

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 434**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2003 PCT/EP2003/008948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2004 WO04016793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2003 E 03773606 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 1527184**

54 Título: **Método de transformación de plastidios en Asteraceae, vector para uso en el mismo y plantas así obtenidas**

30 Prioridad:

08.08.2002 EP 02078273

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

05.12.2017

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)
BURGEMEESTER CREZEELAAN 40
2678 KX DE LIER, NL**

72 Inventor/es:

**LELIVELT, CECILIA, LUCIA, CLARA;
NUGENT, JACKIE M. y
MCCABE, MATTHEW S.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 645 434 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

Método de transformación de plastidios en Asteraceae, vector para uso en el mismo y plantas así obtenidas

Campo de la invención

La invención se refiere a un método para transformar los genomas de plastidios de lechuga.

5 Antecedentes de la invención

Los plastidios son orgánulos autorreplicantes que contienen su propio ADN en un único cromosoma circular, denominado su genoma. Los plastidios se encuentran en todas las células vegetales. Se heredan por vía materna en la mayoría de las plantas al igual que las mitocondrias en los animales y las plantas. Esto también se denomina herencia citoplásmica ya que estos orgánulos están presentes en el citosol de los óvulos.

- 10 Los plastidios vegetales (por ejemplo, cloroplastos, amiloplastos, elaioplastos, etioplastos, cromoplastos, leucoplastos y proplastidios) son los orgánulos en los que tienen lugar los principales procesos bioquímicos (es decir, la fotosíntesis). En general, las células vegetales contienen entre 100-10.000 copias del pequeño genoma circular de 120-160 kb del plastidio. Puesto que cada molécula tiene una repetición invertida, es posible teóricamente obtener células vegetales con 20.000 copias de un(os) gen(es) de interés, después de la
- 15 transformación de los plastidios.

- La transformación genética del genoma del plastidio (plastoma) tiene importantes ventajas sobre la transformación nuclear. En primer lugar, porque en la mayoría de las especies vegetales, los plastidios se heredan por vía materna, el cruzamiento exogámico de transgenes a malas hierbas u otros cultivos se minimiza. Por lo tanto, esta forma de ingeniería genética de las plantas disminuye el riesgo de diseminación del transgén en el medio ambiente a través
- 20 de la dispersión con el polen. Además, el genoma del plastidio es altamente poliploide, lo que permite la introducción de muchas copias por célula, lo que puede conducir a niveles elevados de acumulación de la(s) proteína(s) deseada(s). El hecho de que los plastidios sean capaces de formar enlaces disulfuro y plegar proteínas, hace que esta técnica en teoría esté lista para la producción de productos biofarmacéuticos en las plantas.

- El principio de la transformación de plastidios es la inserción de secuencias a través de una recombinación
- 25 homóloga. Los vectores para la transformación de plastidios utilizan dos segmentos de ADN de direccionamiento que flanquean el gen o los genes de interés. Por medio de una recombinación homóloga estos segmentos pueden insertar el gen o los genes extraños en una posición precisa, predeterminada en el genoma del plastidio. Los efectos de la posición y el silenciamiento de genes, que son los principales problemas en los experimentos de transformación nuclear, aún no han sido observados en los eventos de transformación con plastidios.

- 30 Sin embargo, una transformación con éxito de cloroplastos de plantas de cultivo se describe hasta ahora solo para cultivos de solanáceas, tales como patata, tomate, tabaco (documento US-5.451.513; Svab et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530) y *Brassicaceae*, como *Arabidopsis thaliana* (documento US-6.376.744). El documento WO 99/05265 describe la transformación de plastidios en tabaco, maíz, agrostis, papaya y aguacate. El documento WO 01/81605 describe un método de transformación de plastidios de tabaco. O'Neill et al. (The Plant
- 35 Journal (1993); vol. 3; nº 5; páginas 729-738) describen la transformación de cloroplastos de tabaco. No es obvio que las técnicas utilizadas para estas especies se puedan utilizar fácilmente en otras especies, tales como las *Asteraceae*, en particular la lechuga.

- Por tanto, el objeto de la invención es proporcionar un método de transformación de plastidios alternativo que sea útil en particular para transformar especies vegetales *Asteraceae*, tales como la lechuga (*Lactuca sativa*). La lechuga
- 40 es un cultivo agronómico importante y por lo tanto es altamente deseable un método de transformación útil.

