gccaaactat attccacagc tgcaagaact ttcggaggtc	600
	ctggaacgga gcacaggatg gcacatccgc ccagtagctg gactcctcca ccctcgtgac	660
15	ttcctaaacg gtctagcctt ccgcactttc cattcaaccc agtatgttcg gcatggcagc	720
	aatcccatgt acacccccga gccagacatt tgtcacgagg ttttaggcca cgtccccatt	780
	ctggctgac cggagtttgc tgacttagct tgggccattg gccaaagcttc tctgggtgct	840
20	tcagagaagg atatctggca ccttacgaag ctctactggt aactgtgga gtttggcaca	900
	gtaaaggaag gtaacgagat taaagcgttc ggtgcaggcc ttctgtctag ttttggggag	960
25	ctgaagcaca tgcggtggg gacggatgga ttcatgcctg agttcgtgga gcttgaccog	1020
	tttaagaaga tgcccaagat gagctacaaa gacgggtacc agaagaggta ttttctatgc	1080
	gagagctttg cagatgcagc ggcaaagctt agggcgtatt ccagaagcat tctgaagcct	1140
30	gaggtgcagt ccatcaagtt tggagatacg ccaatccggc tctaa	1185
	<210> 30	
	<211> 1988	
	<212> ADN	
35	<213> Beta vulgaris	
	<400> 30	
40	tcgatgtgtt ttcaagaaga gcttgagcct acattctaca acaatatatt gttcctctct	60
	tgcgcaatta agcccttaaa cctgcaatta tcttagaatt tttgggtttc taatttatct	120
	tctcctttaa ttagctagct tcttagatta ttcatatctt tccagcattt tcaaacaatg	180
45	gataacgcaa cacttgctgt gatcctttcc attttggttg tgttttacca cattttcaaa	240
	tcctttttca ccaattcttc atctcgtagg ctctcctctg gtcccaaacc cgtgccatt	300
50	tttggaaca ttttcgatct tggcgaaaag cctcatogat cttttgcaa tctatctaaa	360
	attcacggcc ctttgattag cctaaagtta ggaagtgtaa caactattgt tgtttcctcg	420
	gcctctgttg ccgaggaaat gttccttaaa aatgaccaag cacttgctaa ccgaaccatt	480
55	cctgactcgg ttagggctgg tgaccacgac aaattatcca tgctgtggtt gcctgtttcc	540
	caaaaatgga gaaatatgag aaaaatctcc gctgtccaat tactctccaa ccaaaaactt	600
60	gatgctagtc aacctcttag acaagctaag gtgaaacaac ttttatcata cgtacaagtt	660
	tgttccgaaa aaatgcaacc cgtcgatatt ggacggggcc catttacaac gtcacttaat	720

65

ES 2 930 456 T3

	ttattatcaa acacatTTTT ctcaatcgaa ttagcaagtc atgaatctag tgcttcccaa	780
	gagtttaaac aactcatgtg gaatattatg gaggaattg gaaggcctaa ttatgctgat	840
5	tttttcccta ttcttggtta cattgatccc ttTggtataa gacgtcgTtt ggctggttac	900
	tttgataaac tcattgatgt tttccaagac attattcgtg aaagacaaaa gcttcgatct	960
	tctaattctt ccggcgcaaa acaaacaat gacattcttg atactcttct taaactccat	1020
10	gaagataatg agttgagtat gcctgaaatt aatcaccttc tcgtggatat ctttgacgcc	1080
	ggaacagaca caacagcaag cacattagaa tgggcgatgg ccgaacttgt gaaaaacccg	1140
15	gaaatgatga ctaaagttca aattgaaatc gaacaagctc ttggaaaaga ttgcttagac	1200
	atacaagaat ccgacatctc aaaactacct tatttacaag ccattataaa agaaacgtta	1260
	cgtttacacc ctccactgtg gtttttgctg cctcgaaagg cagacaatga cgtagagtta	1320
20	tatggctacg ttgtaccaa gaatgctcaa gtccttgtca atctttgggc aattggctcg	1380
	gatccaaagg tatggaaaaa tccggaagta ttttctcctg aaaggTTTT agattgcaat	1440
25	atcgattata aaggacgaga tttcgaactt ttaccctttg gtgctggtag aaggatatgc	1500
	cctggactta ctttggcata tagaatgttg aacttgatgt tggctactct tcttcaaaac	1560
	tacaattgga aacttgaaga tggatatcaat cctaaggatt tagacatgga tgagaaattt	1620
30	gggattacat tgcaaaaggT taaacctctt caagttattc cagttcccag aaactagcta	1680
	gtgggttgtg ccgttgtggg ctgtgggctg attgtgcact tttgtttcct ctaattgttg	1740
35	ttgcaaaactt ctctagaagg gtattatctt ttgtataaat aaagcgaaag ctacatgtcc	1800
	tattattaaa ttagtgtata ctatattaag taagtatgag catatagtat ccattattgt	1860
	ttttggttga atcgatttaa actgataaat caagtaaagT tctccaacct aagcattcaa	1920
40	ttattctgtt agtcataaca tatgtagagg gtaagtatga agaattaata acggcgtgat	1980
	catcctta	1988
45	<210> 31 <211> 1500 <212> ADN <213> Beta vulgaris	
	<400> 31	
50	atggataacg caacacttgc tgtgatcctt tccattttgt ttgtgtttta ccacattttc	60
	aaatcctttt tcaccaattc ttcatctcgt aggcttcctc ctggtcccaa acccgtgcca	120
55	atTTTTggca acattttcga tcttggcgaa aagcctcatc gatcttttgc caatctatct	180
	aaaattcacg gccctttgat tagcctaaag ttaggaagtg taacaactat tgttgtttcc	240
	tcggcctctg tggccgagga aatgttcctt aaaaatgacc aagcacttgc taaccgaacc	300
60	attcctgact cggttagggc tggtgaccac gacaaattat ccatgtcgtg gttgcctgtt	360

65

ES 2 930 456 T3

	tccccaaaat ggagaaatat gagaaaaatc tccgctgtcc aattactctc caacccaaaa	420
	cttgatgcta gtcaacctct tagacaagct aagggtgaaac aactttttatc atacgtacaa	480
5	gtttgttccg aaaaaatgca acccgtcgat attggacggg ccgcatttac aacgtcactt	540
	aatttattat caaacacatt tttctcaatc gaattagcaa gtcattgaatc tagtgcttcc	600
	caagagttha aacaactcat gtggaatatt atggaggaaa ttggaaggcc taattatgct	660
10	gattttttcc ctattcttgg ttacattgat ccctttggta taagacgtcg tttggctggt	720
	tactttgata aactcattga tgtttttcaa gacattattc gtgaaagaca aaagcttcga	780
15	tcttctaatt cttccggcgc aaaacaaaca aatgacattc ttgatactct tcttaaaactc	840
	catgaagata atgagttgag tatgcctgaa attaatacacc ttctcgtgga tatctttgac	900
	gccggaacag acacaacagc aagcacatta gaatgggcaa tggccgaact tgtgaaaaac	960
20	ccggaaatga tgactaaagt tcaaattgaa atcgaacaag ctcttggaag agattgctta	1020
	gacatacaag aatccgacat ctcaaaacta ccttatttac aagccattat aaaagaaacg	1080
25	ttacgtttac accctcctac tgtgtttttg ctgcctcgaa aggcagacaa tgacgtagag	1140
	ttatatggct acgttggtacc aaagaatgct caagtccttg tcaatctttg ggcaattggt	1200
	cgtgatccaa aggtatggaa aaatccggaa gtattttctc ctgaaagggt tttagattgc	1260
30	aatatcgatt ataaaggacg agatttcgaa cttttaccct ttggtgctgg tagaaggata	1320
	tgccctggac ttactttggc atatagaatg ttgaacttga tgttggttac tcttcttcaa	1380
35	aactacaatt ggaaacttga agatgggtatc aatcctaagg atttagacat ggatgagaaa	1440
	tttgggatta cattgcaaaa gggttaaacct cttcaagtta ttccagttcc cagaaactag	1500
	<210> 32	
	<211> 2200	
40	<212> ADN	
	<213> Beta vulgaris	
	<400> 32	
45	tactaatgtg caaatgcata aatttaattt cagatactct tttttataaa tattattata	60
	ctgtgcattc ttttaaccba aaaaaaaaaac tgtcttaata caccatttaa ttcccttctc	120
	taggatccac tatcacatgt agtatataaa tataatccta tacagttcac gttatcaaac	180
50	accaaagcat caaaagcctt ccacacttgt attattttgg ggtagttgat ttgttagcgt	240
	gttatttgtg agatcatcat ggatcatgca acattagcaa tgatactagc catttggttc	300
55	atttcttttc atttcataaa attacttttt agccaacaaa ctaccaaaact tcttctctct	360
	ggtccaaaac cattgccaat aattggtaac atcttagaag ttggtaaaaa accccatcgt	420
	tcatttgcta atcttgctaa aattcacggc cctttaatat cgttacgtct aggaagtgt	480
60	acaactattg ttgtatcatc agcagatgta gctaaagaaa tgttcttaaa aaaagaccac	540

65

ES 2 930 456 T3

	cctcttttcta accgtactat tccataattct gtcacggccg gtgaccacca taaactcacc	600
	atgtcgtggt tgcccgtttc gccgaaatgg cggaattttc gtaagattac agccgtccat	660
5	ttgcttttctc ctcaaagact tgatgcttgc caaacctttc gccatgccaa ggtgcaacag	720
	ctttatgaat atgtacaaga atgtgcacaa aaaggccaag ctgttgatat tggcaaagct	780
	gcatttacta cctcccttaa tttgttatct aaactattct tttcagtgga attagcccac	840
10	cataaatcac acactttctca agagtttaag gaactaatat ggaacattat ggaagatatt	900
	gggaaaccta attatgctga ttattttcct attttaggct gtgttgatcc atcaggattt	960
15	cgtcgaagat tagcatgtag ttttgacaag ttgattgcag tttttcaggg tataatatgt	1020
	gaaaggcttg cgcctgattc ttcaactaca acaacaacga cgactgatga tgtgctagac	1080
	gttcttcttc agctcttcaa acaaaatgag ctactatgg gcgagattaa ccatttgctc	1140
20	gtcgacattt ttgatgctgg aacagacact acatcaagta cttttgagtg ggtcatgaca	1200
	gagttaatta ggaatcctga aatgatggaa aaggctcaag aagaaattaa gcaagtattg	1260
25	ggcaaagata aacaaattca ggaatcagac attattaacc taccttactt acaagccatt	1320
	atcaaagaaa ctttgcgact acatccacca actgtatttc ttttgccctg taaagccgac	1380
	actgatgttg aactatatgg ttatattgtg cctaaagatg cacaaatact tgttaactta	1440
30	tgggctattg gaagagatcc taatgcatgg caaaatgctg atattttttc gcccgaaaga	1500
	tttatagggt gtgaaattga tgtcaaagga agagattttg gactcttacc ttttgagacc	1560
35	ggaagaagga tatgtcctgg gatgaatttg gccattagaa tgttaacttt gatgctagct	1620
	actttacttc aattcttcaa ttggaagctt gaaggagaca taagtccaaa agacttagac	1680
	atggatgaga aatttgggat tgcgttacaa aagacaaagc ctttaaaact tattccaata	1740
40	cctagggtatt gaaatttgtt agacttacgt acaacaatta ttattgtttg tgggttggtt	1800
	tgggttagct tcctgttcat gtttgtttga tgtgctcgat tgaatttact acaaatcaac	1860
45	gaactccaat tataatcttgt caacttgag taatggcttg ggtttctcat ctgtcatctc	1920
	ttttggttg ctgtgcaagg gagtgagctt gcagcttagc atccttcaag aagatttaat	1980
	taataatatg tgtatgtgta tgtgtatgtg tggattgtat ctcgtcattc attttgcttg	2040
50	ttgtaatgat tttagttaat tattgtaatt ataaaggatt tgatcctcct ttgtgttgaa	2100
	attatatata taatgtgtag cagcacaata aagtgcaga taacttatat aatcttattt	2160
55	tctatgaaat gttacagact tgctttgtgt tttaaaaaaa	2200

<210> 33
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> Beta vulgaris

<400> 33

ES 2 930 456 T3

```

aaaacaagaa gaaaacaaaa caacctttta tataactaga aagcaacaaa aaaaaaagaa      60
tgaaaaatgat gaatggtgaa gatgctaata atcaaatgat caaagaaagc ttcttcataa      120
5  cacatggaaa cccaatatta acagtagaag acacacatcc attaagacct ttctttgaaa      180
   cttggagaga gaaaatcttt tctaagaaac ctaaggcaat tcttattatt tctggtcatt      240
   gggaaactgt taaacctact gttaatgctg tccatatcaa tgatactatc catgattttg      300
10  atgactatcc tgctgctatg taccagttca agtatccagc tcctggggaa ccagaattgg      360
   caagaaaagt agaggaaatt ctgaaaaaat cgggtttcga aacggcggaa actgatcaaa      420
15  aacgtgggct tgatcatggt gcatgggtac ctctaatact aatgtatcct gaggctgata      480
   taccagtatg tcagctctca gttcagccgc atttagatgg aacataccat tacaacttag      540
   gacgagcatt ggctcccttg aaaaacgacg gcgtattaat cattggttca ggaagtgcaa      600
20  ctcacccttt ggatgaaact cctcattatt ttgatggagt tgcaccttgg gcagctgcct      660
   ttgattcatg gcttcgtaaa gctctcatta atggaagggt tgaagaagtg aatatatatg      720
25  aaagcaaagc accaaattgg aaattagcac atcctttccc agaacatttt tatccattgc      780
   atgttgttct tggcgctgct ggtgaaaaat ggaaggcaga gcttattcat agcagttggg      840
   atcatggcac cttgtgtcat ggctcctaca agttcacttc agcctagttt tactttttaa      900
30  cactatgtct acagtctatg ttattgtatt tggtaatgtg gtatgtggtg ttgtttttgt      960
   tttattcttt tgagttattg tacttggtat ttggtgttgt tttcatttgg tgcataattc      1020
   ttttagtcta tatattgcta ttcttttgaa tgaggaataa atcgcgagct cgatgtaata      1080
35  gtttgtttta ttgtttcaaa tctatcatta tatatatata tatattatta aaaaaaatt      1140
   attgtgttac tcgcaaaaaa a                                     1161

```

40 <210> 34
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris

45 <400> 34

```

Met Asp Asn Ala Thr Leu Ala Val Ile Leu Ser Ile Leu Phe Val Phe
1          5          10          15

50  Tyr His Ile Phe Lys Ser Phe Phe Thr Asn Ser Ser Ser Arg Arg Leu
      20          25          30

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

60  Gly Glu Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Leu Ser Lys Ile His Gly
      50          55          60

```

65

ES 2 930 456 T3

	Pro	Leu	Ile	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Ser	65	70	75	80
5	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Glu	Met	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Gln	Ala	Leu	85	90	95	
10	Ala	Asn	Arg	Thr	Ile	Pro	Asp	Ser	Val	Arg	Ala	Gly	Asp	His	Asp	Lys	100	105	110	
15	Leu	Ser	Met	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Gln	Lys	Trp	Arg	Asn	Met	Arg	115	120	125	
20	Lys	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Ser	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	Ala	Ser	130	135	140	
25	Gln	Pro	Leu	Arg	Gln	Thr	Lys	Val	Lys	Gln	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Gln	145	150	155	160
30	Asp	Cys	Ser	Lys	Lys	Met	Gln	Pro	Val	Asp	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala	Phe	165	170	175	
35	Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Phe	Ser	Ile	Glu	Leu	180	185	190	
40	Ala	Ser	His	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Glu	Phe	Lys	Gln	Leu	Met	Trp	195	200	205	
45	Asn	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Phe	Phe	Pro	210	215	220	
50	Ile	Leu	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	225	230	235	240
55	Tyr	Phe	Asp	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Arg	Glu	Arg	245	250	255	
60	Gln	Lys	Leu	Arg	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Gly	Ala	Lys	Gln	Thr	Asn	Asp	260	265	270	
65	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Glu	Asp	Asn	Glu	Leu	Ser	Met	275	280	285	
	Pro	Glu	Ile	Asn	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	290	295	300	
	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Asn				

ES 2 930 456 T3

	305					310										315																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
--	-----	--	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ES 2 930 456 T3

	acccccgggt ccgagaccat tgccaattat tggtaatat ctcgagcttg gggataaacc	240
	acatcgttct tttgcaaacc ttgcgaaaat tcacggtcct ttagttactt tgaaactcgg	300
5	gagtgttaacc actattgtgg tttcctcttc tgaagttgct aaagaaatgt ttttgaaaaa	360
	tgaccaacct ttggcaaata gtaccatacc tgactcagta agagcaggta accatgacaa	420
	actatcaatg tcgtgggtgc ctgtatcacc caaatggcga aatcttagaa agatttcagc	480
10	cgtccaattg ctctcaactc aacgacttga tgcaagtcaa gctcatagac aagctaaaat	540
	caaacaactt attgagtacg taaaaaatg cagtaaaatc ggccaatacg tcgatattgg	600
15	ccaagttgca ttcactacat cacttaattt actatcaaac acattctttt caaaagaact	660
	agcatcatth gattcagata atgcacaaga gttcaaacia ctaatgtggg gcattatgga	720
	agaaattggg aggcctaatt atgccgatta ttttcctatc ttgggttatg tcgatccatt	780
20	cgggtgctaga cgtcgacttt ctcgttactt cgatcaacta attgaagtat ttcaagtgat	840
	tattcgtgag agacttacac atgataataa tattgtgggt aataacaatg atgttttagc	900
25	tacgttgctc gatctttata aacaaaacga gttaactatg gatgaaatca accatttact	960
	agtggacatt tttgatgctg gtacggatac aacagcaagt aactagaat gggcaatgct	1020
	agagctcata aaaaatccac acataatggc caaagctcaa gaggaggtcc ggcgagccac	1080
30	catgtctcac ggcggagcta cgggtggcga aatacaagaa tcggatatca ataactctcc	1140
	atacatacaa tctattatta aagaaacact tcgtttacac ccaccaactg tgtttttact	1200
35	tcctagaaaa gctgacgtgg atgtccaatt attcggctat gtggtcccca aaaatgctca	1260
	agtcctagtc aatttatggg ccattggctg tgacccaaat gtgtggcccg acccggaagt	1320
	ttttagtcct gaaagattta tggattgtga gattgatgtc aagggtcgtg attttgagct	1380
40	attgcctttc ggggcggtgc gtcggatttg tccgggattg tctttggctt atcggatgct	1440
	taatttgatg ttggctaata tgggtacattc ttttgattgg aaattaccog gtgttgaaaa	1500
45	tggatccggg tcggaaatgg atagtttgga tatggatgag aaatttggtg tcactttgca	1560
	aaaggttcaa ccccttaagg ttattcctgt ctcaaggaaa tagatttttg gaagatcgat	1620
	ggttgggaga taatcatatt gtttttaatt attgttggtg tattttattg ttattattgg	1680
50	ggacaatttt ataataaaag atataaataa gtccctaatt gtgatattata ttgtgaattt	1740
	tctagttaat ataaatacat atgaatattt atgatgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagg	1799
55	<210> 36 <211> 2130 <212> ADN <213> Mirabilis jalapa	
60	<400> 36	
	tacgtctatt cttgcctccc atttcctccc tgcaaaaagg aagaaaatgg aaataccctt	60
65		

ES 2 930 456 T3

	taatttgcaa cctatTTTTtC taattattgt actatctacc ttcatttctaa cccacctaata	120
	aacaaaaaac acaagaaagt tcaaccaatg caaatcaaaa accaagccaa taccaaaacc	180
5	acctggctca ctaccataa taggtcactt gcacctccta agaggctcatg gaaccaccct	240
	aggtcgacc ctcggagcca tggccgacaa gtccggaccc attttcggcc tcaagctagg	300
	ccaacacaag gctatagtca ttagtaactg ggagatagtc aaggattgtt tcaccaataa	360
10	tgacatgaac cttgcaacta gacctagcat ggctattagc aaatatattg gttatgactt	420
	tgcctctttc tctatctcac cttatggccg atattggcgt gagattcgta agatctctac	480
	tgttgagctc ttgtcaaaca aacgccttga gaaaatgaag catgttcgaa cttttgaggt	540
15	gaactcttgc cttcaaatct tctatgaaaa atgtgtcaaa tcagaggata atgaaagtaa	600
	taaagtagca aaaatttgtc ttaaaaagtg gttagaatat attggtttta atatcgcaact	660
20	atctatgata gttggcaaga gattctccta cgaccagtat tataaaaaaa atactgttgc	720
	atcgagattt atgaaggcaa tagaaagagc aaccacacta gcaggacttc ctataccctc	780
	ggatttttta ccatgggttg aatggatgga tttggtgggt tacattggtg ctatgaagga	840
25	aactcataag gaaattgatg tgattattgg acattggcct gatgagcata ttcaaaagag	900
	gaaagagacg ttagaaaggc gaggtacaag cattgatgat agtgacttca tggatgtaat	960
	gttatctaac attactgaac aatttgccaa gtcaacctac tctaaaaaca ccatcattaa	1020
30	agcaacagct ttgacactac ttctaacagg ttcagaaagc acctcaatca cactaacatg	1080
	ggccatatca ctacttctaa acaaccctac ggcccaaat ttggcccaac aagaaatgga	1140
35	caaacaagtt ggtaaacaaa gatgggttga agaactctgac atcaccaatc taccatacct	1200
	ccaagccatc ataaaggaaa ctttacgttt gtatccacca agcccattag caggcccaag	1260
	agtggcccaa gaagactgcc aaatcaatgg acattgtatc acaaaaggaa cccgggtgat	1320
40	tgttaacata tggaagtgc atcgtgatcc gatgggttgg tccgaccag ataagtccg	1380
	accgaaagg tttattgggg agcataagga tattgatttt aagggtcaat actttgggta	1440
	tatacctttt agcttgggta ggagggttg tccctgggatg aattttgggc tacaagtgg	1500
45	ccatttgatg ttagctcgtt tggccaagg gttcgatatt tgggctcaa atggtggcct	1560
	aattgatttg aaggaaaggt tgggcttggc tttgccaag gctgggtccat tggatgtcat	1620
	tcttgacca cgtttgtcca gtgagcttta tggagcttta tcaaaggtga atgttactta	1680
50	tggctgggca atgaatgaac tagctttgta tttataattt tacaataat ttgtaagata	1740
	tgaactgttt atctagtac tttccgctt cttagaatat caataagcaa aaagttttat	1800
55	gtaataatat gtattagtgt gttattgtat catgattcgt cggatatactg aaaatatttt	1860
	acgtctagga gaatgtgcac acatttaatc ttatttgctt ataagtatta tatacataaa	1920
	attttctact ttataattta ggtatattga gctttcgacc aaaacccaaa aactaaagaa	1980
60	gtttttttta aaacatacaa gttgggtattg tttagatttt tattttatttt tattatctct	2040
	tttatttgta cttagtgggt gtgttaataa tgtaaagaag tattaaatat ttatagagtt	2100
65	ggaaaaaccc aatattttac attggaaaaa	2130

ES 2 930 456 T3

<210> 37
<211> 1903
<212> ADN
<213> Mirabilis jalapa

5

<400> 37

	tacgtctcta acctccttct cctcaccatc atcatcttat ttctctctct aacttcctat	60
10	ttctctctct agaatggtct caactagtga ctcaactctgg cttttcacct acttagcttc	120
	aaaatatgat catttttacga cccctaactt tattttattct ttgttttggt tcgtaaatatt	180
	ttttatttttg attcatctac tgtactgggtc ccaccaggt ggtccggcat gggggaagta	240
15	ttcatggact catctctcgg gatgggccgg gaagcccatc ccgggcccaa gaagttggcc	300
	cattataggt ggtttggacc tgaagatggg actggctcat cggaagttag ccacaatggc	360
20	tgagaaatac gggaccatgg ctaagaggct catggctttt agcctaggag aaacacgcgt	420
	gattgtcacg tgcaatcccg acgtggcgaa agaaatacta aatagccggg ttttcttgga	480
	ccgaccggac caggagtcgg cttatgggtt gatgtttaac cggctctatag ggttcgcacc	540
25	ctatgggacc tactggcgaa ccctaaggaa aataacatca acccatttat taagccctaa	600
	acacgtaaaa gaatatgaga acctacgtag ggaaataatg gaacaaatgg ttgactcgat	660
30	atcgaaccaa gccggaccgg ttccgggtccg ggaaatacta aggagggctt cattggataa	720
	tatgatgggg tcagtgtttg gtgggcccc aaggagggtc gttgaacagt tgatagaaat	780
	ggttggtgaa gggatgact tattgggtgt ccttaatttg ggggaccatc tatcttggct	840
35	agccgagttt gactttcaaa aggttcgggt caggtgctct caacttggtc caaaagtcaa	900
	ccggttcggt ggtgaaatta tcgatgaaca tcggtctagt tcgggtcaaa ttatgaaccg	960
40	ggactttggt gatgttttgt tgactctacc acaacatgaa caactttctc attctgacat	1020
	ggtcgctggt ctttgggaga tgatatttag aggaacagat gcaacagcag tattaataga	1080
	atggacatta gcacgattag taattcataa agatattcaa tcaaaggtcc aaaatgagtt	1140
45	agaccaagta gttggaacat cacgagccgt tgaagagtct gacctatcat cactgatata	1200
	tctaacggct gtgattaaag aagtattgct ggtccaccca cctgggcccc tcctatcgtg	1260
50	gtctcgctt tcaattcaag atactactat agatggttgt catgtgcaa aaggtactac	1320
	tgctatggtt aacatgtggg ctattgctag agatccta atgtgtgggcca acccagatga	1380
	atttgaccgg gatagatttt taatcgggtg gtccgagttt gaggttctctg ttcttgggtc	1440
55	ggatcttaga cttgcccctt tcgggtcggg tcgtagggtca tgtcctggga aggtcttagg	1500