Compendio

La invención proporciona de este modo un método para la transformación de los genomas de plastidios de lechuga, que comprende las etapas de:

- 45 a) transformar protoplastos de lechuga con un vector de transformación que es portador de una secuencia de ADN de interés por medio de una transformación mediante polietilenglicol;
- b) colocar los protoplastos tratados de este modo durante un período de tiempo, en contacto con un medio de cultivo sin agente de selección;
- c) posteriormente añadir un agente de selección al medio de cultivo;
- 50 d) renovar el medio de cultivo que comprende un agente de selección mediante la adición de medio de nuevo aporte con agente de selección o cambiar el medio de selección por un medio con un agente selectivo;
- e) crecimiento de los protoplastos que comprenden plastidios que han adquirido el ADN de interés en transformantes.

El vector de transformación puede comprender:

- un casete de expresión que comprende opcionalmente un promotor activo en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar, un sitio de inserción de ADN para recibir el ADN transformante de interés, opcionalmente uno o varios marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células que tienen plastidios que se han transformado con el casete de expresión y, opcionalmente, una secuencia de ADN que codifica una región de terminación de la transcripción, activa en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar,

- opcionalmente un conjunto de segmentos de ADN de direccionamiento situados a ambos lados del casete de expresión que permiten una recombinación homóloga doble del casete de expresión con el genoma del plastidio de interés, y

- una secuencia de ADN de interés insertada en el sitio de inserción del casete de expresión.

Preferiblemente, el vector comprende un promotor, un conjunto de segmentos de direccionamiento y uno o varios marcadores de selección. Sin embargo, estos elementos también se pueden proporcionar de otra manera. Por ejemplo, el ADN de interés se puede insertar en una posición de este tipo en el plastoma que puede utilizar un promotor que ya esté presente, tal como en un operón. Si no están presentes los segmentos de direccionamiento, el ADN de interés se puede integrar en una posición aleatoria. El ADN de interés se integra preferiblemente en el genoma del plastidio, pero también puede existir fuera del plastoma.

El ADN de interés puede estar integrado de forma estable o se puede expresar de forma transitoria.

Es sorprendente que cuando se utiliza el método de la invención no se encuentran escapes en la transformación de plastidios de lechuga. Los resultados de las transformaciones de plastidios, hasta ahora, mencionan la aparición de escapes (debido a mutantes nucleares o espontáneos; Kofer et al. (1998) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 303-309).

Se ha encontrado sorprendentemente que no iniciar inmediatamente el proceso de selección sino mantener el material vegetal tratado en o sobre un medio de cultivo durante unos pocos días, mejora mucho la eficacia de una transformación. Además, el procedimiento de selección no se debe iniciar demasiado tarde en el proceso de cultivo. Preferiblemente, la selección se inicia después de un máximo de 2-5 días. El momento de iniciar el proceso de selección depende del método de transformación. Otro aspecto importante de la invención es mantener las células transformadas en estrecho contacto con el agente selectivo durante un período de tiempo, preferiblemente hasta la regeneración. Además, se prefiere mantener la concentración del agente selectivo a un nivel eficaz, tal como 500 mg/l de diclorhidrato de espectinomicina. Esto se logra preferiblemente mediante el uso de un medio líquido que contiene el agente selectivo.

Detallado

La invención proporciona un método para una transformación eficaz y estable de plastidios de una planta de lechuga.

El vector que se utiliza en el método de la invención tiene una estructura principal de vector y, además, una estructura artificial de ADN que comprende opcionalmente uno o varios conjuntos de segmentos de ADN de direccionamiento que son homólogos a una secuencia en el genoma del plastidio, opcionalmente una secuencia de promotor, opcionalmente una secuencia de ADN que codifica el gen transformante introducido en un sitio de inserción, opcionalmente una secuencia terminadora y, opcionalmente, al menos una secuencia de ADN que codifica un marcador seleccionable.

Preferiblemente, el vector comprende los segmentos de ADN de direccionamiento, la secuencia de ADN que codifica el gen transformante, un promotor y un marcador seleccionable.