60

65

ES 2 930 456 T3

	tttgaccaca gtcagttttt gggttgcttc actcttgcac gagtttgagt gggtgacatc	1560
	acctaacgct gacgtggatt tgagtgaagt gcttaagctt tcgtgtgaga tggctcatcc	1620
5	tcttaccgtg gaagctagga cgcgacgtca ttaattttac aaaagacgat attctcatac	1680
	acagattatt gtcaacttta tcaatatata cgggtgatag tttgacattg ttatagtatt	1740
10	cggaaaaata ttttctagag ataagtaaat ttataataat ctaaaaaact gaatgtataa	1800
	ttatattaat taatgtacta atgttattat aatgtttata aatgattgtg aaatatatat	1860
	ggttaacatt atatgtaatg agaaatgggt tgcttggcaa aaa	1903
15	<210> 38 <211> 1915 <212> ADN <213> Mirabilis jalapa	
20	<400> 38	
	gctagctgcc ttgttcattt caagaacaat atacactagt caatccattt caaatggcct	60
	acttagaaat tgtcatattc ttcatttttc tcacgtgaat ttgtttttct tttcgtgaca	120
25	aaaatgggtc cccaacaaat tggccgattg ttgggatgct accagctgtt ctaatcaatc	180
	ttcatagaat taatgactat tttgctgaac ttgttgctaa atcaaattta acattctcat	240
30	ttaagggctc ttgggttagc aacatgcaa ttttagcgac agttgatcca gcaaagtgc	300
	accatataat gagtaagaat ttaacaatt atcctaaggg tgctaagttt tacgacatct	360
	ttgatatact tggagatggt atttttaaca ccgactttaa tatatggcaa taccatcgga	420
35	aaatggctca gtcatatatt ggtgactcaa gatttcaaca atttttgttg aagaaagttg	480
	gggaaaagat tgaaggtgga ttaattccta tccttgatca tgttgccatg caagggttac	540
40	aagttgattht acaagattta tttgaaaggt ttacttttga tactatttgt tcacttatta	600
	tgaactatga tcctatgtct ttgtccattg attttctga tgttccatca tctaaggctc	660
	tagatgttgc tgaagaagtc atacttcttc gtcatttagt acctacaagt gtttgggaagt	720
45	ttcaaagatg gttaggtgta gggatggaaa agaagcataa gatagcttgg caagtacttg	780
	atgatttcat ttatgagtgc atatcaagga aaagagaaga gatgagagat agtttgcct	840
50	atgagaataa ggacaatgag atgggtggtg atttaatgac attgtatatg aatgaaatca	900
	aaagtaatga acttgtcaag gatgatccta acaagttttt gagggatact attcttaact	960
	tttttattgc aggtcgagat acaactagta ctgctttatc gtggtttttc tatctactat	1020
55	ccaagaatcc acaagtggta gaaaagatta gacaagagtt atcttggatc gtttcacaag	1080
	aaaaaactaa aaattatgct aatttgattg ataaacttgt ttatcttcat gccgcattat	1140
60	gtgaagcttt aagattatat cctccggtgg tatttgaagc aaagtctccg attgaatcgg	1200
	acactttacc aagtggctcat aagattgatc ctgacacaca aataatctta aatatgtacg	1260

65

ES 2 930 456 T3

	caatggcgag gatgaaaaca atatggggcg atgattgcga tcaattttaa cctgagaggt	1320
	ggatatcatc aacaacagga aagattaagc atgaaccttc gtacaagttc ttggctttta	1380
5	atgcaggacc aagaacttgt gtaggaaaaa atatggcttt tactcaaag aaagcaatag	1440
	caatagctat attacaaaac tatcatatac atgggtattga tggacaagtt attgaacctg	1500
	atctatccat aattctccat atgaagaatg gattcagagt aactgtttca ccgtgtaacg	1560
10	tttctatata accatcgaga gaaccaagtt tcctcgatct cttttaaaaca ttgtaatgtt	1620
	taattatcaa ctaaaaaatc gtatatcttc ttcgtttcat ttttttcttt ttctttttat	1680
15	caaagatcaa ggtaacgtcg gaaataacca tattgttttc ttggttaaa tgaagagaca	1740
	atgtaagttg taaaagtatg taagtgtaaa aataaattta aaaaattgtg tgaaaataag	1800
	ttgtaataaa taaagaataa tgttgggtatt ttattgttta ctattttgat aaacagaaaa	1860
20	aataaaataa aactgtttta aaataaaagt gagaagaaaa aaaataaaag aaaat	1915

<210> 39

<211> 817

<212> ADN

<213> *Portulaca grandiflora*

<400> 39

30	atgggtgttg ggaaggaagt gtcgtttaag gagagtttct tcttgtctca tgggaatcca	60
	gccatgttgg cgatgaatc ctttatagcg aggaacttcc ttttgggatg gaaaaagaat	120
	gtgtttcctg tgaaacccaa gtccatttta gtagtctctg ctactggga gactgatgtc	180
35	ccttgtgtat ctgctggtca gtaccctaatt gttatctacg atttcaactga agtccctgct	240
	tccatgtttc agatgaagta ccagctcca gggtgcccaa agctggcaaa aagagtgcag	300
	gaactgctga tagcgggagg tttcaagagc gcgaagctag atgaggagcg gggtttcgac	360
40	cacagctcat gggtgccact gagcatgatg tgcccggagg cggacatccc ggtgtgccag	420
	ctttcgggtgc agcctgggct tgacgcgacc caccacttca acgtggggcg agcgttggcc	480
45	ccactcaaag gggaaggtgt cctcttcatt ggctccggtg gggctgtcca cccttctgat	540
	gacacccctc attggttcga tgggtgttgc ccctgggctg ctgagtttga tcaatggctt	600
	gaggatgctc tcctagaagg aaggtacgaa gatgtgaata actatcaaac aaaagcacca	660
50	gaaggggtgga agctagcaca tccaattcca gaacattttc taccattgca tgtagccatg	720
	ggtgcaggtg gtgagaaatc aaaggcagag cttattttatc gtacttggga tcatggtact	780
55	cttggctacg cctcttaca gttcacttcc atatgat	817

<210> 40

<211> 1078

<212> ADN

<213> *Buganvilla glabra*

<400> 40

65

ES 2 930 456 T3

atgggtgggg agaaaaaat gaagggaaca tactatatag cacatggtga tccaattatg 60
 tacatcaata aatcaataaa acttaggcac tttttagaag agtggaaaga gaatgtggtt 120
 5 atggagaaac ctatatgtat tcttgtgatt tcagctcatt gggatactga tgttcccact 180
 gttaaccttg ttgaacattg tgataccatc catgatattt atgactatcc tgatcccttg 240
 taccagataa agtatccagc tcctggggct ccaaaattgg caatgaaagt gcaagagtta 300
 10 ttgaaagggtg gaggattcaa atgtgaagtg gatacaaagc gtggacttga ccatgctgca 360
 tggtttccac tcatgttgat gtatcctgaa gctgatattc caatttgtga gctctcagtt 420
 15 caaaccaaca aggatgggac ccaccactac aaccttggaa aagcactttc tcctctcttg 480
 aatgatgatg ttctcatcat tggctctggt ggagctgttc atccctcaga tgatactcct 540
 cattgtccta atgggtgttg tccttgggct ttgcagtttg acaattggct tgaagatgct 600
 20 cttctcagtg gaaggatga agatgtgaaa gaattcaaaa aaatggcacc aaattgggag 660
 atatcacatc cagggcaaga gcacttgtag cctttgcatg tggctcttgg ggctgcaggc 720
 aacaacgtaa agacagagct tattcatcaa acttgggctg ccaatggcgt ctttggatat 780
 25 tcctcctaca agttcacatc cacttgaaca ataaattaaa tattcatctt tacacatttc 840
 aataattccc ttcttgtgtt tgctttttct ggtattaaat ttgtttgtca ttttttttta 900
 30 gagtcgacag ttgagggctt ttttaaaaca atttttttta tctttatggc gagagtgaca 960
 tccttgtaaa attcatttat tatgggtgat ttggatacta gtatttcatt tgagatgcat 1020
 gaattatggt aaattcactg tttgaataac aataaattta taaatttgaa tttgactc 1078

<210> 41
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Amanita muscaria

<400> 41

Met Val Pro Ser Phe Val Val Tyr Ser Ser Trp Val Asn Gly Arg Gln
 1 5 10 15

Arg Tyr Ile Arg Gln Ala Phe Ala Ser Ile Leu Phe Tyr Ile Ile Arg
 20 25 30

Asp Thr Thr Leu Ser Phe Pro Ser His Thr Thr Met Ser Thr Lys Pro
 35 40 45

Glu Thr Asp Leu Gln Thr Val Leu Asp Ser Glu Ile Lys Glu Trp His
 50 55 60

Phe His Ile Tyr Phe His Gln Asn Asn Ala Ala Glu His Gln Ala Ala

ES 2 930 456 T3

	65		70		75		80
5	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp	Ala	Phe
				85			95
10	Val	Ala	Val	Pro	Leu	Phe	His
				100			110
15	Pro	Val	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ser
			115				125
20	Val	Phe	Ser	Tyr	Leu	Cys	Val
		130				135	140
25	His	Pro	Leu	Thr	Arg	Glu	Ala
	145					150	160
30	Trp	Ile	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys
						165	175
35	Ser	Asp	Glu	Ile	Pro	Leu	Asp
						180	190
40	Ser	Thr	Ala	His	Lys	Met	Asp
			195			200	205
45	Asp	Ile	Glu	Ala	Val	Leu	Pro
		210				215	220
50	His	Arg	Asp	Ala			
55	<210>	42					
	<211>	275					
	<212>	PRT					
	<213>	Beta vulgaris					
60	<400>	42					
65	Met	Lys	Met	Met	Asn	Gly	Glu
	1				5		10
							15
70	Ser	Phe	Phe	Ile	Thr	His	Gly
							20
							25
							30
75	His	Pro	Leu	Arg	Pro	Phe	Phe
			35				40
							45
80	Lys	Lys	Pro	Lys	Ala	Ile	Leu

ES 2 930 456 T3

	50	55	60	
5	Lys 65	Pro Thr Val Asn 70	Ala Val His Ile Asn 75	Asp Thr Ile His Asp Phe 80
10	Asp 85	Asp Tyr Pro Ala 85	Ala Met Tyr Gln Phe 90	Lys Tyr Pro Ala Pro Gly 95
15	Glu 100	Pro Glu Leu Ala 100	Arg Lys Val Glu 105	Glu Ile Leu Lys Lys Ser Gly 110
20	Phe 115	Glu Thr Ala Glu 115	Thr Asp Gln Lys Arg Gly 120	Leu Asp His Gly Ala 125
25	Trp 130	Val Pro Leu Met Leu 135	Met Tyr Pro Glu Ala Asp 140	Ile Pro Val Cys
30	Gln 145	Leu Ser Val Gln 150	Pro His Leu Asp Gly 155	Thr Tyr His Tyr Asn Leu 160
35	Gly 165	Arg Ala Leu Ala 165	Pro Leu Lys Asn Asp 170	Gly Val Leu Ile Ile Gly 175
40	Ser 180	Gly Ser Ala Thr 180	His Pro Leu Asp 185	Glu Thr Pro His Tyr Phe Asp 190
45	Gly 195	Val Ala Pro Trp Ala 200	Ala Phe Asp Ser Trp 205	Leu Arg Lys Ala
50	Leu 210	Ile Asn Gly Arg Phe 215	Glu Glu Val Asn Ile 220	Tyr Glu Ser Lys Ala
55	Pro 225	Asn Trp Lys Leu Ala 230	His Pro Phe Pro 235	Glu His Phe Tyr Pro Leu 240
60	His 245	Val Val Leu Gly Ala 245	Ala Ala Gly Glu 250	Lys Trp Lys Ala Glu Leu Ile 255
65	His 260	Ser Ser Trp Asp 260	His Gly Thr Leu 265	Cys His Gly Ser Tyr Lys Phe 270
	Thr 275	Ser Ala		
60	<210> 43 <211> 500 <212> PRT <213> Mirabilis jalapa			
65	<400> 43			

ES 2 930 456 T3

	Met	Thr	Ala	Ile	Lys	Met	Asn	Thr	Asn	Gly	Glu	Gly	Glu	Thr	Gln	His	
	1				5					10					15		
5	Ile	Leu	Met	Ile	Pro	Phe	Met	Ala	Gln	Gly	His	Leu	Arg	Pro	Phe	Leu	
				20					25					30			
10	Glu	Leu	Ala	Met	Phe	Leu	Tyr	Lys	Arg	Ser	His	Val	Ile	Ile	Thr	Leu	
			35					40					45				
15	Leu	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Ala	Gly	Phe	Leu	Arg	His	Leu	Leu	His	His	
		50					55					60					
20	His	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Arg	Ile	Val	Glu	Leu	Pro	Phe	Asn	
	65					70					75					80	
25	Ser	Thr	Asn	His	Gly	Leu	Pro	Pro	Gly	Ile	Glu	Asn	Thr	Asp	Lys	Leu	
					85					90					95		
30	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Phe	His	Ser	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	
				100					105					110			
35	Pro	His	Leu	Arg	Asp	Tyr	Ile	Ser	Arg	His	Phe	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	
			115					120					125				
40	Pro	Leu	Cys	Val	Ile	His	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Trp	Val	Asp	Gln	Val	
		130					135					140					
45	Ala	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	Thr	Gly	Val	Val	Phe	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	
	145					150					155					160	
50	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ala	Tyr	Val	Ser	Ile	Trp	Asn	Asp	Leu	Pro	His	Gln	
					165					170					175		
55	Asn	Tyr	Ser	Asp	Asp	Gln	Glu	Phe	Pro	Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Glu	Asn	
				180					185					190			
60	His	Lys	Phe	Arg	Arg	Ser	Gln	Leu	His	Arg	Phe	Leu	Arg	Tyr	Ala	Asp	
			195					200					205				
65	Gly	Ser	Asp	Asp	Trp	Ser	Lys	Tyr	Phe	Gln	Pro	Gln	Leu	Arg	Gln	Ser	
		210					215					220					
70	Met	Lys	Ser	Phe	Gly	Trp	Leu	Cys	Asn	Ser	Val	Glu	Glu	Ile	Glu	Thr	
	225					230					235					240	

ES 2 930 456 T3

	Leu Gly Phe Ser Ile Leu Arg Asn Tyr Thr Lys Leu Pro Ile Trp Gly	245	250	255
5	Ile Gly Pro Leu Ile Ala Ser Pro Val Gln His Ser Ser Ser Asp Asn	260	265	270
10	Asn Ser Thr Gly Ala Glu Phe Val Gln Trp Leu Ser Leu Lys Glu Pro	275	280	285
15	Asp Ser Val Leu Tyr Ile Ser Phe Gly Ser Gln Asn Thr Ile Ser Pro	290	295	300
20	Thr Gln Met Met Glu Leu Ala Ala Gly Leu Glu Ser Ser Glu Lys Pro	305	310	315
25	Phe Leu Trp Val Ile Arg Ala Pro Phe Gly Phe Asp Ile Asn Glu Glu	325	330	335
30	Met Arg Pro Glu Trp Leu Pro Glu Gly Phe Glu Glu Arg Met Lys Val	340	345	350
35	Lys Lys Gln Gly Lys Leu Val Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Leu Glu Ile	355	360	365
40	Leu Asn His Glu Ser Ile Gly Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn	370	375	380
45	Ser Ile Leu Glu Ser Leu Arg Glu Gly Val Pro Met Leu Gly Trp Pro	385	390	395
50	Leu Ala Ala Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Lys Tyr Leu Glu Asp Glu Met	405	410	415
55	Gly Val Ala Val Glu Leu Ala Arg Gly Leu Glu Gly Glu Ile Ser Lys	420	425	430
60	Glu Lys Val Lys Arg Ile Val Glu Met Ile Leu Glu Arg Asn Glu Gly	435	440	445
65	Ser Lys Gly Trp Glu Met Lys Asn Arg Ala Val Glu Met Gly Lys Lys	450	455	460
	Leu Lys Asp Ala Val Asn Glu Glu Lys Glu Leu Lys Gly Ser Ser Val	465	470	475
	Lys Ala Ile Asp Asp Phe Leu Asp Ala Val Met Gln Ala Lys Leu Glu	485	490	495
	Pro Ser Leu Gln		500	

ES 2 930 456 T3

<210> 44
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Mirabilis jalapa

<400> 44

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Met Glu Asn Thr Met Leu Gly Val Ile Leu Ala Thr Ile Phe Leu Thr
1      5      10      15

Phe His Ile Met Lys Met Leu Phe Ser Pro Ser Lys Val Lys Leu Pro
20      25      30

Pro Gly Pro Arg Pro Leu Pro Ile Ile Gly Asn Ile Leu Glu Leu Gly
35      40      45

Asp Lys Pro His Arg Ser Phe Ala Asn Leu Ala Lys Ile His Gly Pro
50      55      60

Leu Val Thr Leu Lys Leu Gly Ser Val Thr Thr Ile Val Val Ser Ser
65      70      75      80

Ser Glu Val Ala Lys Glu Met Phe Leu Lys Asn Asp Gln Pro Leu Ala
85      90      95

Asn Arg Thr Ile Pro Asp Ser Val Arg Ala Gly Asn His Asp Lys Leu
100     105     110

Ser Met Ser Trp Leu Pro Val Ser Pro Lys Trp Arg Asn Leu Arg Lys
115     120     125

Ile Ser Ala Val Gln Leu Leu Ser Thr Gln Arg Leu Asp Ala Ser Gln
130     135     140

Ala His Arg Gln Ala Lys Ile Lys Gln Leu Ile Glu Tyr Val Lys Lys
145     150     155     160

Cys Ser Lys Ile Gly Gln Tyr Val Asp Ile Gly Gln Val Ala Phe Thr
165     170     175

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

Ser Phe Asp Ser Asp Asn Ala Gln Glu Phe Lys Gln Leu Met Trp Cys
195     200     205
  
```

ES 2 930 456 T3

	Ile	Met	Glu	Glu	Ile	Gly	Arg	Pro	Asn	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Pro	Ile	
	210					215					220						
5	Leu	Gly	Tyr	Val	Asp	Pro	Phe	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg	Leu	Ser	Arg	Tyr	
	225					230				235						240	
10	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Glu	Val	Phe	Gln	Val	Ile	Ile	Arg	Glu	Arg	Leu	
					245					250					255		
15	Thr	His	Asp	Asn	Asn	Ile	Val	Gly	Asn	Asn	Asn	Asp	Val	Leu	Ala	Thr	
				260					265					270			
20	Leu	Leu	Asp	Leu	Tyr	Lys	Gln	Asn	Glu	Leu	Thr	Met	Asp	Glu	Ile	Asn	
			275					280					285				
25	His	Leu	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Thr	Ala	Ser	
	290					295						300					
30	Thr	Leu	Glu	Trp	Ala	Met	Ser	Glu	Leu	Ile	Lys	Asn	Pro	His	Ile	Met	
	305					310				315						320	
35	Ala	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	Val	Arg	Arg	Ala	Thr	Met	Ser	His	Gly	Gly	
				325					330						335		
40	Ala	Thr	Val	Ala	Glu	Ile	Gln	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Asn	Leu	Pro	Tyr	
				340					345					350			
45	Ile	Gln	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Pro	Pro	Thr	Val	
			355					360					365				
50	Phe	Leu	Leu	Pro	Arg	Lys	Ala	Asp	Val	Asp	Val	Gln	Leu	Phe	Gly	Tyr	
	370					375						380					
55	Val	Val	Pro	Lys	Asn	Ala	Gln	Val	Leu	Val	Asn	Leu	Trp	Ala	Ile	Gly	
	385					390				395						400	
60	Arg	Asp	Pro	Asn	Val	Trp	Pro	Asp	Pro	Glu	Val	Phe	Ser	Pro	Glu	Arg	
				405					410						415		
65	Phe	Met	Asp	Cys	Glu	Ile	Asp	Val	Lys	Gly	Arg	Asp	Phe	Glu	Leu	Leu	
			420						425					430			
70	Pro	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Cys	Pro	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Tyr	
			435					440					445				
75	Arg	Met	Leu	Asn	Leu	Met	Leu	Ala	Asn	Met	Val	His	Ser	Phe	Asp	Trp	
	450					455						460					

ES 2 930 456 T3

	Lys	Leu	Pro	Gly	Val	Glu	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Asp	Ser	Leu
	465					470					475					480

5	Asp	Met	Asp	Glu	Lys	Phe	Gly	Ile	Thr	Leu	Gln	Lys	Val	Gln	Pro	Leu
					485					490					495	

10	Lys	Val	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Lys
					500			

15	<210> 45
	<211> 35
	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> BvDODA1 Dir + XhoI

20	<400> 45
	aaaaactcga ggttaaacct actgttaatg ctgtc 35

25	<210> 46
	<211> 31
	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> BvDODA1 Inv + SacI

30	<400> 46
	aaaaagagct cgctgcccaa ggtgcaactc c 31

35	<210> 47
	<211> 34
	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> CYP76AD1 Dir + XhoI

40	<400> 47
	aaaaactcga ggctaattctt gctaaaattc acgg 34

45	<210> 48
	<211> 33
	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> CYP76AD1 Inv + SacI

50	<400> 48
	aaaaagagct cttatgggtgg gctaattcca ctg 33

55	<210> 49
	<211> 34
	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
	<223> CYP76AD1 Dir + BamHI

60	<400> 49
	aaaaaggatc cgctaattctt gctaaaattc acgg 34

65	<210> 50
	<211> 33
	<212> ADN
	<213> Artificial

<220>
 <223> CYP76AD1 Inv + EcoRI

 <400> 50
 5 aaaaagaatt cttatggtgg gctaattcca ctg 33

 <210> 51
 <211> 32
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> BvCYP76new Dir + XhoI

 <400> 51
 15 aaaaactcga gctgcaagag tcaatgatct ca 32

 <210> 52
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> BvCYP76new Inv + SacI

 <400> 52
 25 aaaaaggct ctcatctggg aattggaatt gct 33

 <210> 53
 <211> 32
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD6 Dir + XhoI

 <400> 53
 35 aaaaactcga gcacaacagc aagcacatta ga 32

 <210> 54
 <211> 33
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD6 Inv + SacI

 <400> 54
 45 aaaaagagct cagtccaggg catatccttc tac 33

 <210> 55
 <211> 41
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> BvDODA1 Dir

 <400> 55
 55 ggcgcgtctc gctcgaatga aaatgatgaa tggatgaagat g 41

 <210> 56
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> BvDODA1 Inv

 <400> 56
 65 ggcgcgtctc gctcgaagcc taggctgaag tgaacttgta 40

5 <210> 57
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD1 Dir

10 <400> 57
 gcgccgtctc gctcgaatgg atcatgcaac attagcaatg 40
 <210> 58
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> CYP76AD1 Inv

20 <400> 58
 gcgccgtctc gctcgaagct caatacctag gtattggaat aag 43
 <210> 59
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> CYP76AD6 Dir1

30 <400> 59
 gcgccgtctc gctcgaatgg ataacgcaac acttgct 37
 <210> 60
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> CYP76AD6 Inv1

40 <400> 60
 gcgccgtctc gttgccatt ctaatgtgct tg 32
 <210> 61
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> CYP76AD6 Dir2

50 <400> 61
 gcgccgtctc ggcaatggcc gaactgtga a 31
 <210> 62
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> CYP76AD6 Inv2

60 <400> 62
 gcgccgtctc gctcgaagcc tagtttctgg gaactggaat 40
 <210> 63
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> cDOPA5GT Dir1

<400> 63
 gcgccgtctc gctcgaatga ccgccattaa aatgaacac 39

 5 <210> 64
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cDOPA5GT Inv1

 10 <400> 64
 gcgccgtctc ggcctcattt cctcattgat atc 33

 15 <210> 65
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cDOPA5GT Dir2

 20 <400> 65
 gcgccgtctc gaggccagaa tggctaccag a 31

 25 <210> 66
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cDOPA5GT Inv2

 30 <400> 66
 gcgccgtctc gctcgaagct tattgaagag aaggttcaa ct 43

 35 <210> 67
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> BvDODA1 Dir

 40 <400> 67
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catgaaaatg atgaatggtg aagat 55

 45 <210> 68
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> BvDODA1 Inv

 50 <400> 68
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctaggctgaa gtgaactgt aggag 55

 55 <210> 69
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD1 Dir

 60 <400> 69
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catggatcat gcaacattag caa 53

 65 <210> 70
 <211> 57
 <212> ADN

ES 2 930 456 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD1 Inv

5 <400> 70
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaataccta ggtattggaa taagttt 57

10 <210> 71
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD6 Dir

15 <400> 71
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catggataac gcaacacttg ctgtgatcc 59

20 <210> 72
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CYP76AD6 Inv

25 <400> 72

 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagtttctg ggaactggaa taacttgaag 60

 ag 62

30

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima implicada en la conversión de tirosina en L-DOPA, en donde dicha secuencia de ácido nucleico es un gen CYP76AD6 bajo el control de un promotor o un gen CYP76AD15 bajo el control de un promotor.
2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de ácido nucleico del gen CYP76AD6 es como se expone en SEQ ID NO: 31, o en donde la secuencia de ácido nucleico del gen CYP76AD15 es como se expone en SEQ ID NO: 35.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de selección, tal como el gen de neomicina fosfotransferasa II (nptII).
4. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho promotor es un promotor constitutivo o es un promotor inducible.
5. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho promotor constitutivo es un promotor 35S de CaMV, un promotor de ubiquitina 10, un promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum* (SIUb10), o un promotor de ubiquitina-10 de *Arabidopsis*, o en donde dicho promotor inducible es un promotor inducible por galactosa.
6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde dicho polinucleótido es el vector de expresión pDOPA1, que comprende el gen CYP76AD6 impulsado por el promotor 35S de CaMV; o el vector de expresión pDOPA2, que comprende el gen CYP76AD6 impulsado por el promotor de ubiquitina 10 de *Solanum lycopersicum*.
7. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho promotor es un promotor específico de frutas tal como el promotor E8, o es un promotor específico de flores tal como el promotor de la calcona sintasa (CHS) de *Petunia x hybrida*.
8. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen que aumenta la disponibilidad de tirosina en una célula, por ejemplo, un AroG175, o una hidroxilasa de aminoácidos aromáticos (AAH), o una de sus combinaciones.
9. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha célula es una célula vegetal.
10. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), en donde dicha secuencia de ácido nucleico se inserta en el polinucleótido en marco.
11. Una composición que comprende el polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o un vector de expresión que comprende el polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o un polipéptido quimérico codificado por el polinucleótido recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Un método para producir L-DOPA en una célula que comprende las etapas de
 - (a) poner en contacto dicha célula con el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10;
 - (b) expresar en dicha célula un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD6 o dicho gen CYP76AD15;
 lo que produce de esta manera L-DOPA.
13. Un método *in vitro* para producir L-DOPA a partir de tirosina que comprende la etapa de poner en contacto la tirosina *in vitro* con un polipéptido recombinante sintetizado a partir de un gen CYP76AD6 o un gen CYP76AD15, lo que produce de esta manera L-DOPA.
14. Un método para producir un colorante amarillo natural que comprende las etapas de
 - (a) poner en contacto una célula con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6 o CYP76AD15, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD);

(b) expresar en dicha célula un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD6 o gen CYP76AD15, y un polipéptido recombinante a partir del gen que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD);

5 en donde se producen betaxantinas en dicha célula, lo que produce de esta manera un colorante amarillo natural.

15. Un método para producir un colorante naranja natural que comprende las etapas de

10 (a) poner en contacto una célula con una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD1, una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), una secuencia de ácido nucleico que codifica CYP76AD6 o CYP76AD15 y una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa relacionada con la betalaína;

15 (b) expresar en dicha célula un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD1, un polipéptido recombinante a partir del gen que codifica la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD), un polipéptido recombinante codificado por dicho gen CYP76AD6 o dicho gen CYP76AD15, y un polipéptido recombinante a partir del gen que codifica la glucosiltransferasa relacionada con la betalaína;

20 en donde se produce una combinación de betacianina y betaxantina, lo que produce de esta manera un colorante naranja natural.

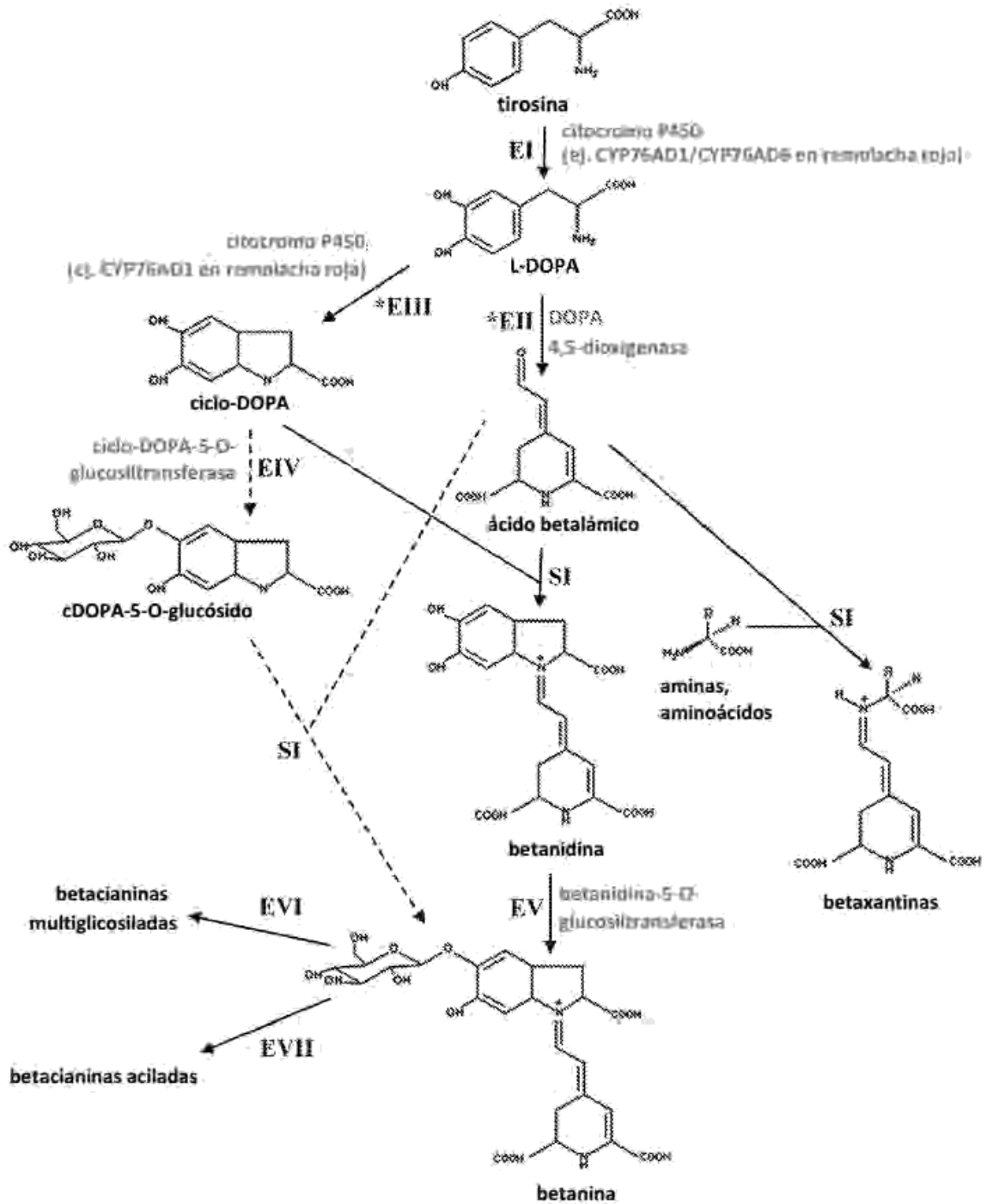


Figura 1

Figura 2A

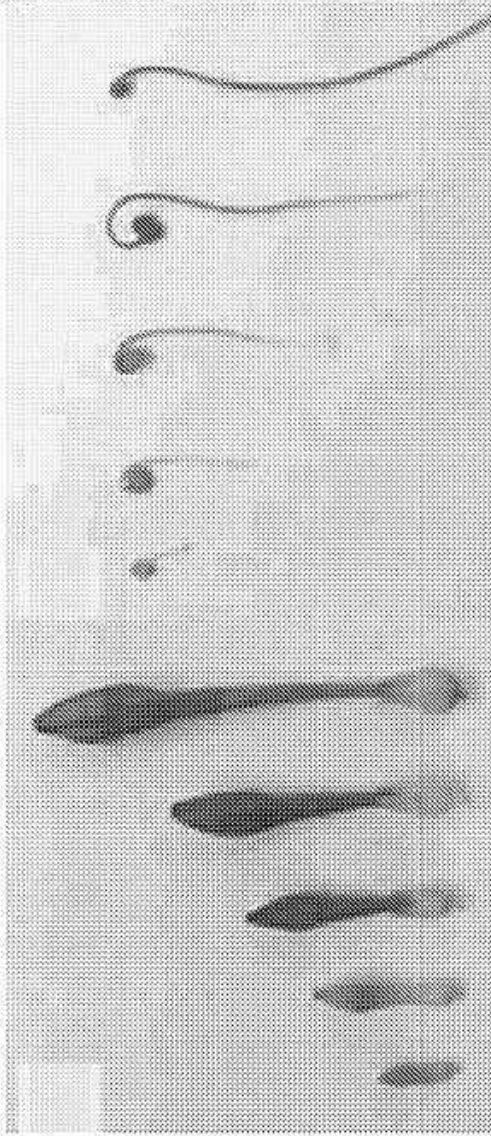


Figura 2B

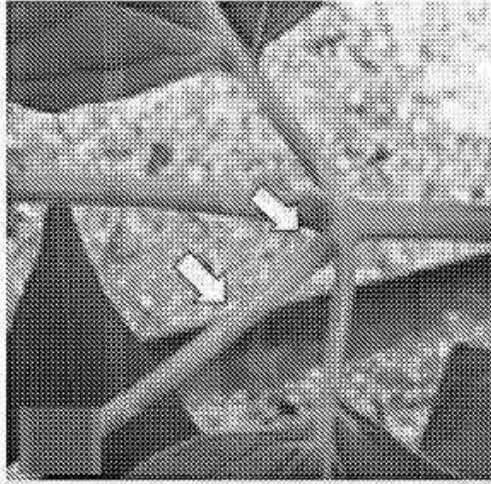


Figura 2C

Figura
2D

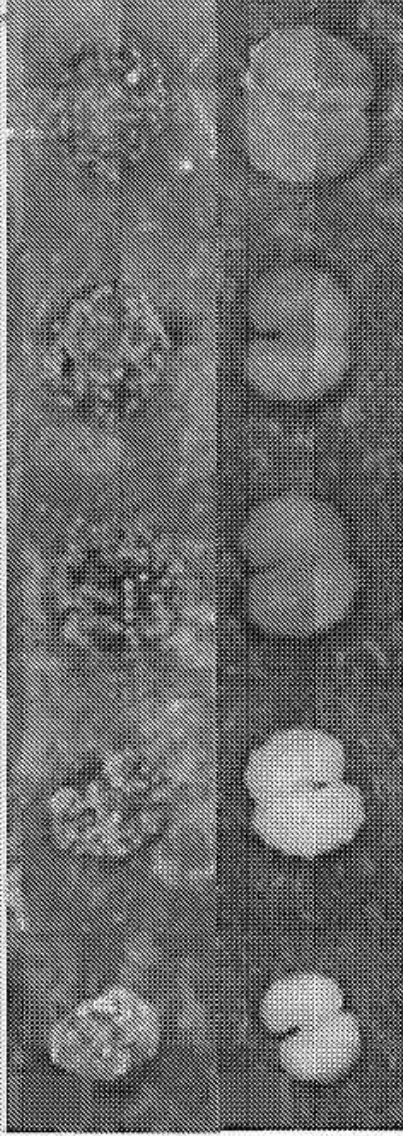


Figura
2E

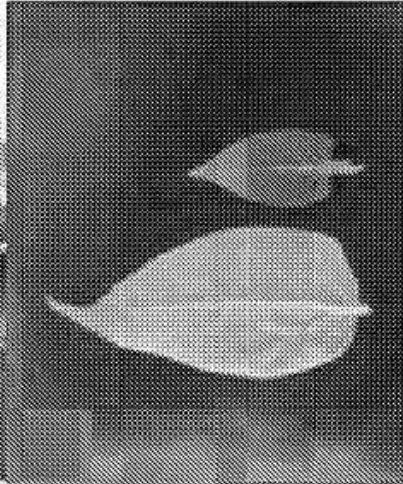


Figura 2F

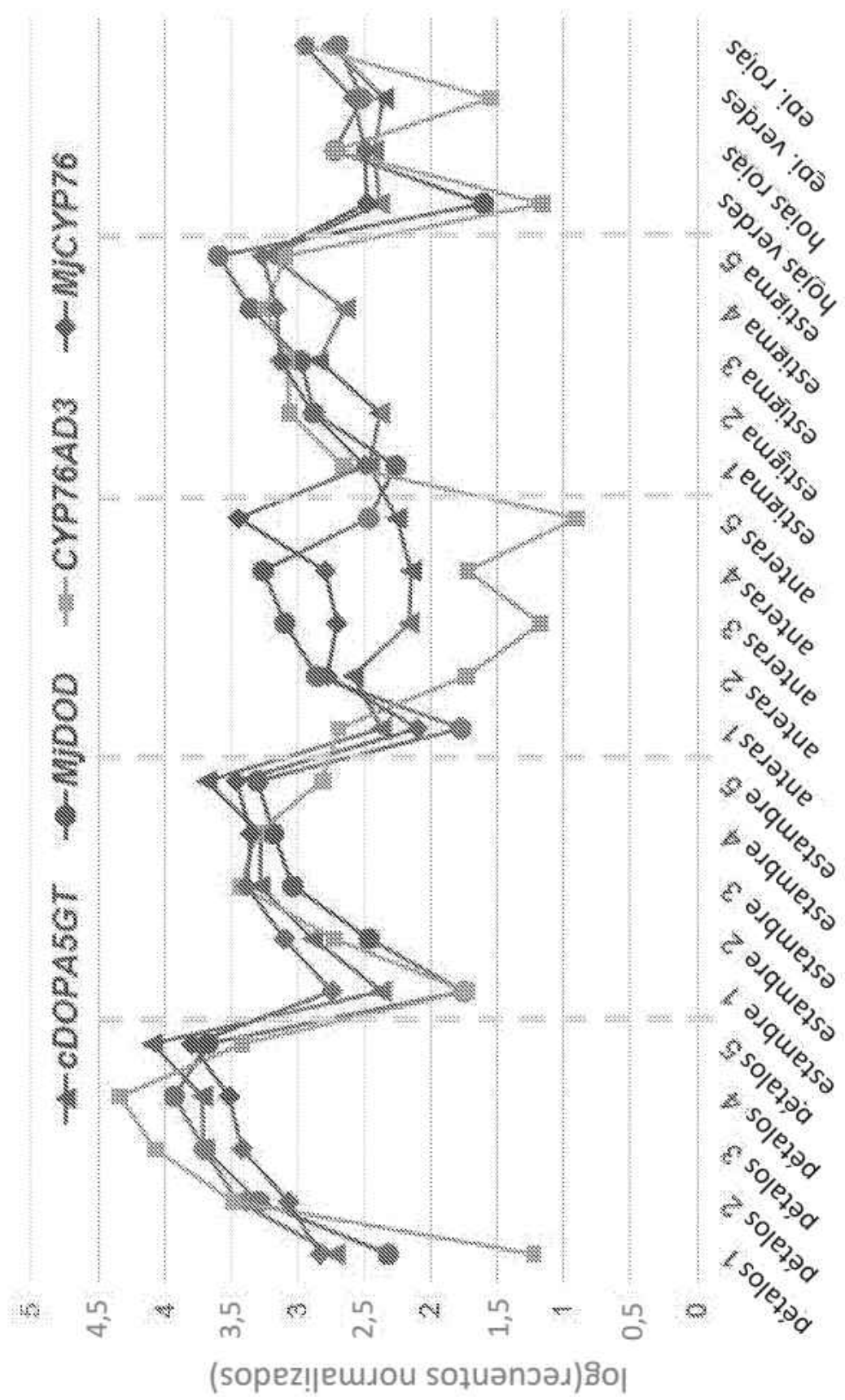


Figura 2G

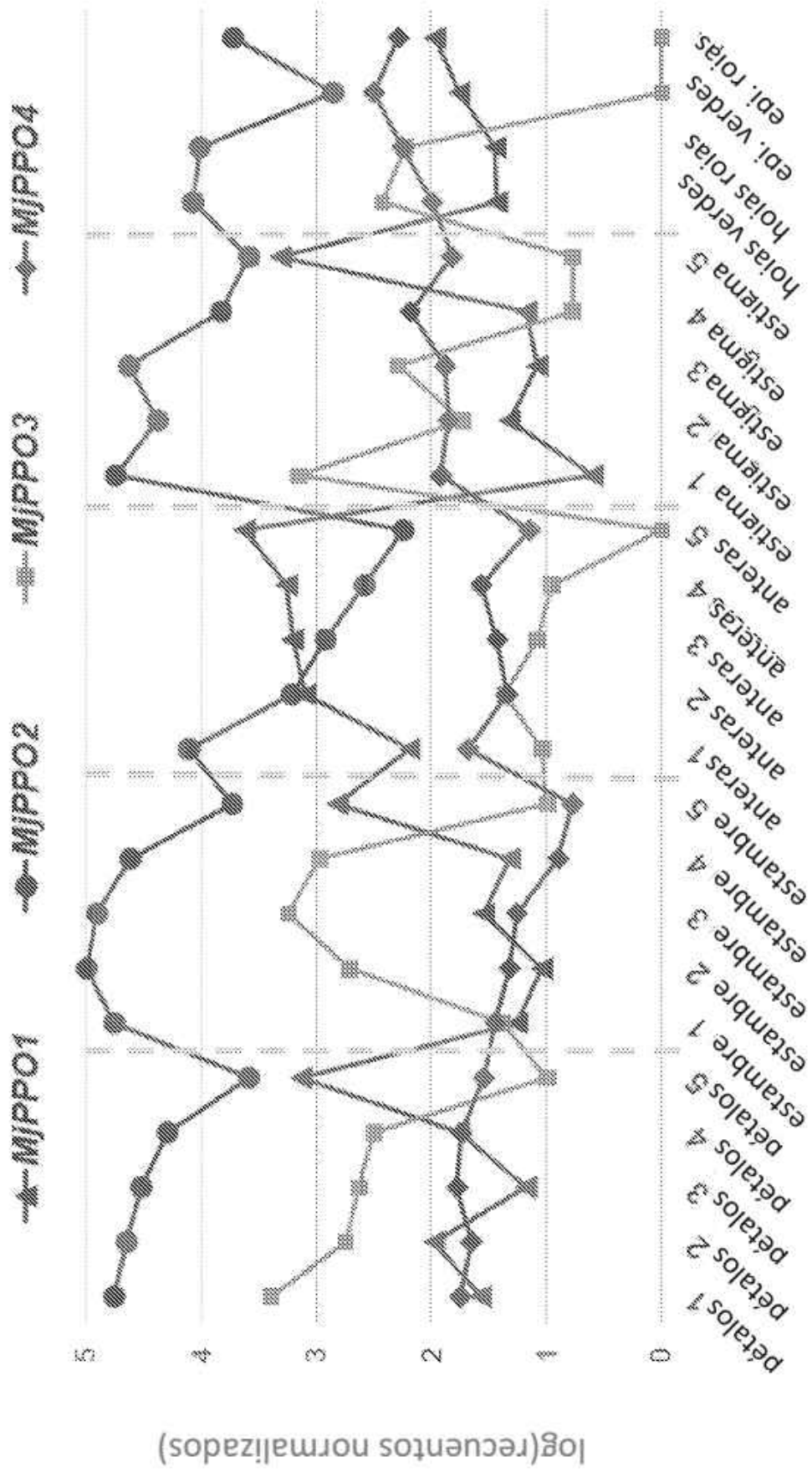


Figura 3

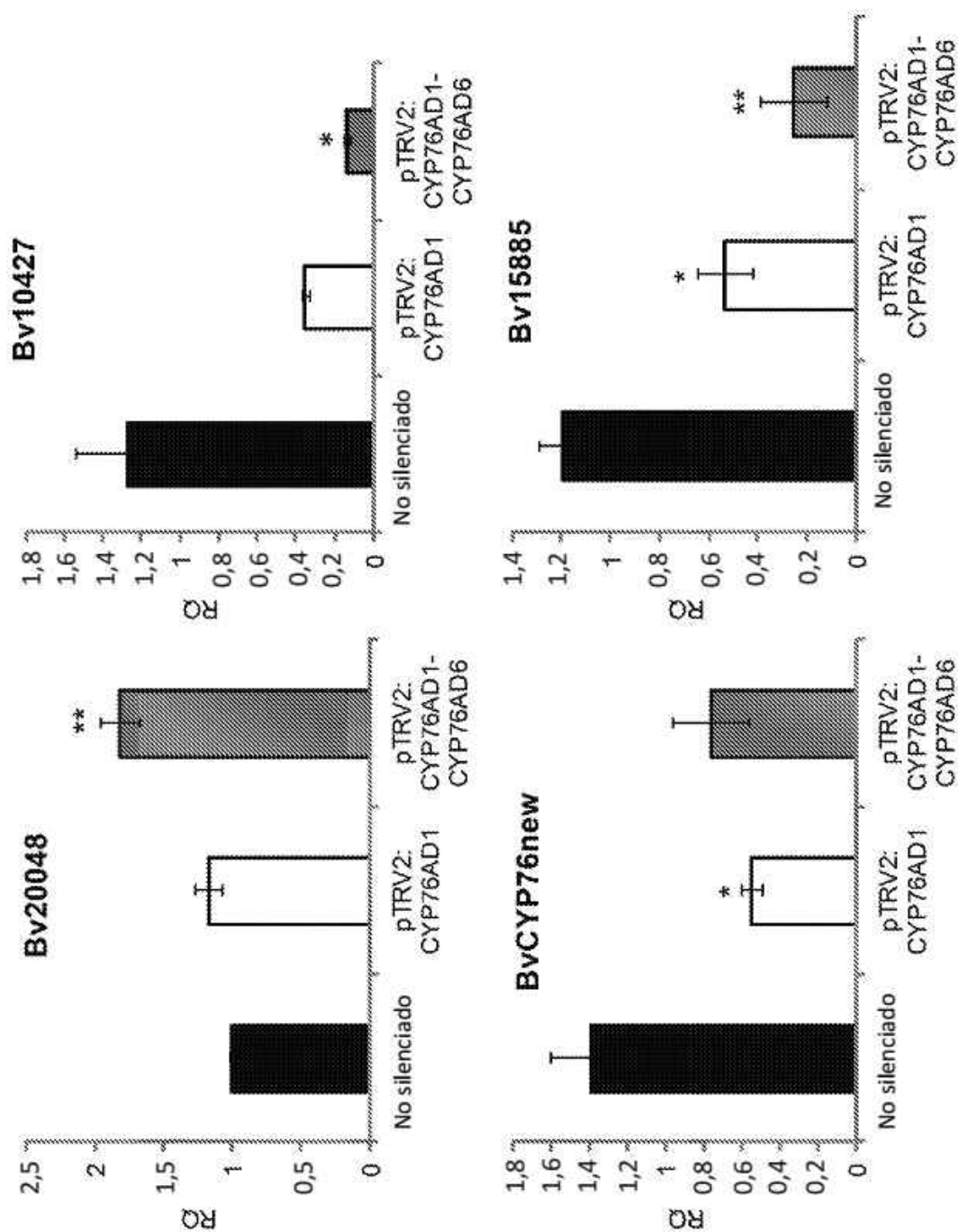


Figura 4A

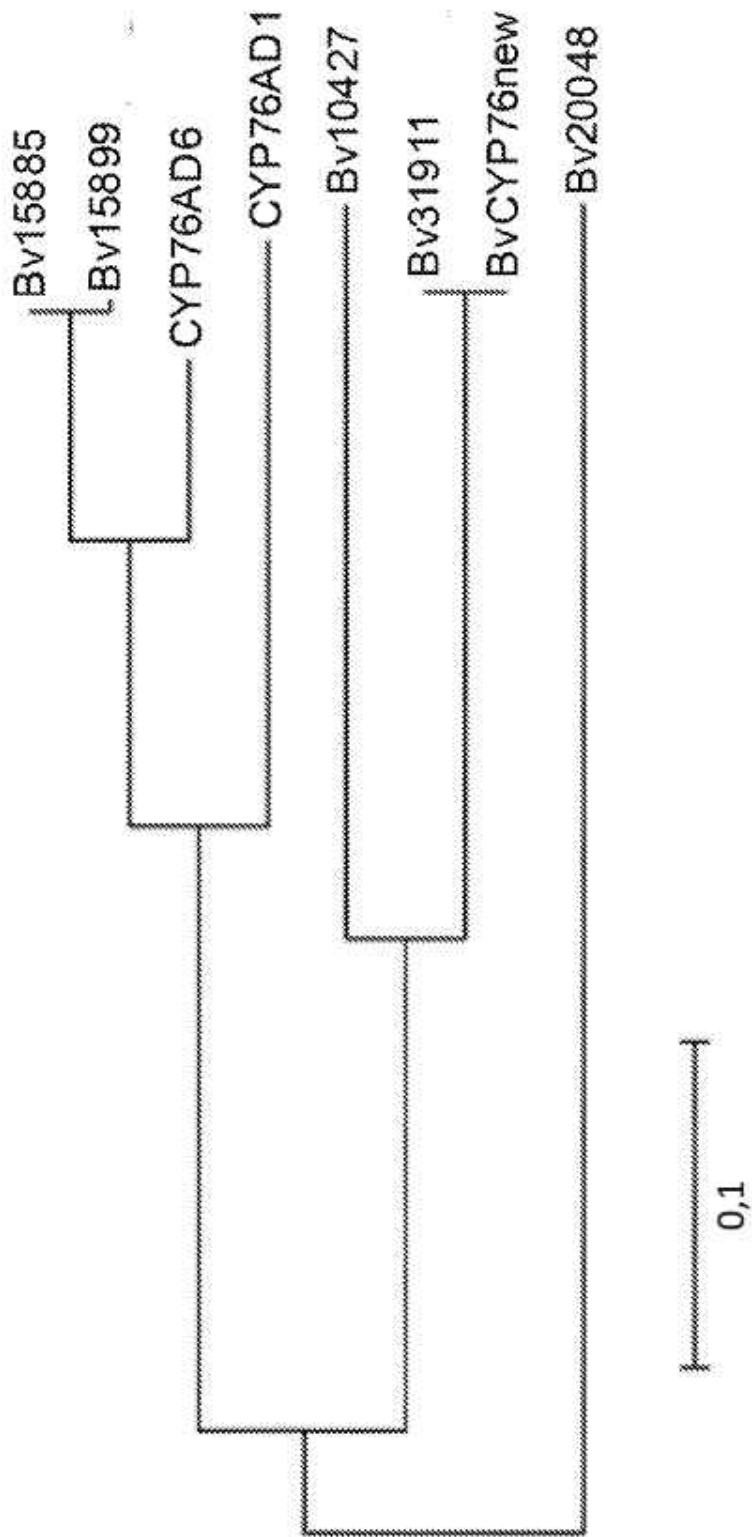


Figura 4B

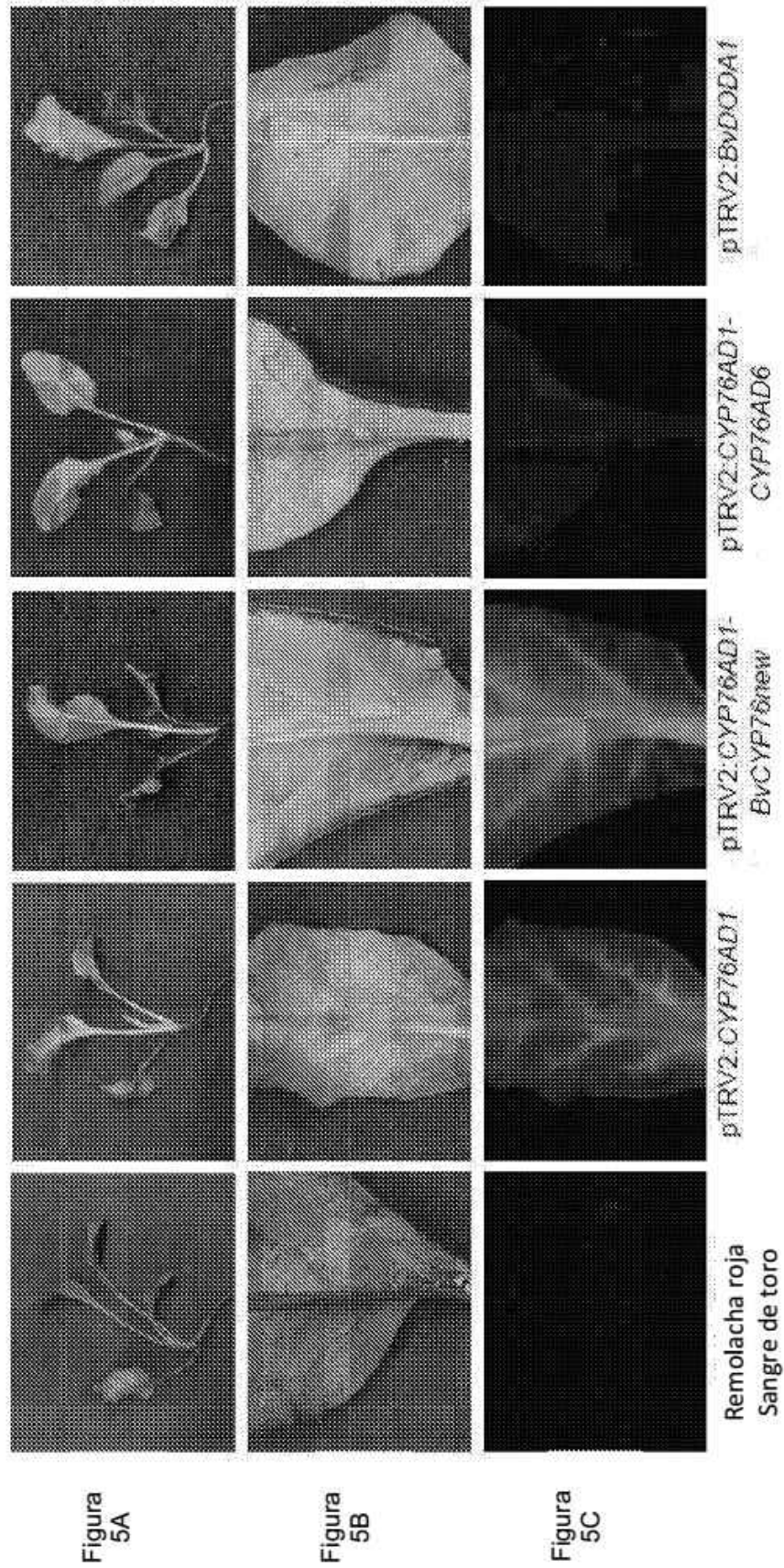


Figura
5A

Figura
5B

Figura
5C

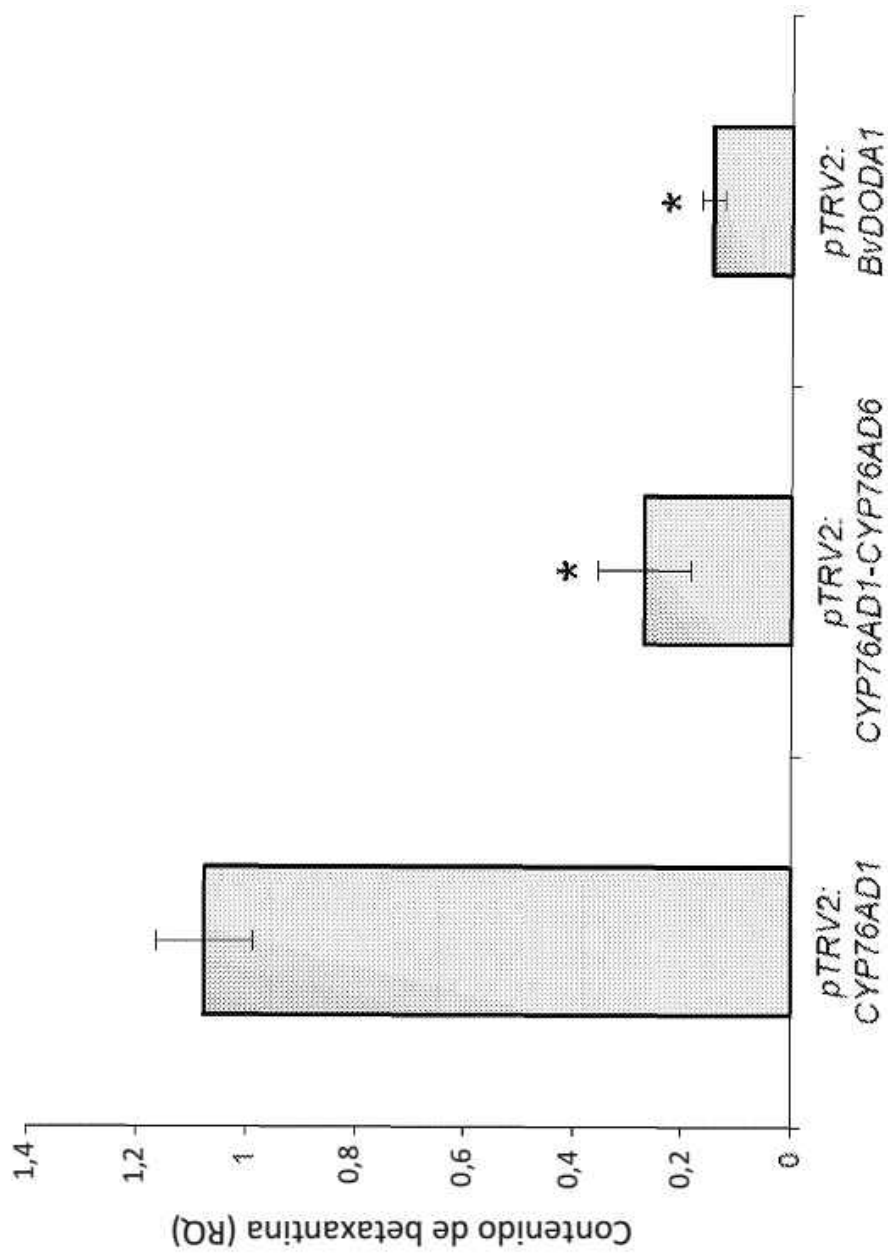


Figura 6A

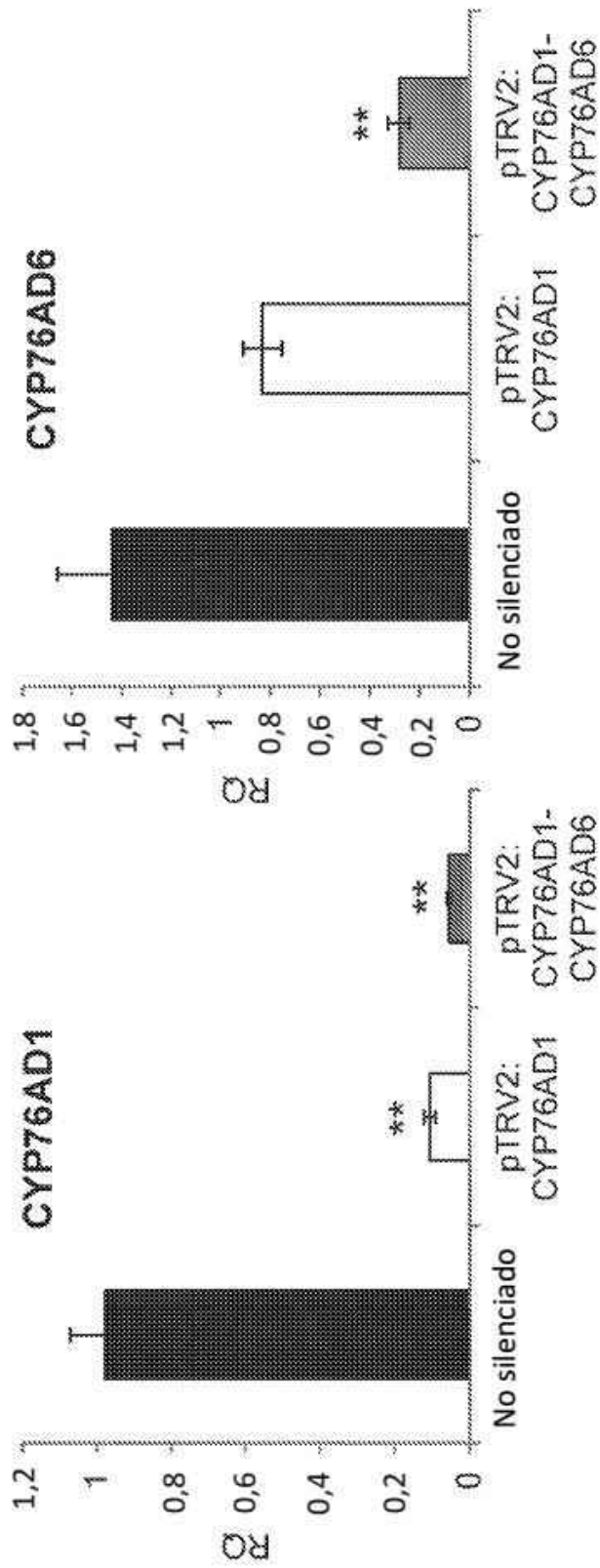


Figura 6B



Figura 7A

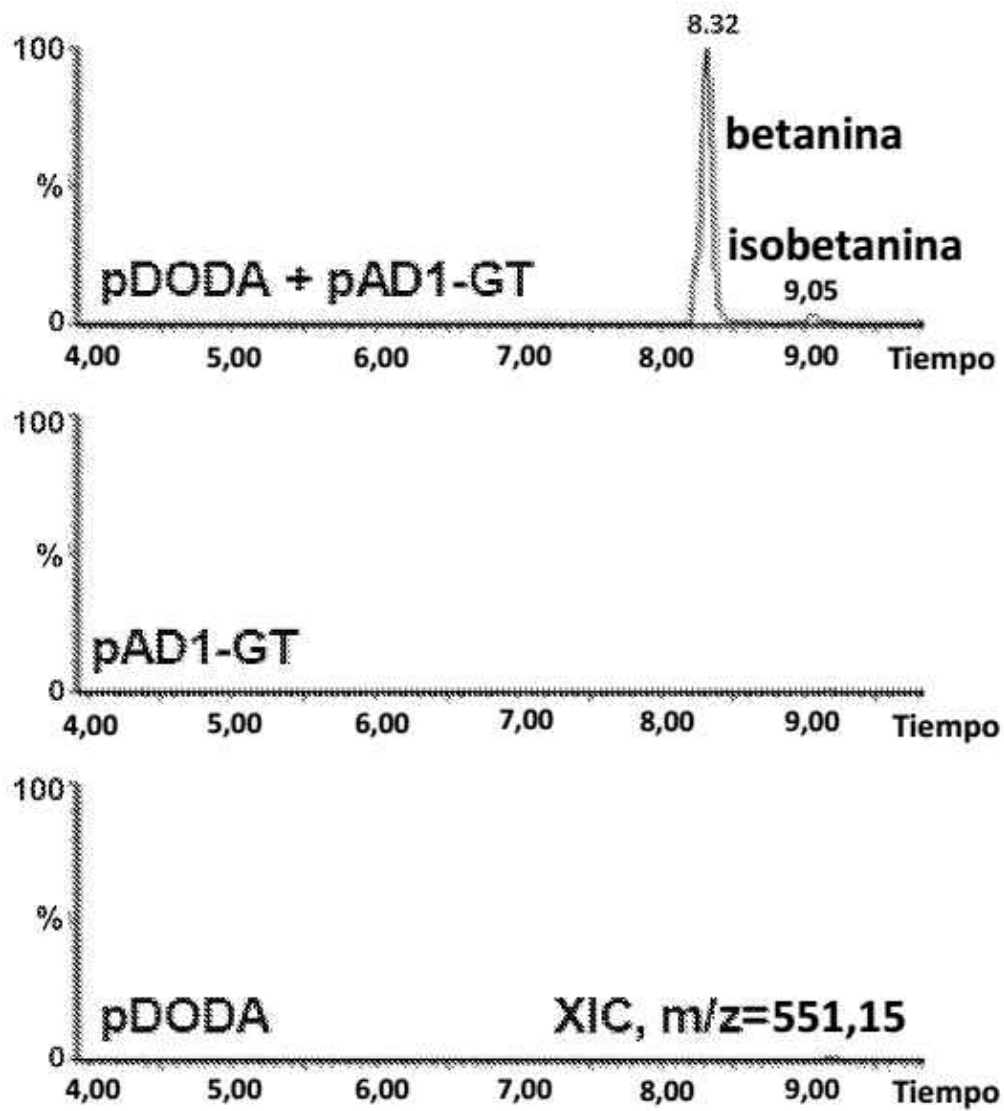


Figura 7B

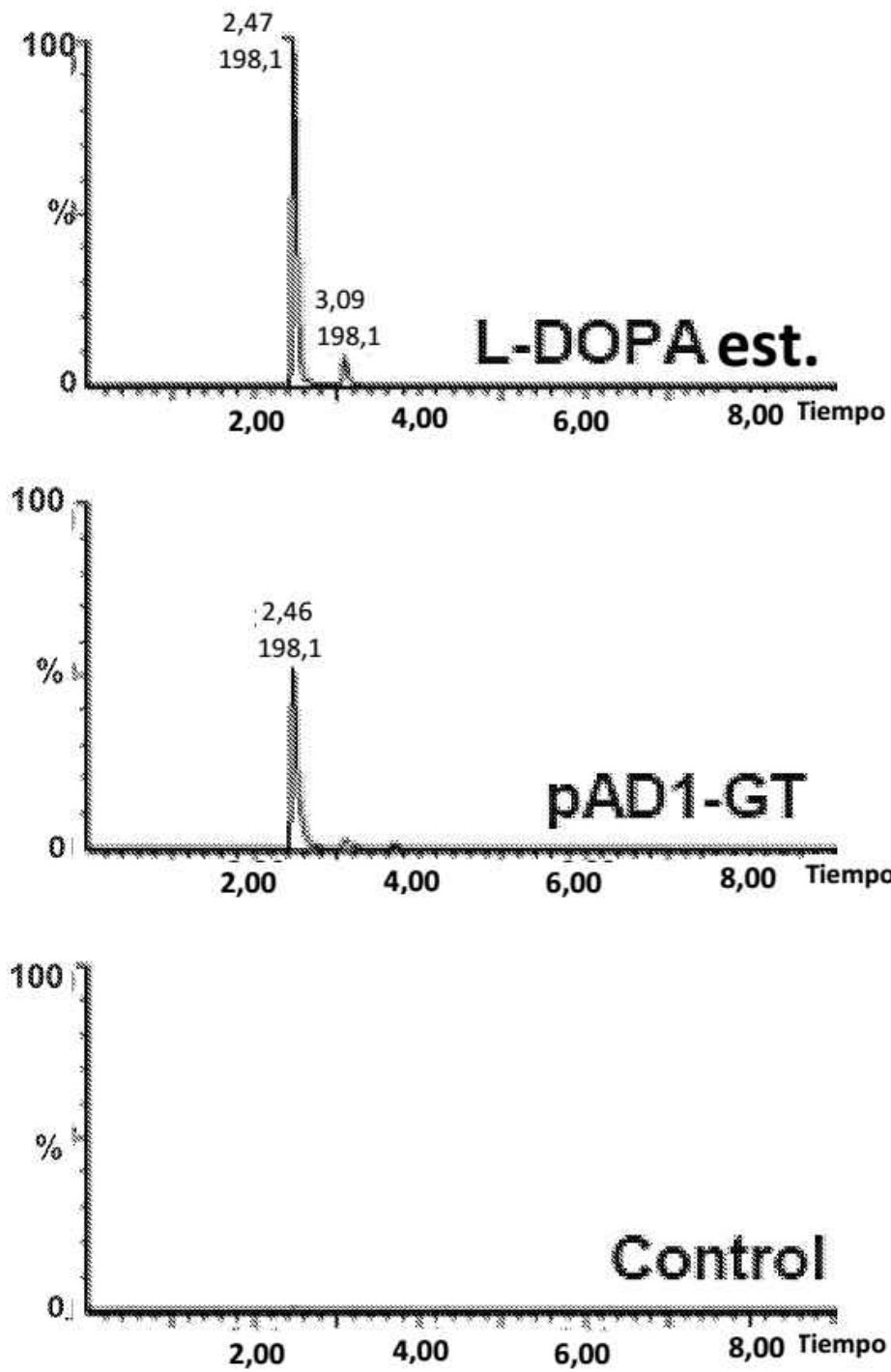


Figura 7C



Figura 7D

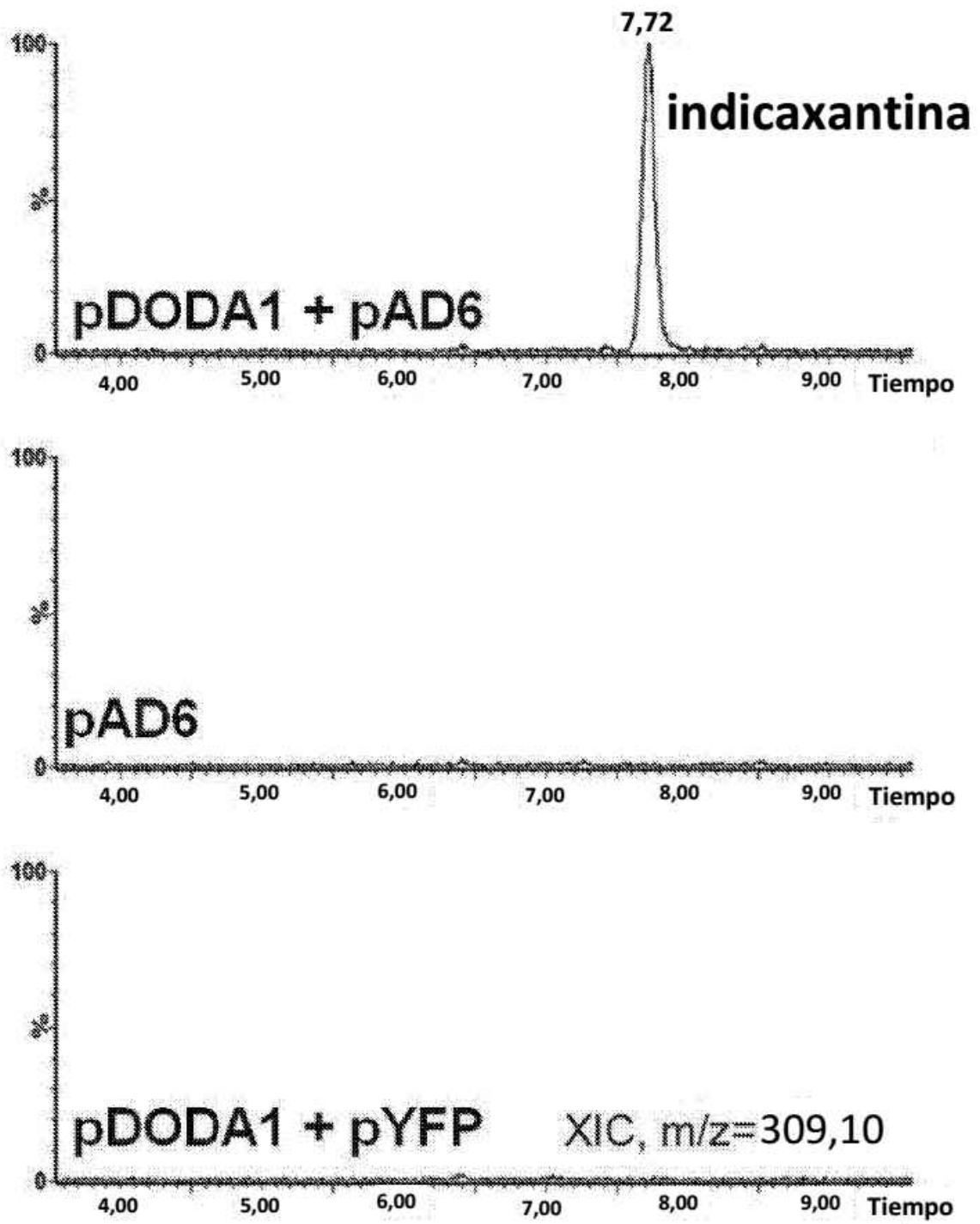


Figura 7E

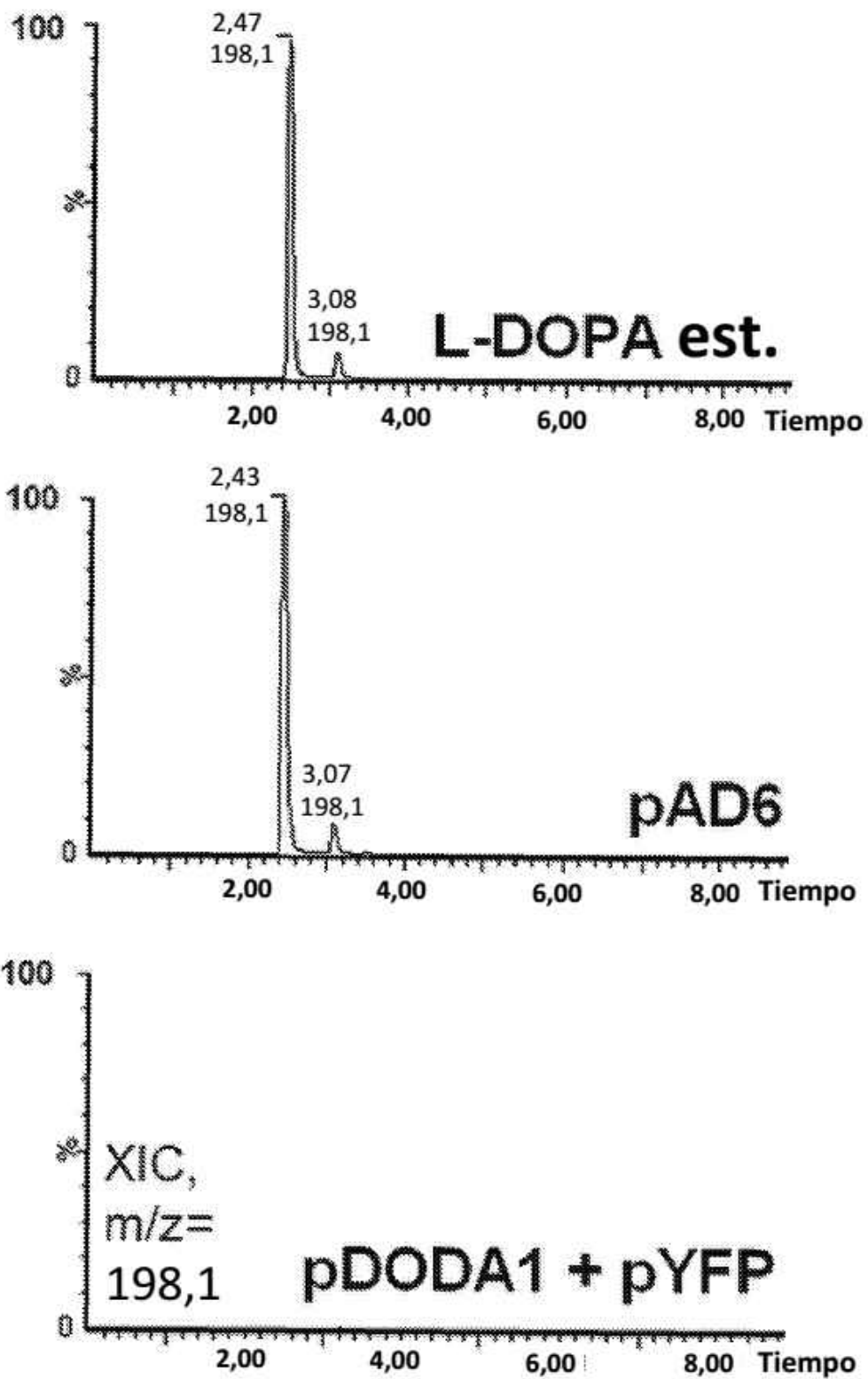


Figura 7F

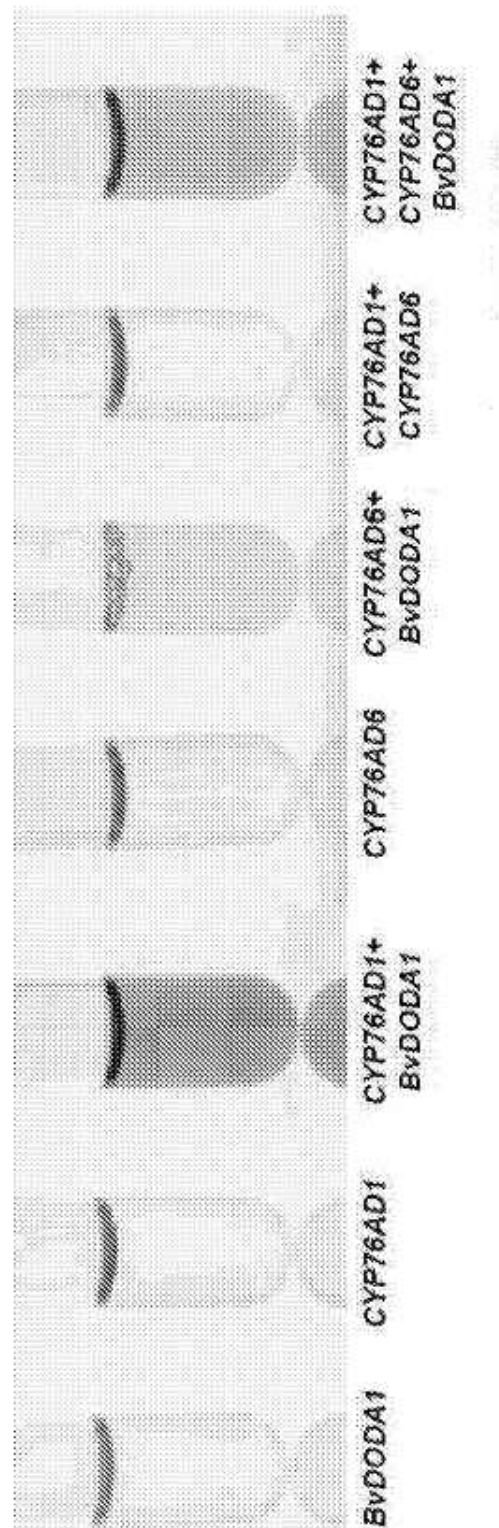


Figura 8A

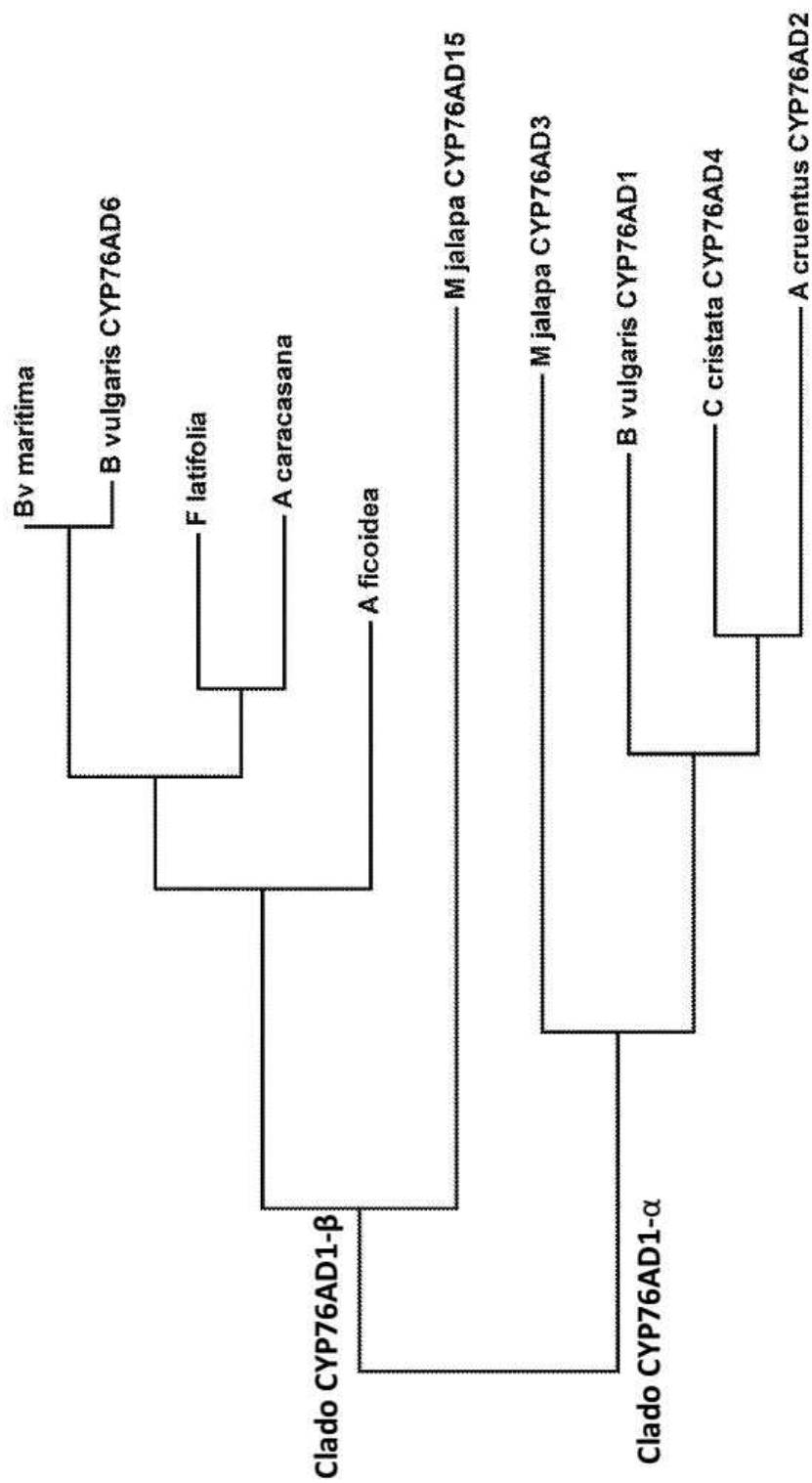


Figura 8B

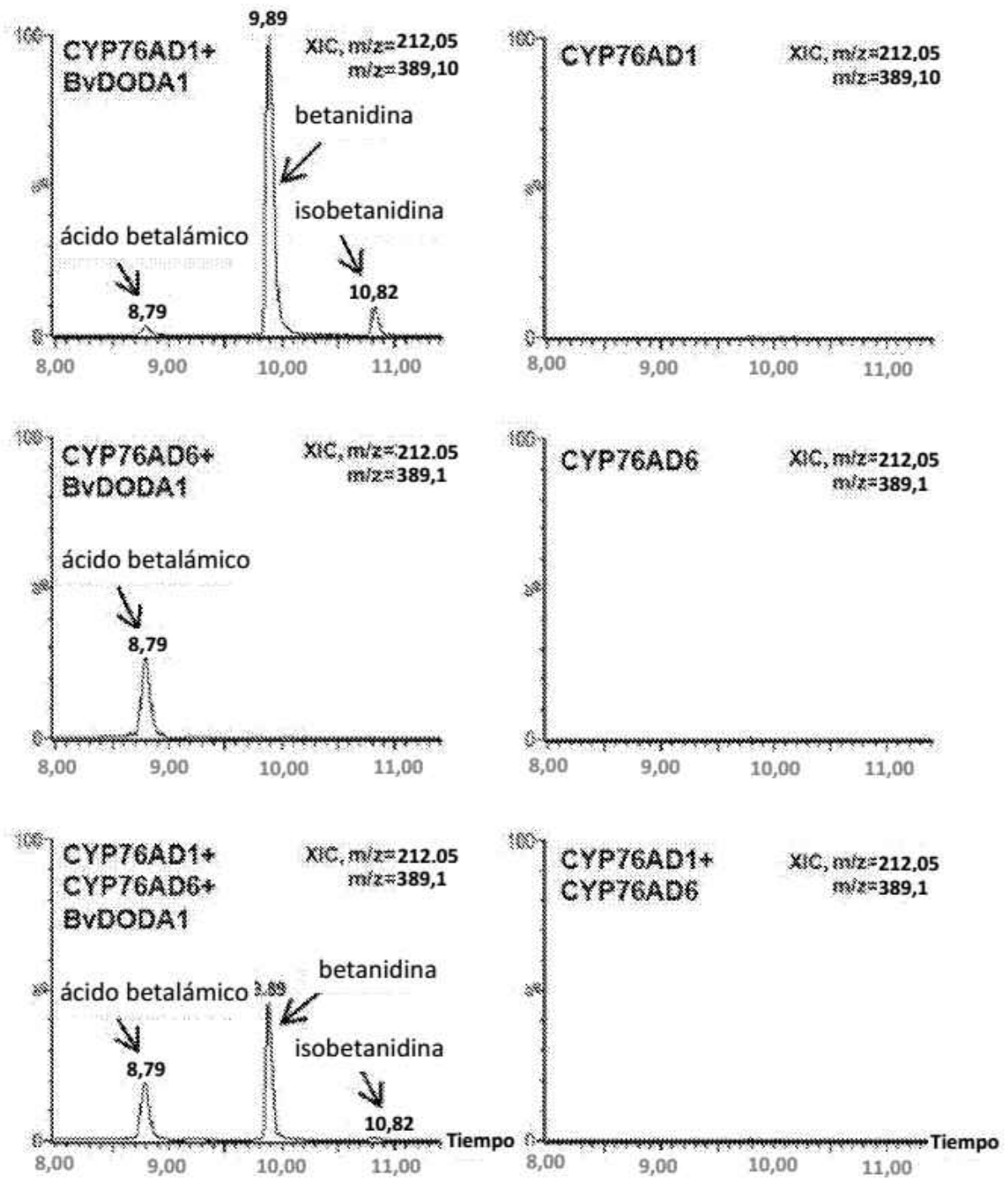


Figura 8C

CYP76AD6	NIATIAVIL	20	*	40	*	60	*	80	*	100
CYP76AD1	NIATIAMII	20	*	40	*	60	*	80	*	100
CYP76AD6	IPESV	120	*	140	*	160	*	180	*	200
CYP76AD1	IPESV	120	*	140	*	160	*	180	*	200
CYP76AD6	QEFKIMNNIN	220	*	240	*	260	*	280	*	300
CYP76AD1	QEFKIMNNIN	220	*	240	*	260	*	280	*	300
CYP76AD6	ASTETT	320	*	340	*	360	*	380	*	400
CYP76AD1	ASTETT	320	*	340	*	360	*	380	*	400
CYP76AD6	RDS	420	*	440	*	460	*	480	*	500
CYP76AD1	RDS	420	*	440	*	460	*	480	*	500

Figura 9

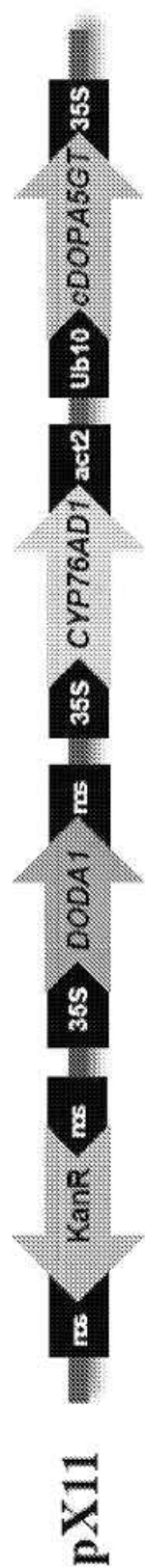


Figura 10

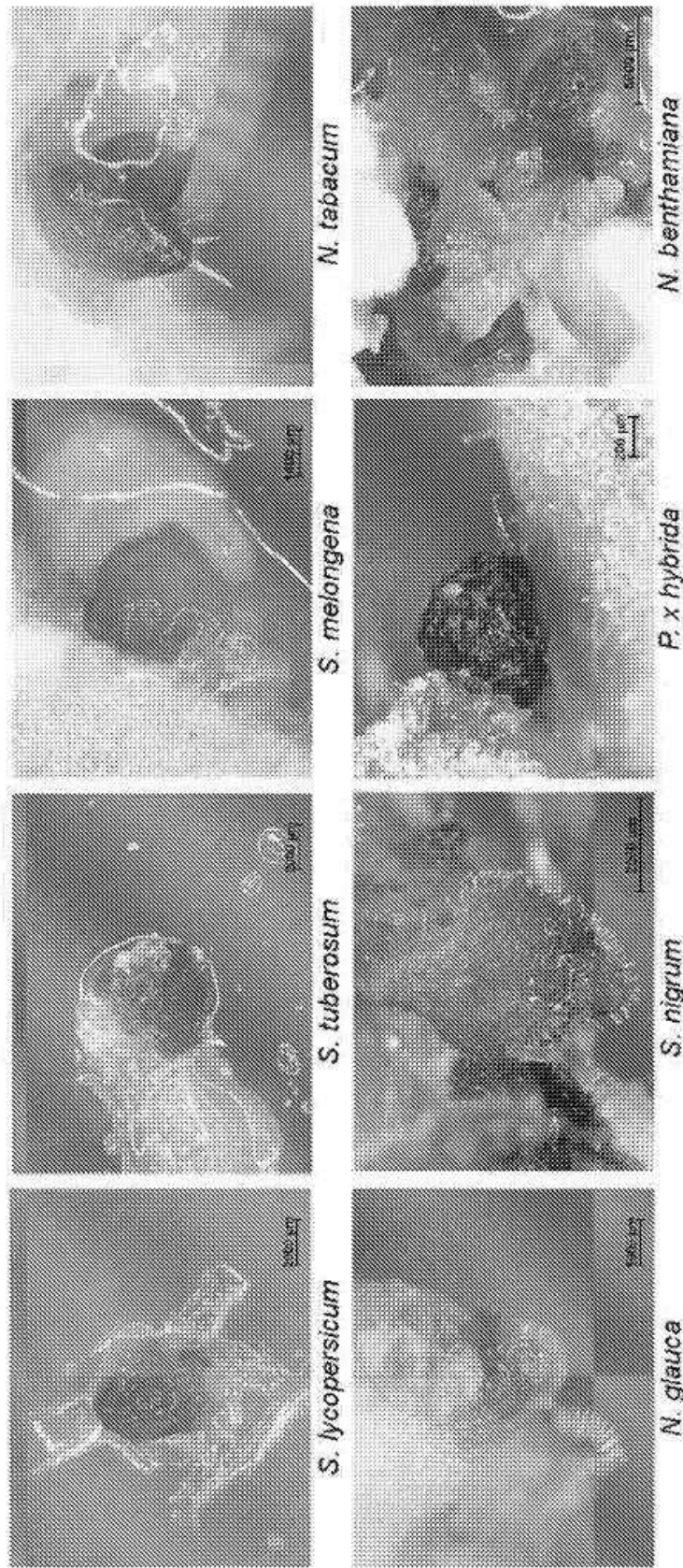


Figura 11A

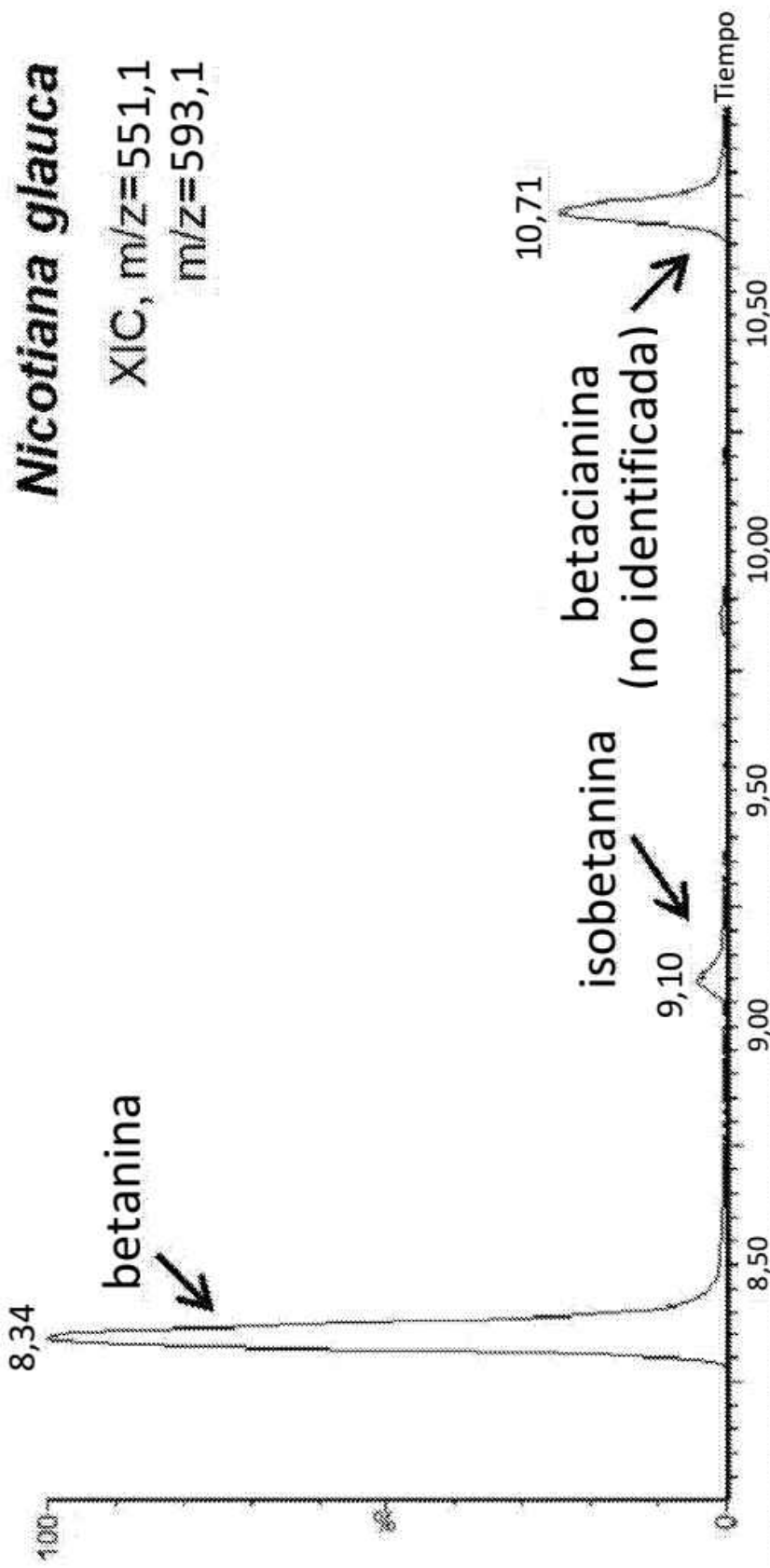


Figura 11B1

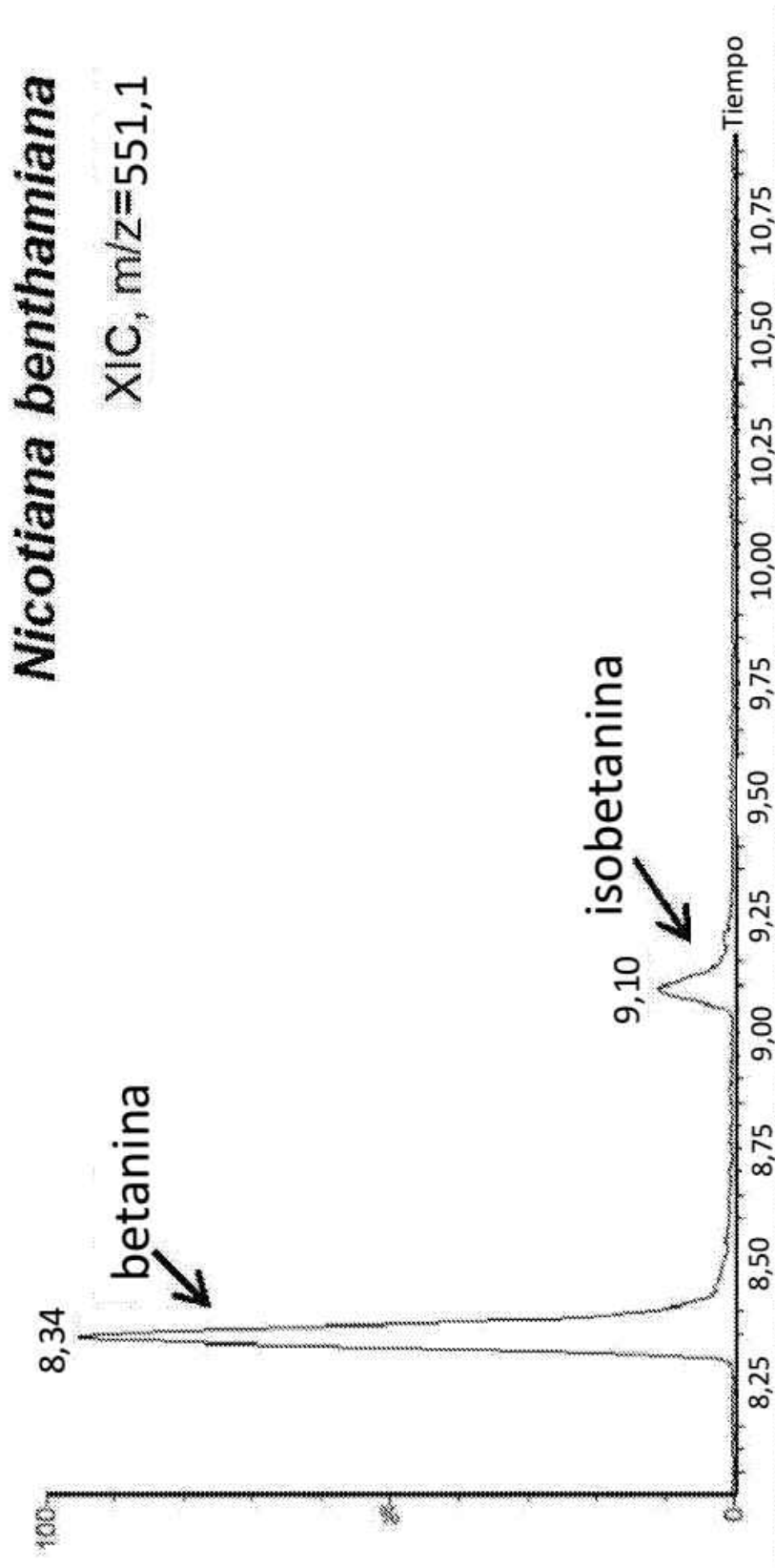


Figura 11B2

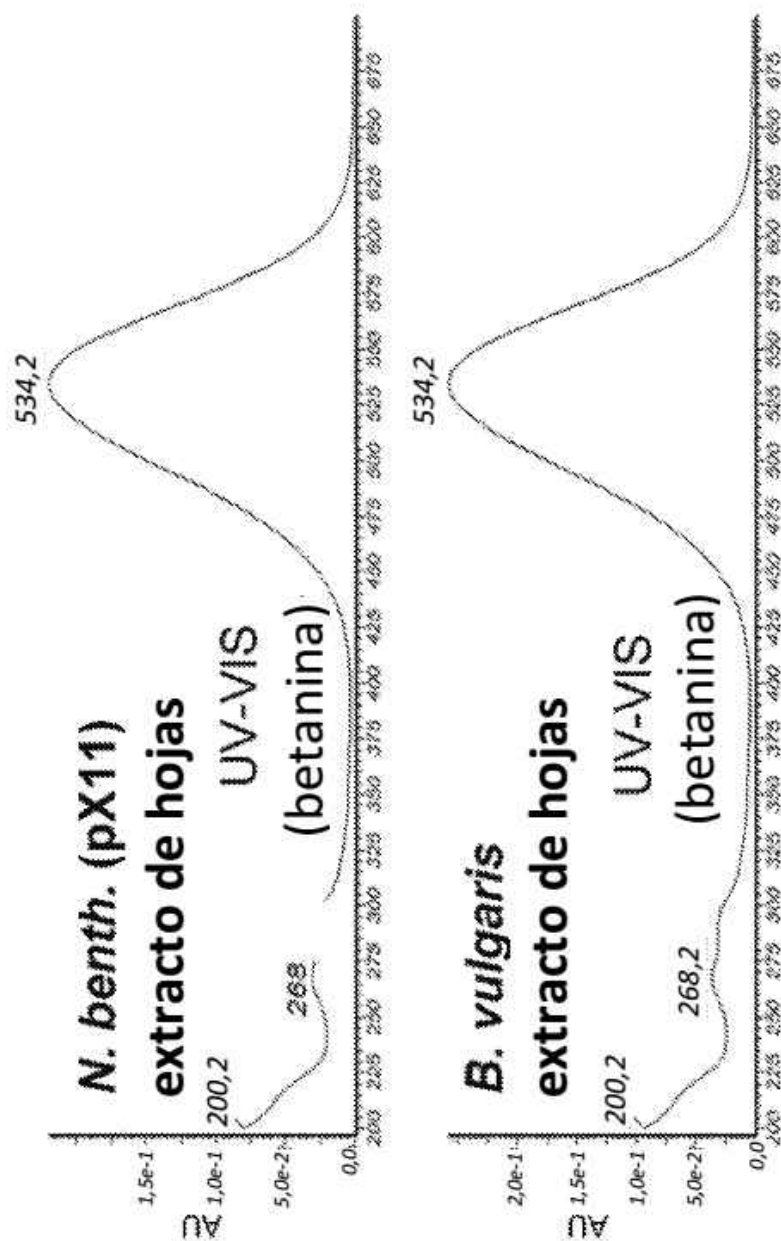


Figura 12A1

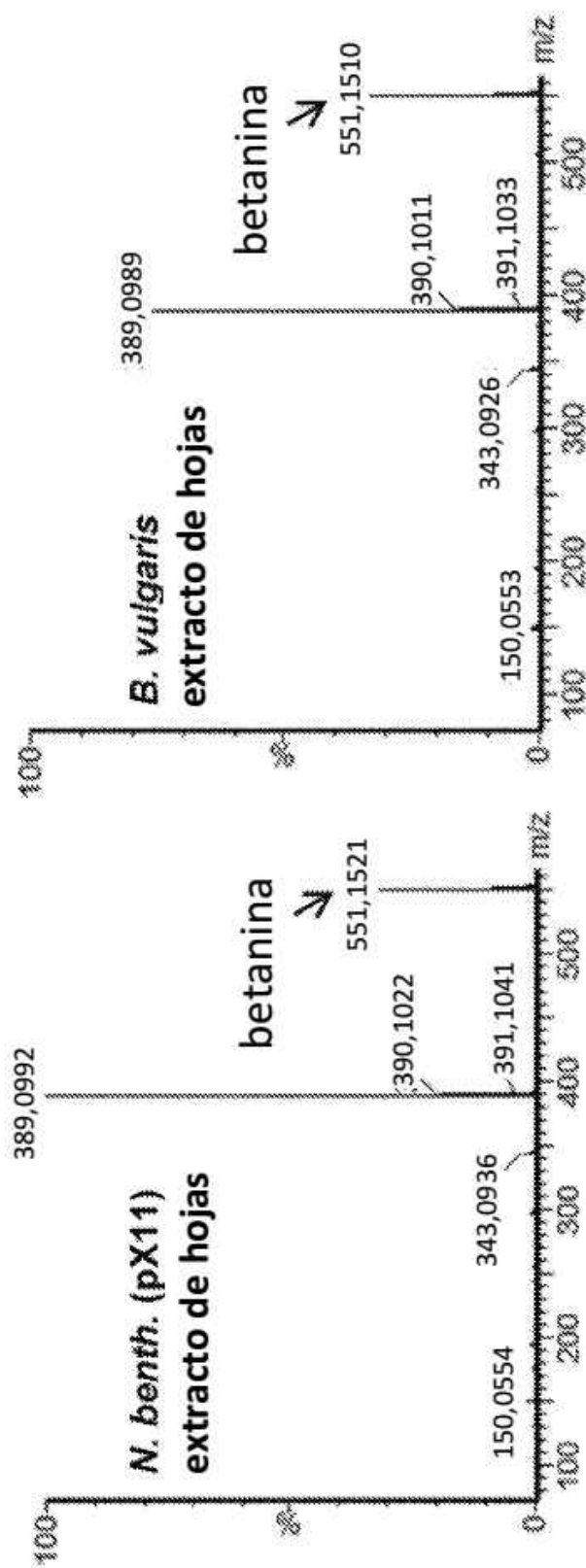


Figura 12A2

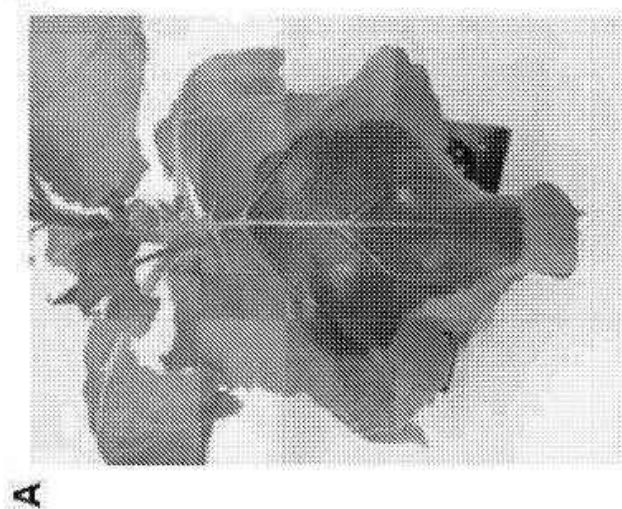


Figura 12B

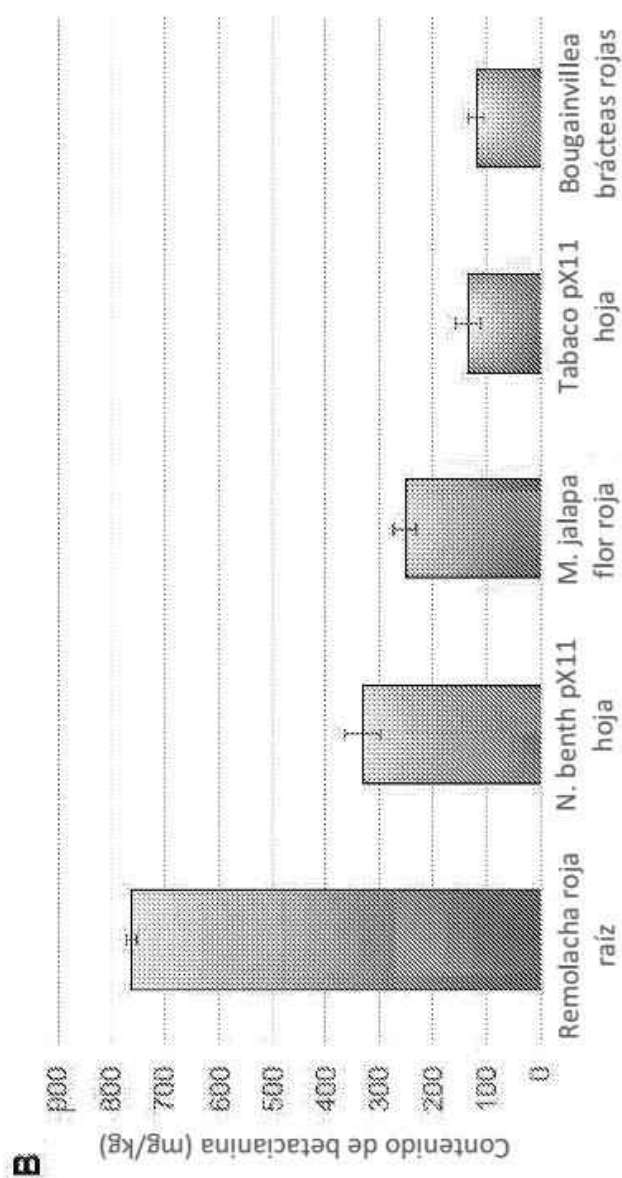


Figura 12C

Figura 13B

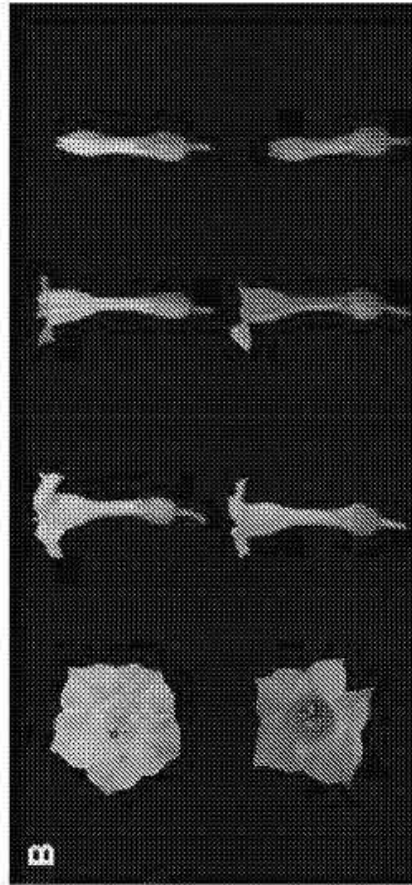


Figura 13A

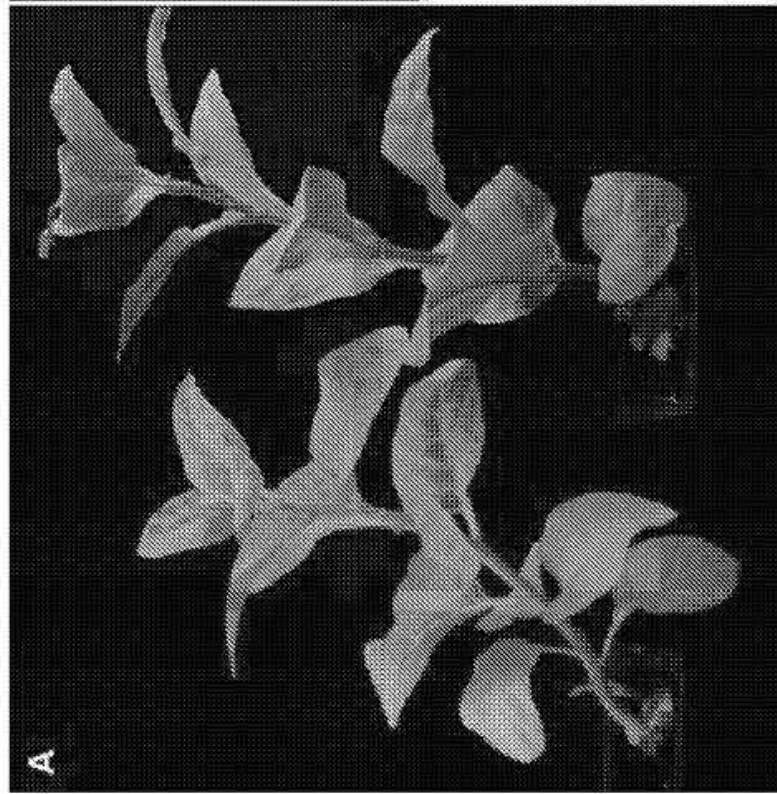


Figura 13C

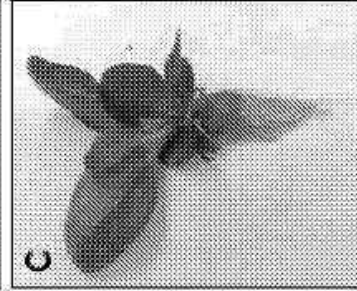


Figura 13D

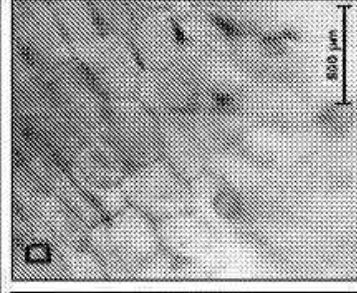
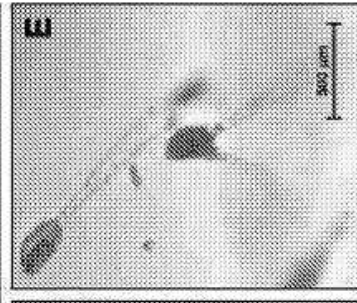


Figura 13E



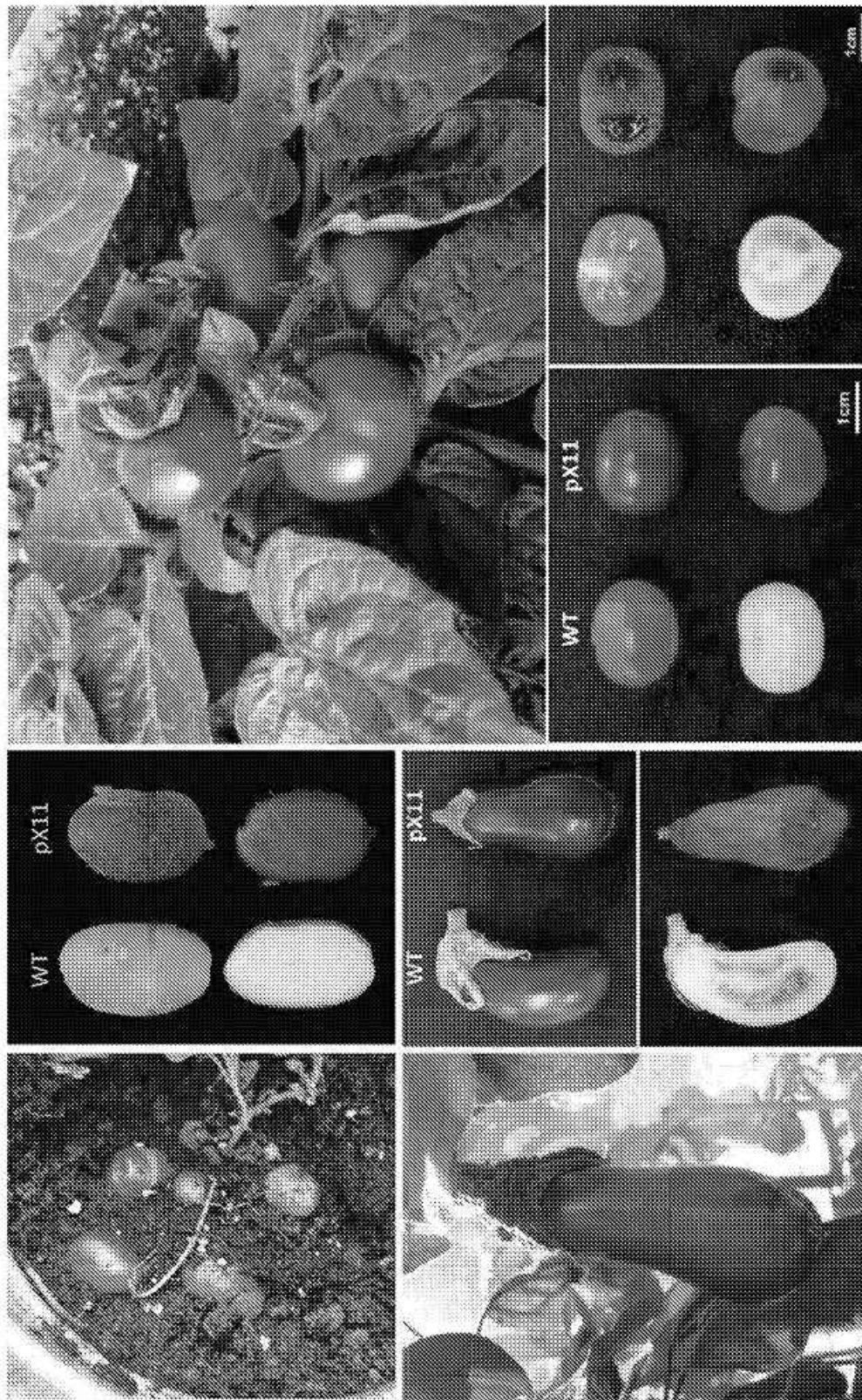


Figura 14A

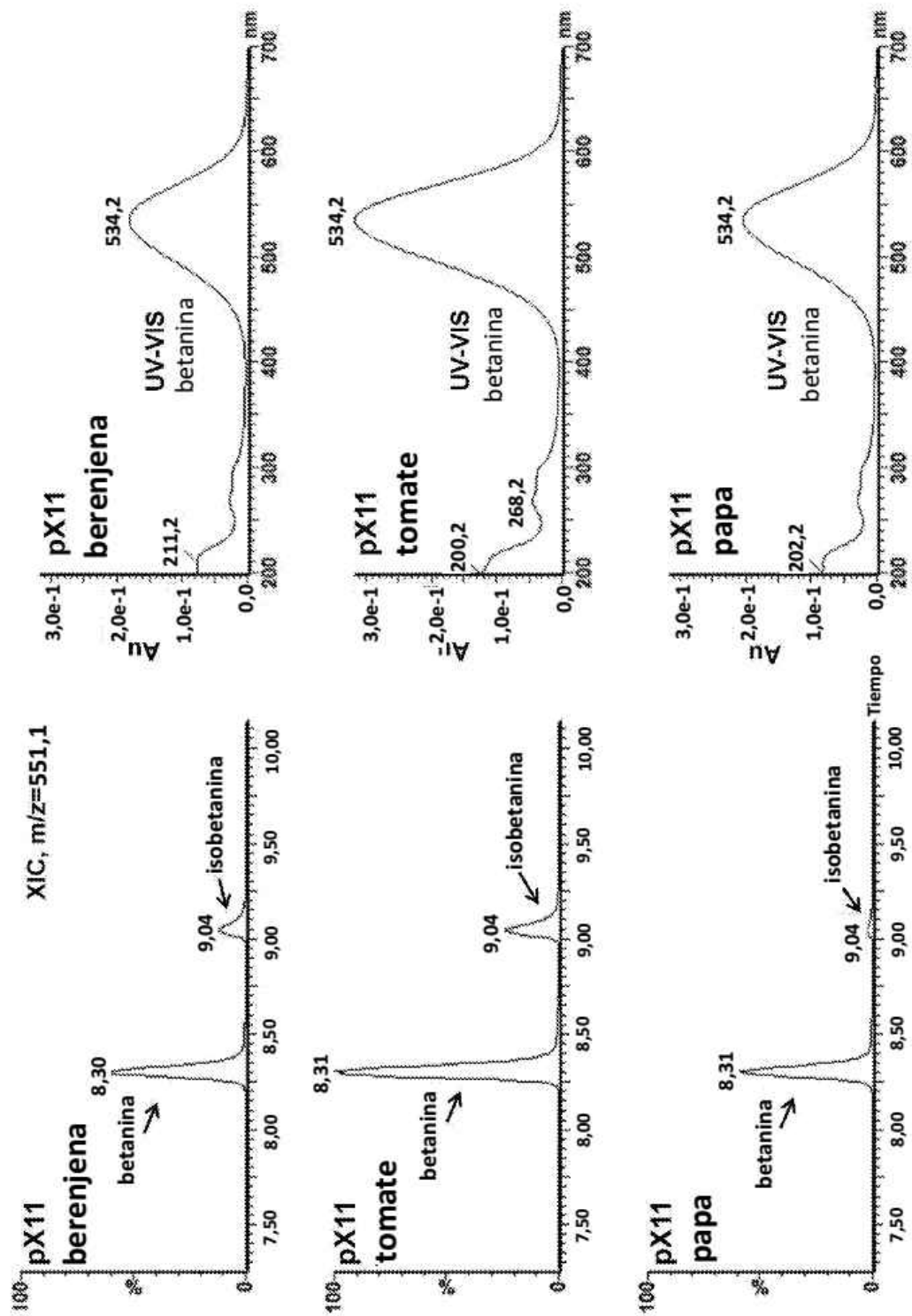


Figura 14B

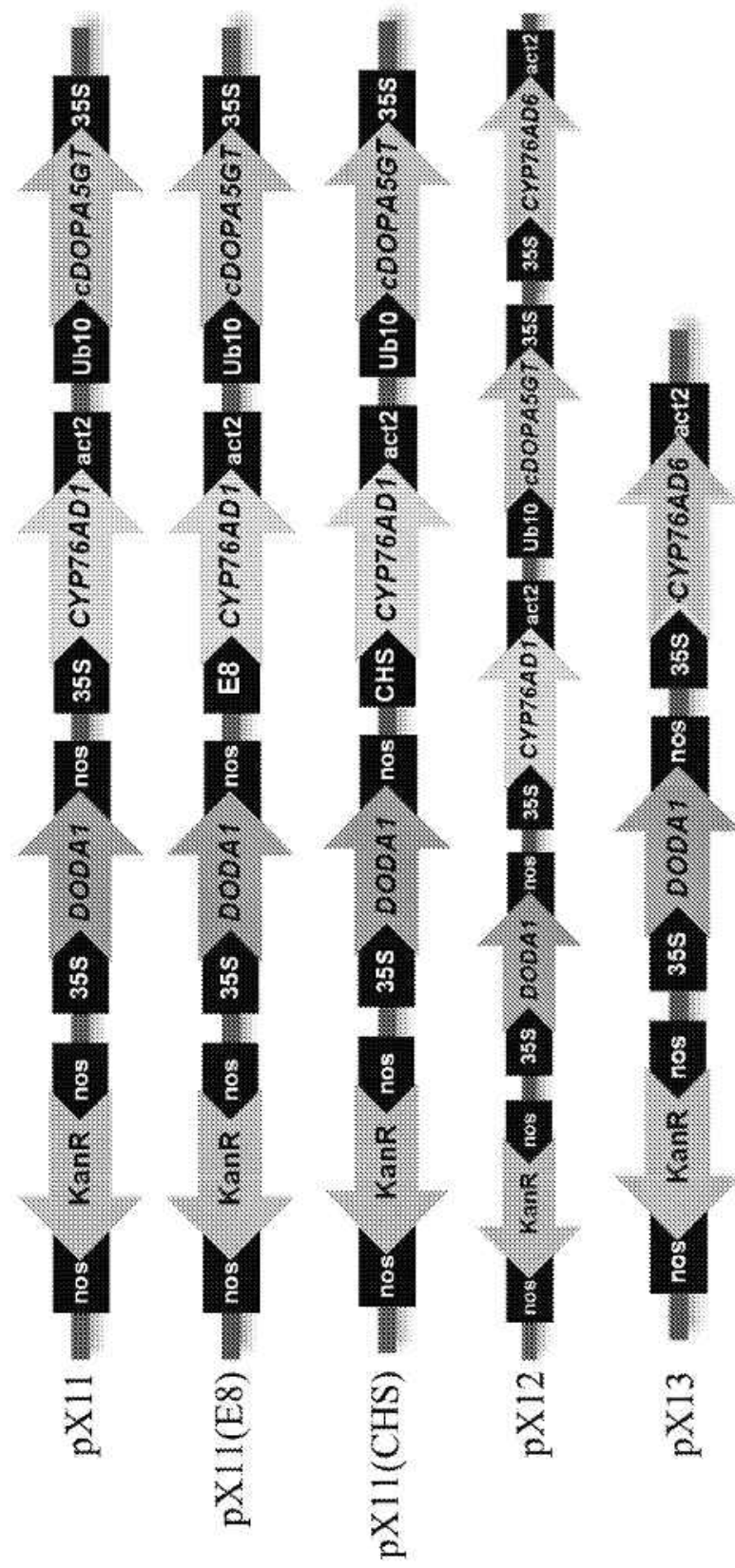


Figura 15

Figura 16A

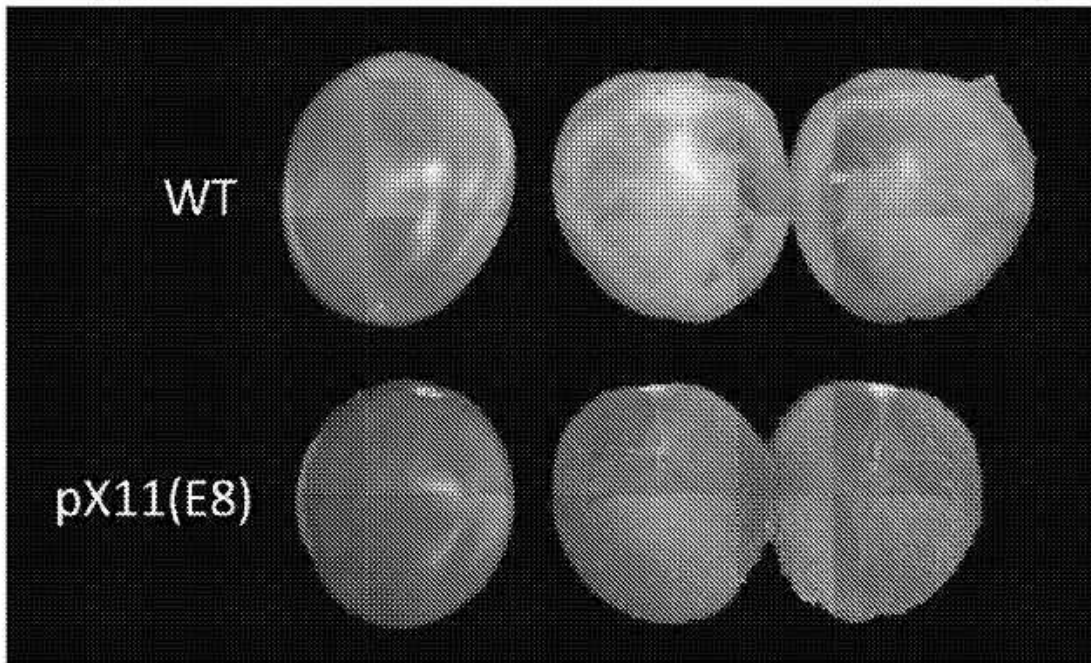
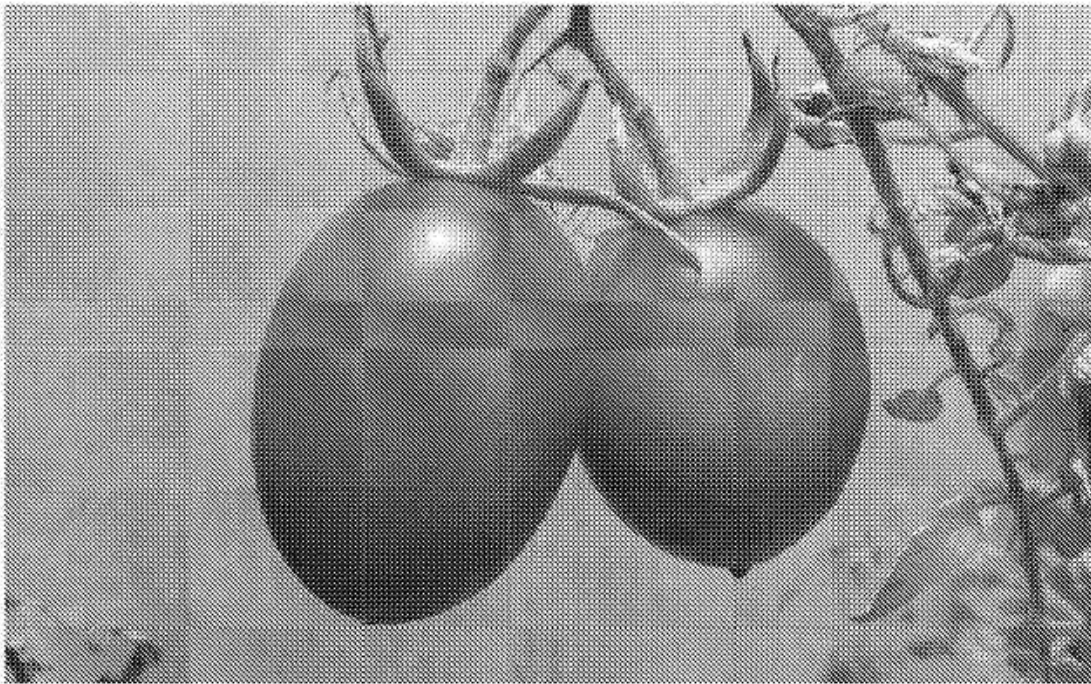


Figura 16B

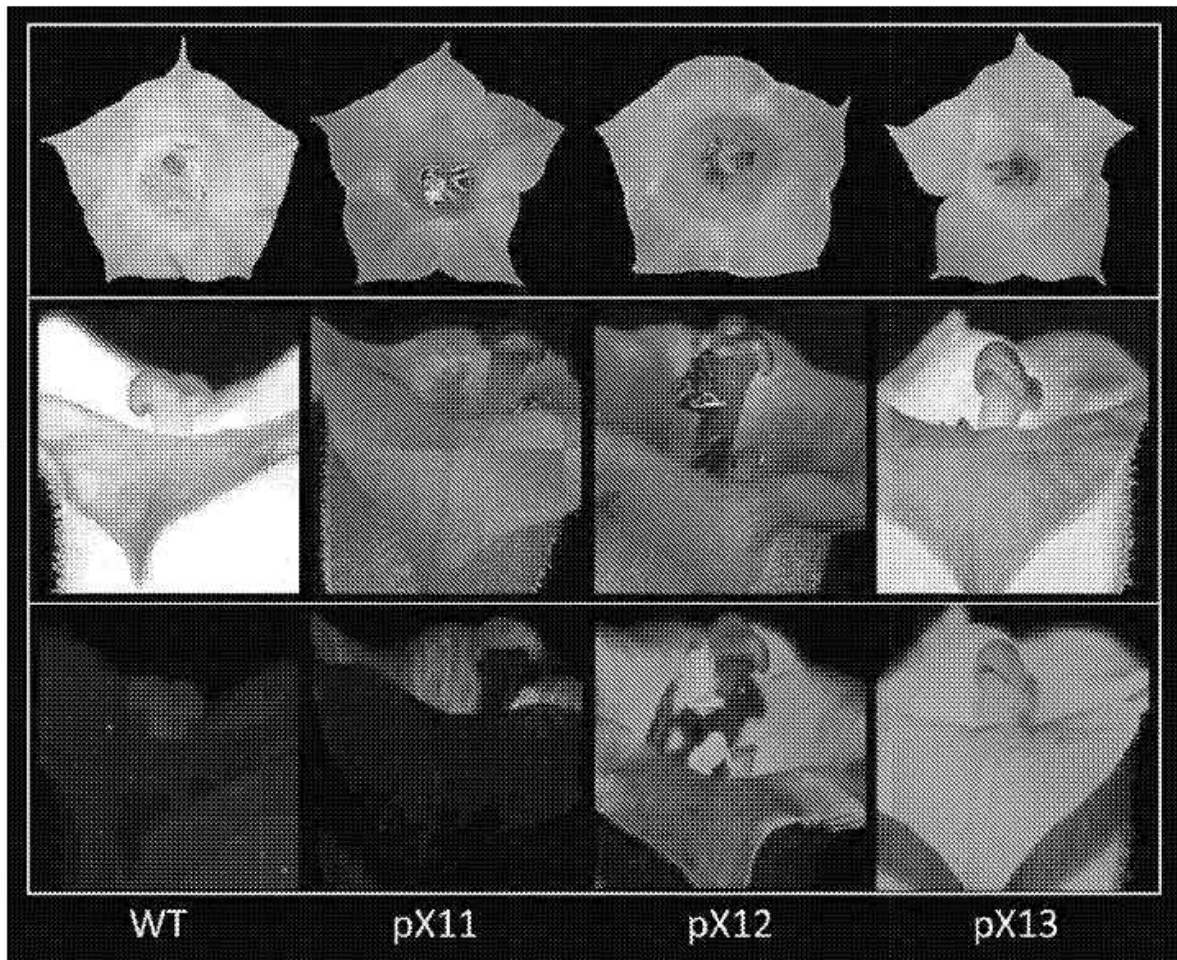


Figura 17A

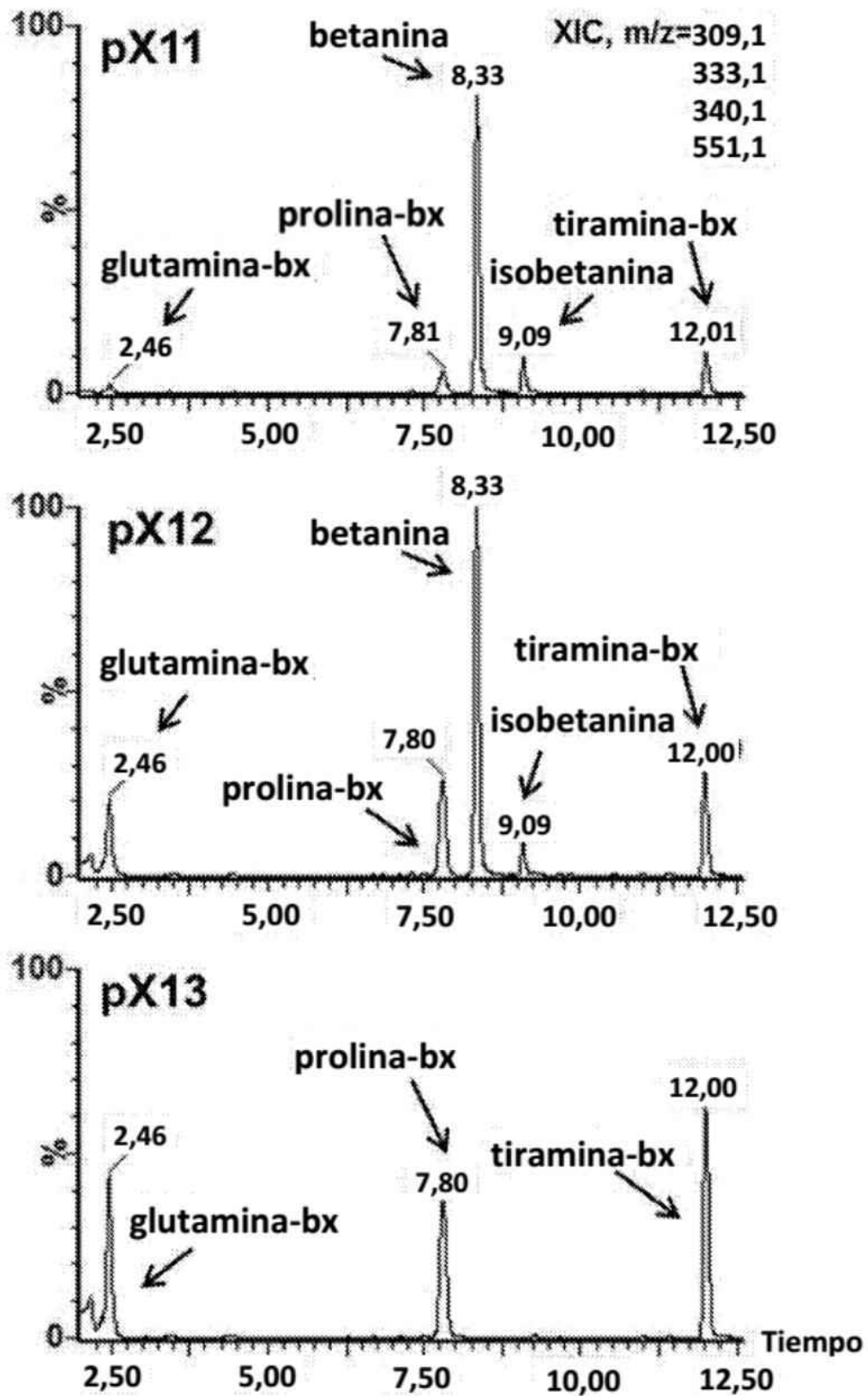


Figura 17B

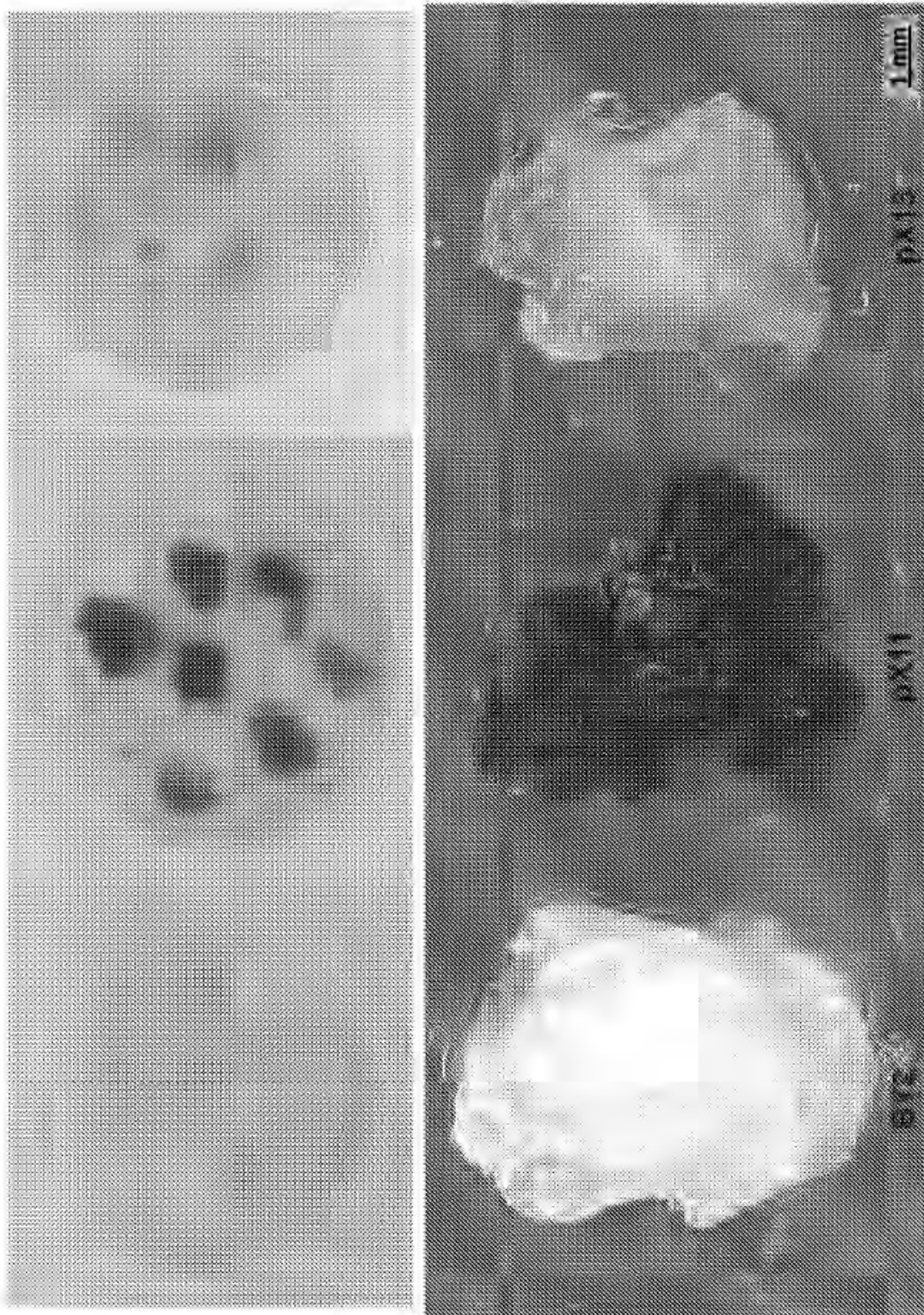


Figura 18A

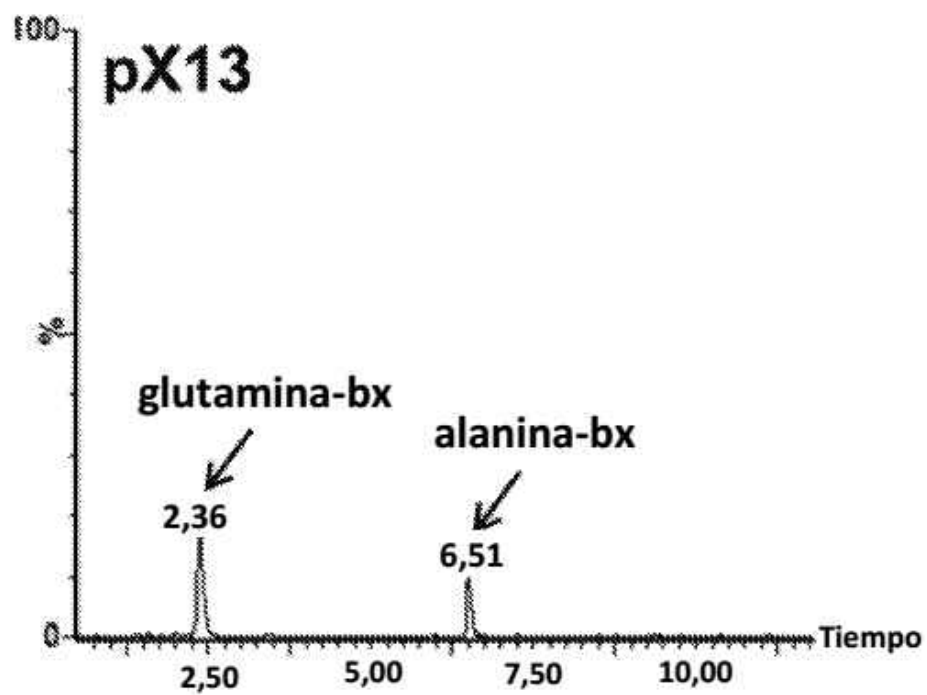
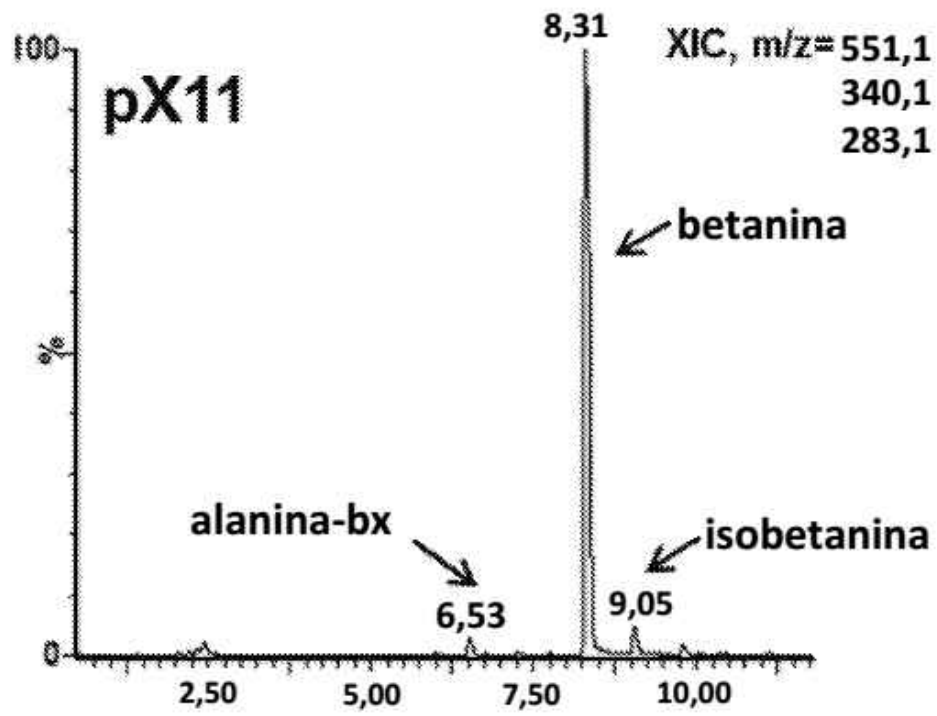


Figura 18B

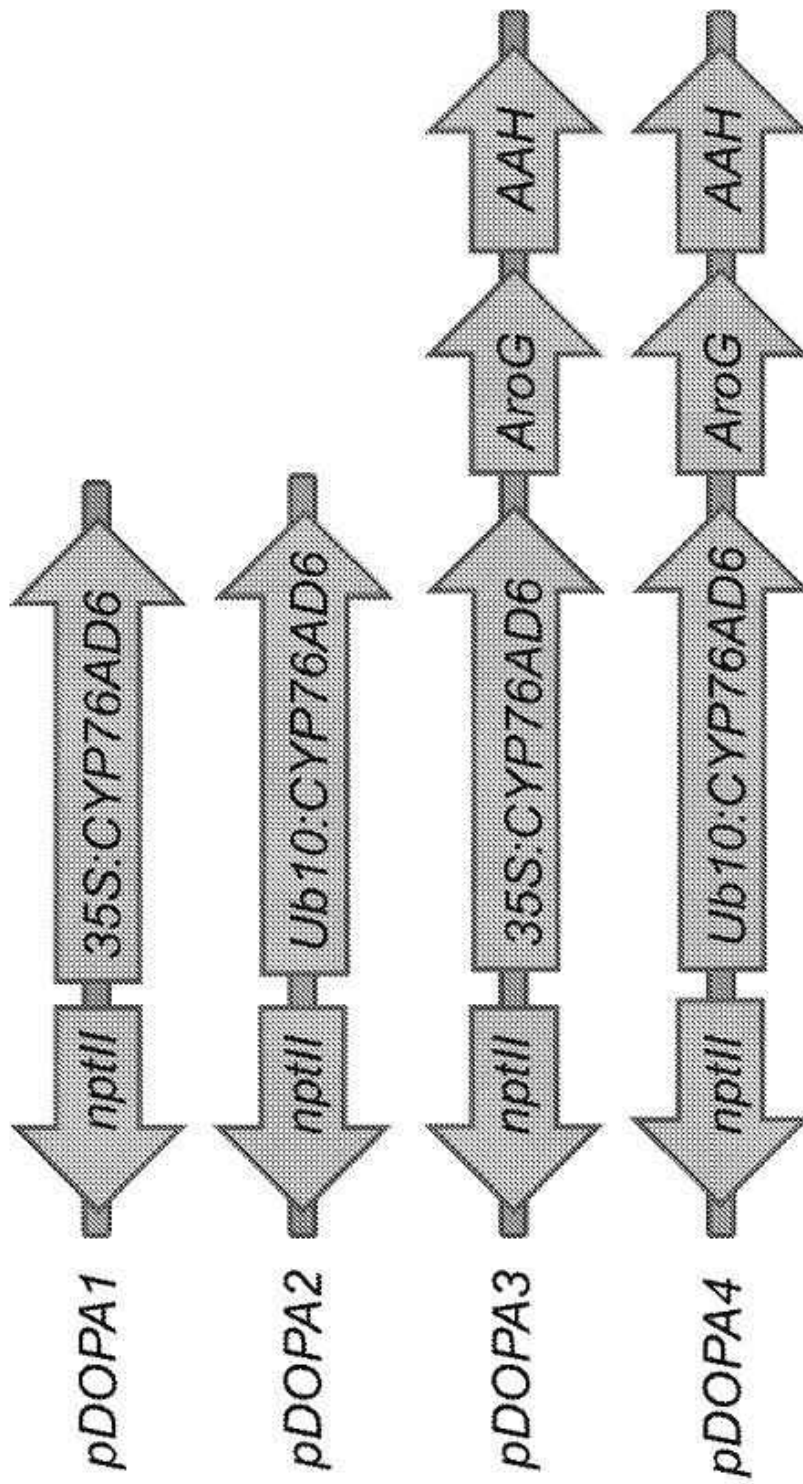


Figura 19

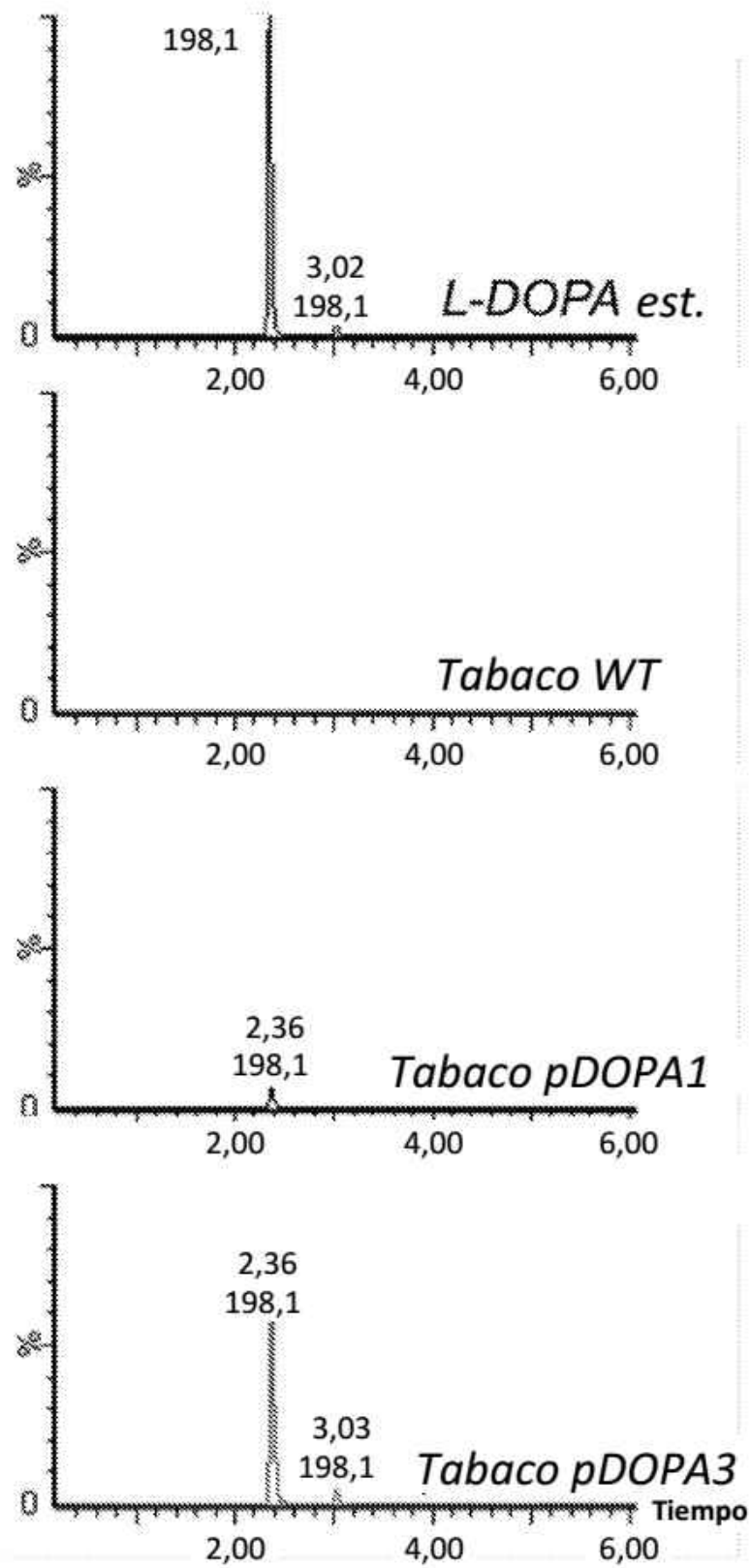


Figura 20A



Figura 20B

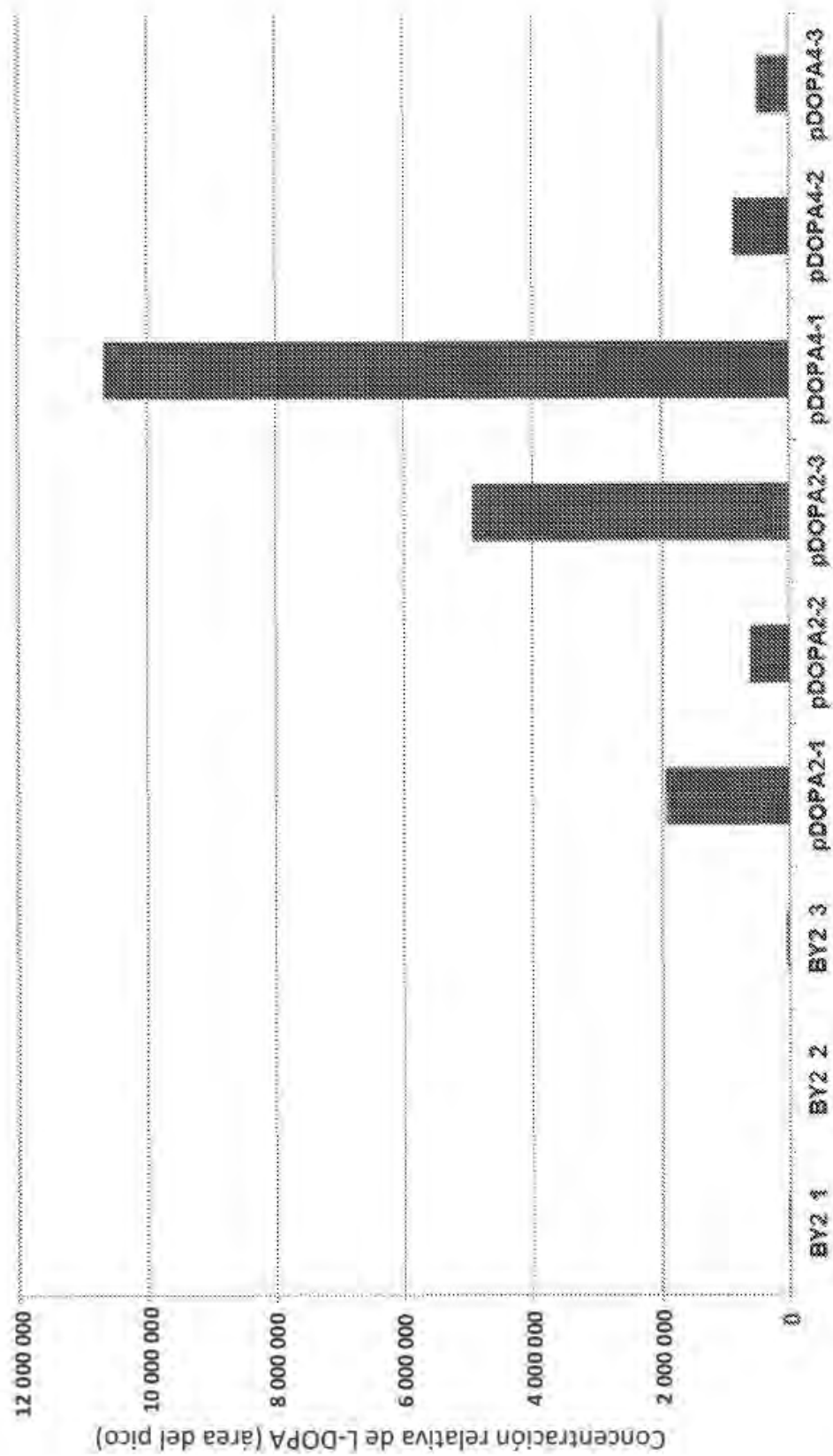


Figura 20C

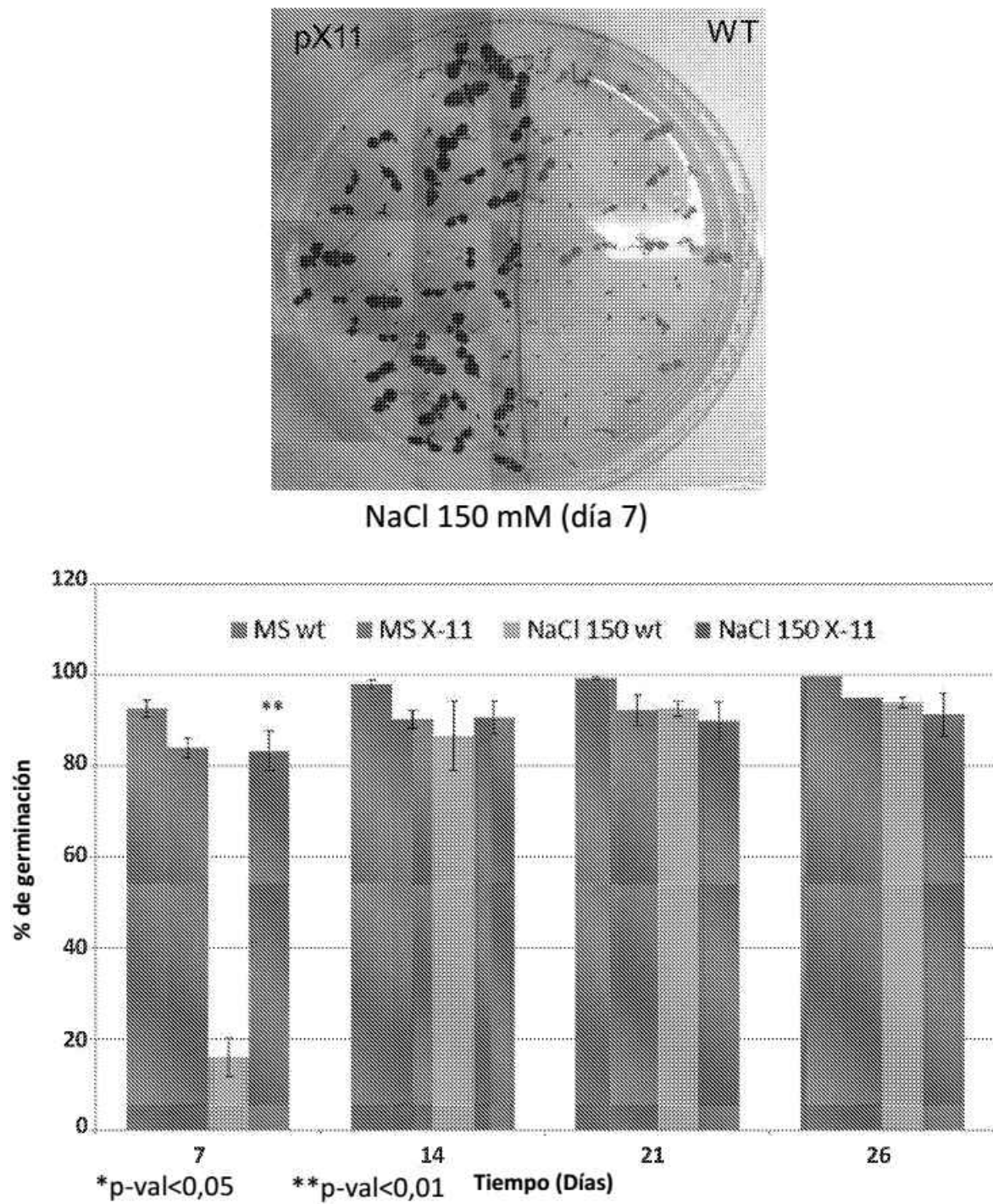
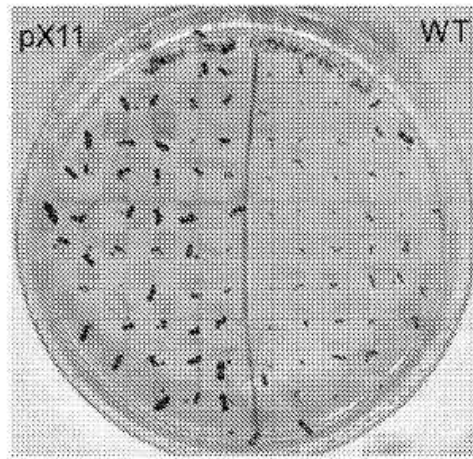


Figura 21A

B



Manitol 400 mM (día 21)

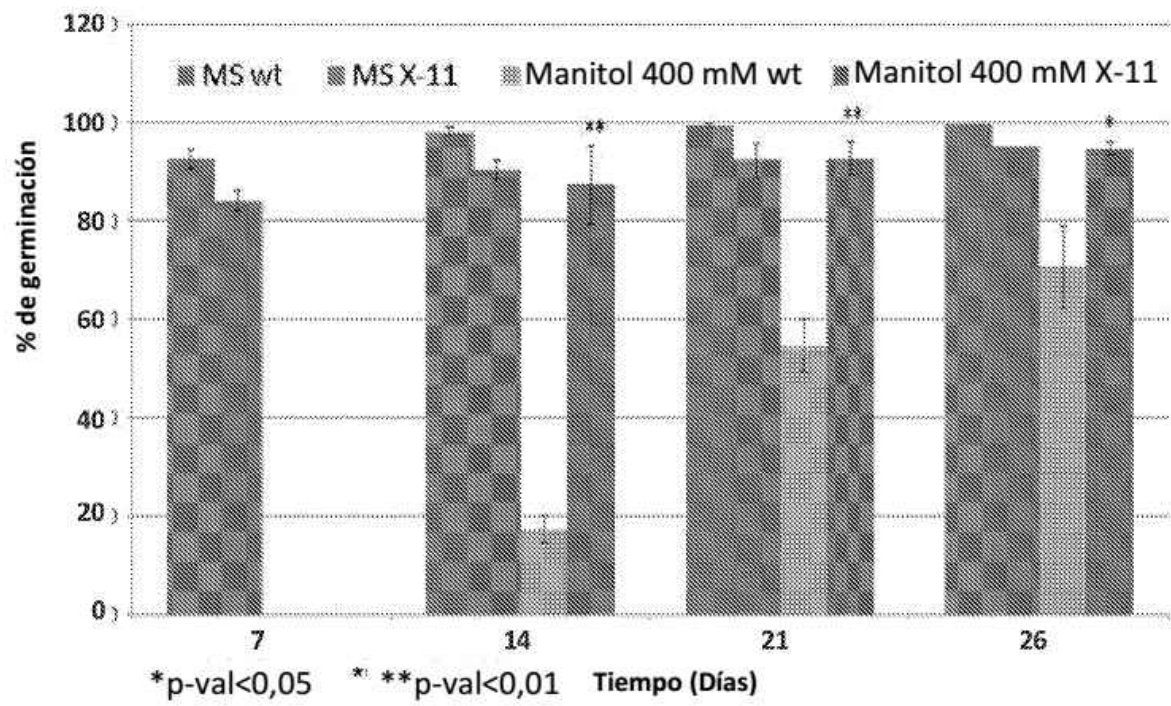


Figura 21B

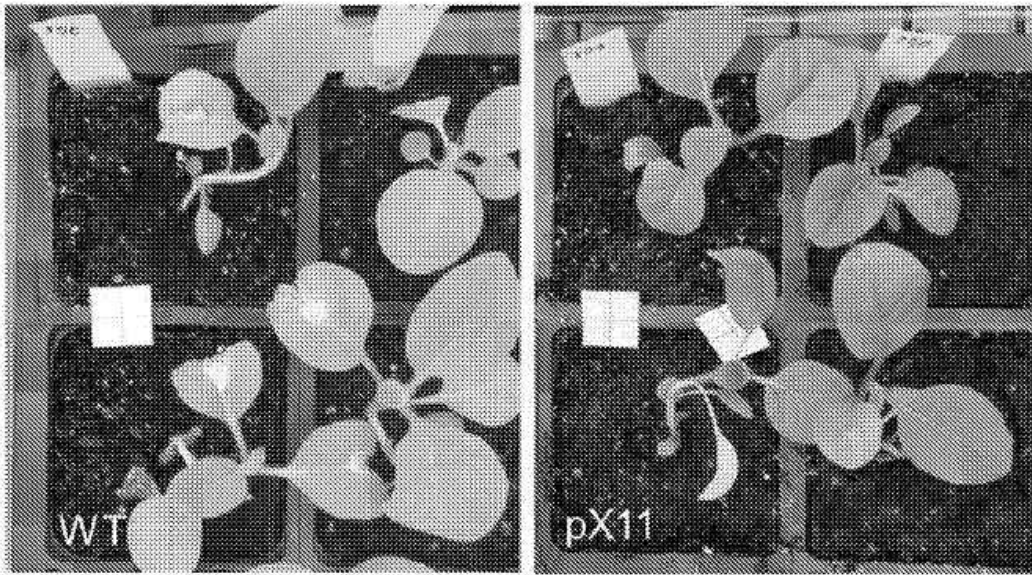


Figura 22A

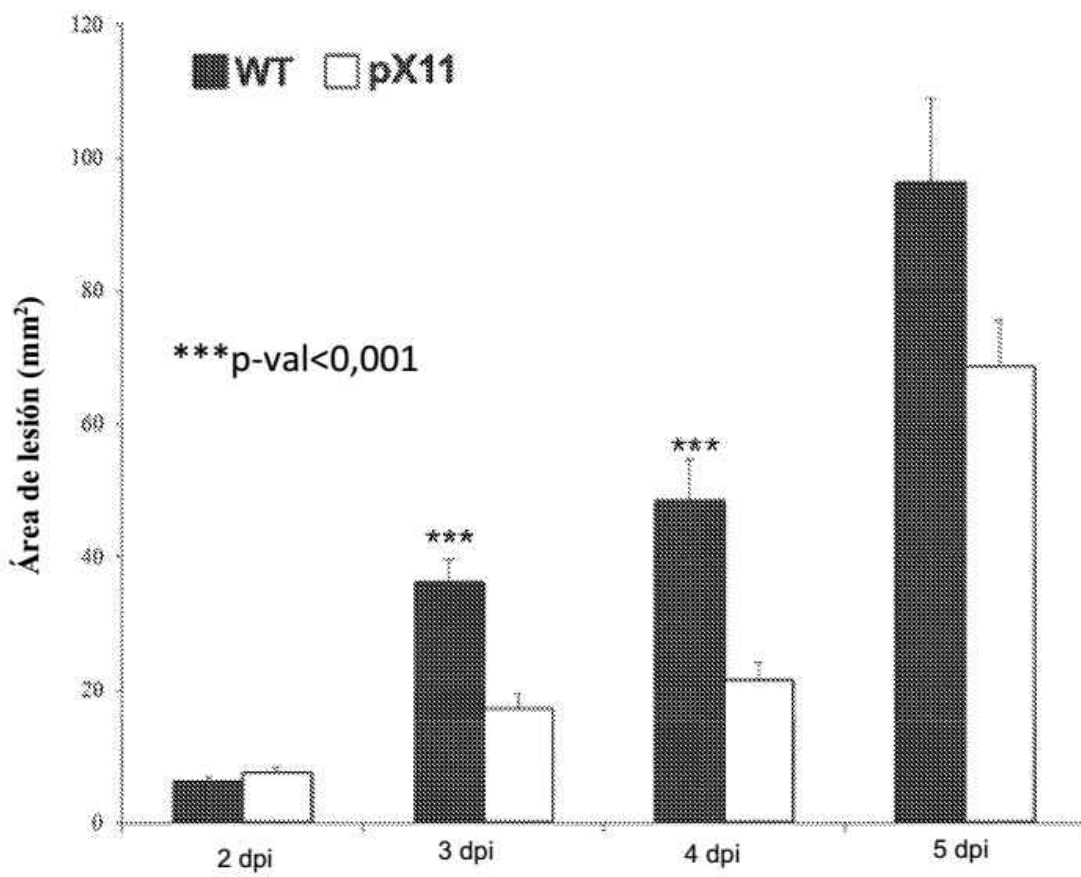


Figura 22B

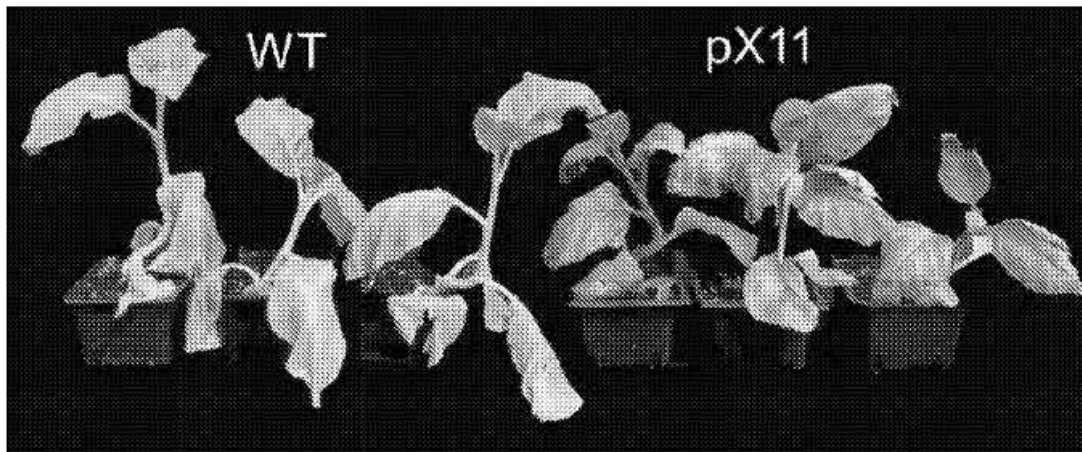


Figura 22C

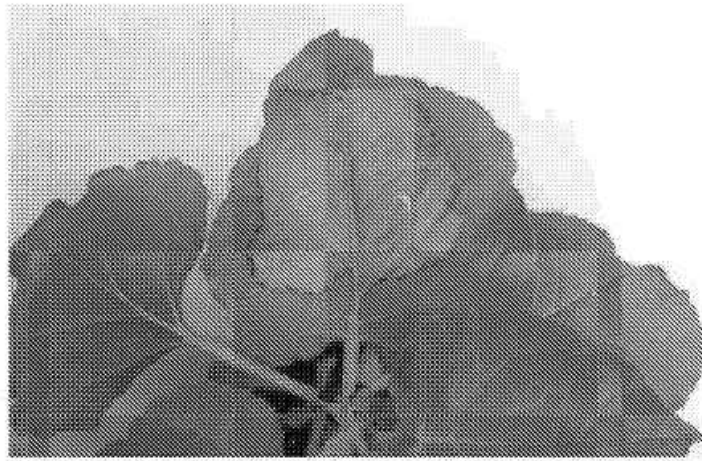


Figura 23A

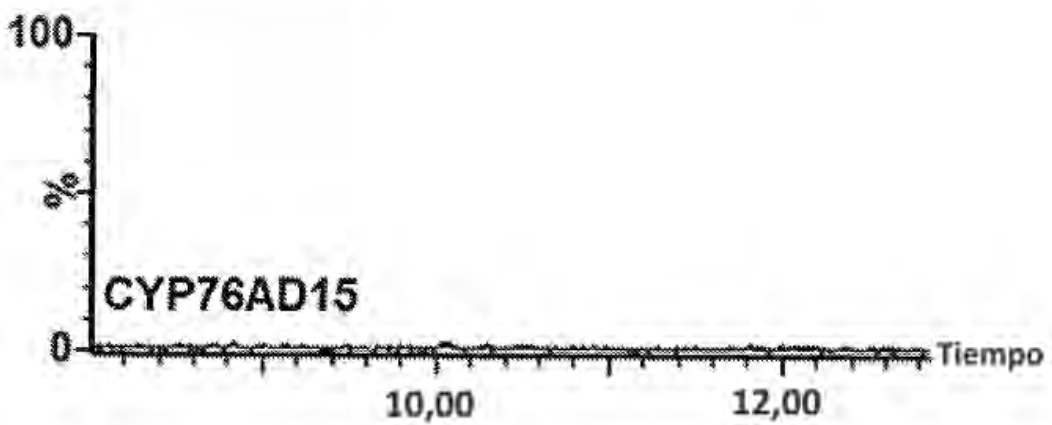
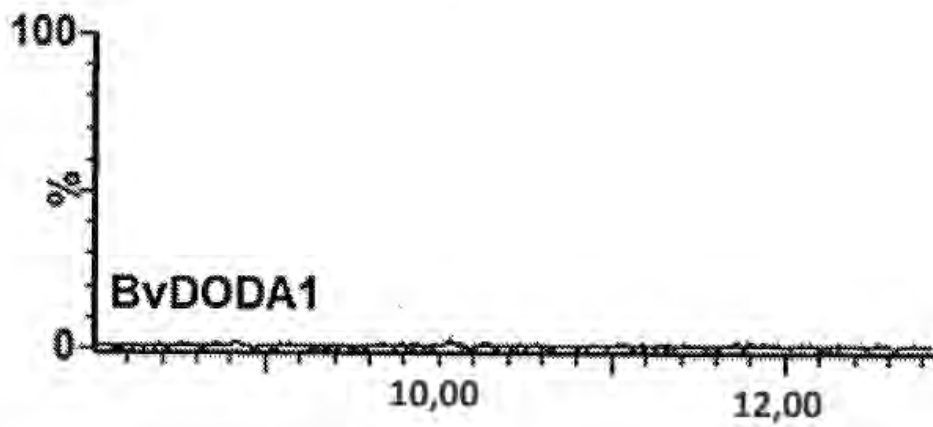
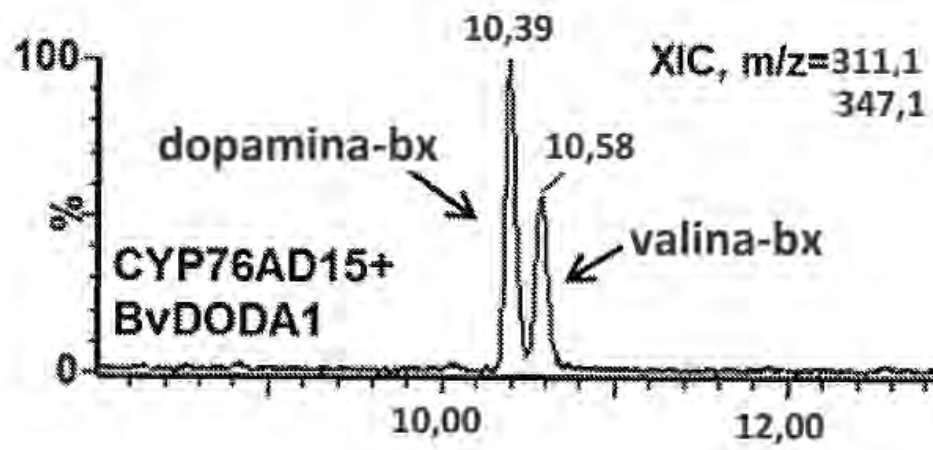


Figura 23B

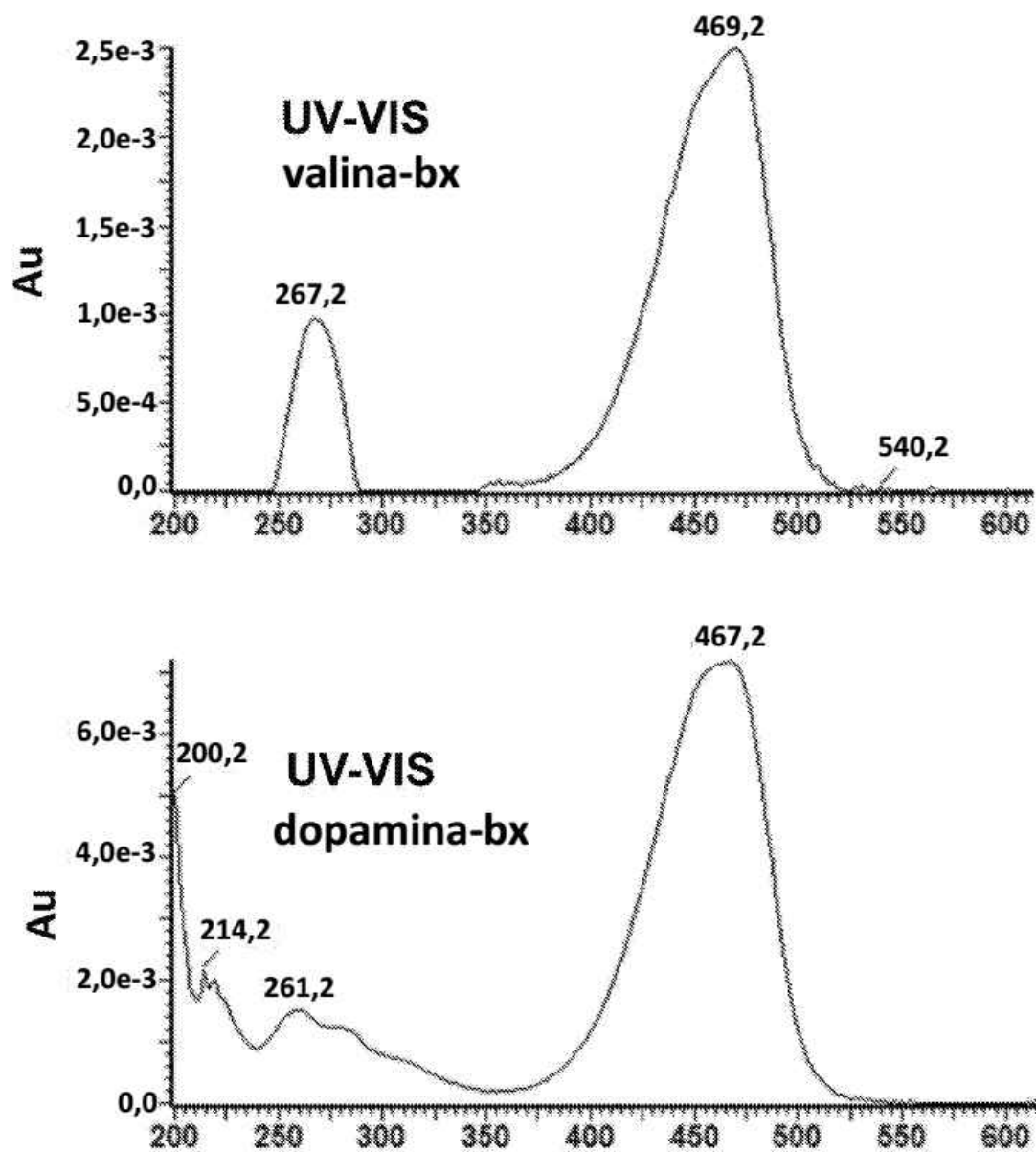


Figura 23C

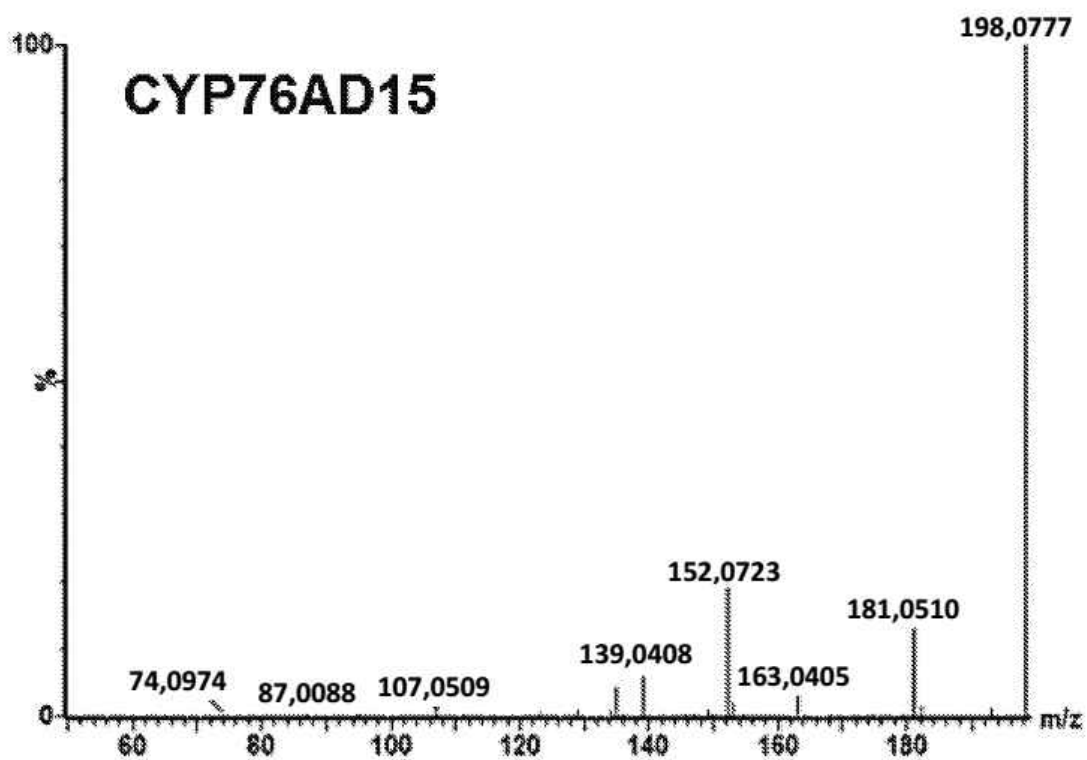


Figura 23D