El promotor es cualquier promotor que esté activo en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar y para la lechuga, por ejemplo, se selecciona a partir del grupo (lechuga u otras especies vegetales) de promotor de operón de ARN ribosómico específico de cloroplastos, *rrn* (ARNr 16S), *psbA*, *rbcL*, *trnV* o *rps16*. Sin embargo, también se pueden utilizar regiones adicionales de promotores, para mejorar la transcripción, la traducción o ambos procesos, para obtener una expresión del marcador seleccionable y del gen de interés en los plastidios de lechuga. También se pueden utilizar promotores bacterianos para expresar genes en los plastidios.

El terminador es cualquier terminador que esté activo en la especie vegetal que se va a transformar y para la lechuga, por ejemplo, se selecciona a partir del grupo que consiste en la secuencia de terminación *psbA*, *rrn*, *rbcL*, *trnV* o *rps16*. Estos y otros terminadores pueden ser específicos para la lechuga u otras especies vegetales. Una secuencia de terminador no tiene que estar siempre presente en estructuras artificiales bicistrónicas, teniendo dos marcos de lectura abiertos detrás de un promotor. Secuencias adicionales de UTR (región no traducida), fusionadas a las secuencias que codifican el o los genes deseados, se pueden utilizar como líder y/o tráiler, para minimizar una recombinación no deseada.

El marcador de selección se selecciona, por ejemplo, a partir del grupo que consiste en espectinomicina,

estreptomycin, kanamicina, higromicina y cloranfenicol, o de herbicidas vegetales como glifosato o bialafos. Entre estos marcadores se prefiere el gen *aadA* porque es un marcador no letal.

Alternativamente, se puede utilizar un marcador visual, tal como *gfp* (proteína de fluorescencia verde). En ese caso, el agente selectivo no es un compuesto o una composición, sino los medios que se utilizan para visualizar el marcador visual, tal como la fuente luminosa azul que conduce a la fluorescencia de la *gfp*.

Quando solo se utilizan estos tipos de marcadores visuales para la selección de los transformantes, las etapas d) y e) del método se pueden realizar sin un agente selectivo. La selección se realiza entonces visualmente mediante la iluminación de los transformantes putativos con una fuente luminosa apropiada y seleccionando los transformantes que muestran fluorescencia.

Los segmentos de ADN que permiten una recombinación homóloga doble del ADN de interés con el genoma del plastidio de interés tienen una secuencia de ADN que es homóloga a una parte del genoma del plastidio. Los segmentos se seleccionan de tal manera que la integración del gen transformante tiene lugar en una posición deseada en el genoma. Para la lechuga, por ejemplo, el conjunto de segmentos de ADN se selecciona a partir de la región *trnI(oriA)/trnA* y la región 16S/*trnV/ORF70B* del genoma de cloroplasto de la lechuga.

Preferiblemente, el conjunto de segmentos de ADN se selecciona a partir de LCV1 A-B y LCV1 C-D, y LCV2 A-B y LCV2 C-D como se describe en los Ejemplos. La ventaja de estos segmentos es que se encontró que eran particularmente útiles para la lechuga.

El método descrito se puede utilizar para la preparación de plantas que pueden expresar cualquier gen de interés. La tecnología de la invención se puede utilizar para la transformación de plastidios de cualquier planta, pero en particular para plantas de la familia *Asteraceae*, más en particular, para la lechuga. La invención se puede emplear por tanto para la producción de polipéptidos que se pueden aislar a partir de la planta o de polipéptidos que son útiles para la propia planta. Un ejemplo de producción de productos que se pueden aislar a partir de la planta se encuentra, por ejemplo, en el campo de los productos biofarmacéuticos, es decir, productos farmacéuticos producidos en organismos vivos, tales como plantas. La producción en plantas tiene un alto potencial, ya que puede dar lugar a menores costes de producción en comparación con la producción en animales o en microorganismos utilizando biorreactores.

Un nuevo campo prometedor en el que se puede utilizar esta invención es la producción de vacunas comestibles, pero se pueden prever otros productos farmacéuticos, ya sean terapéuticos o profilácticos, así como (poli)péptidos que se pueden emplear en otros campos.

Además de usar la planta como una fábrica para la producción de péptidos o polipéptidos, el producto expresado también puede tener una importancia agronómica. Ejemplos de ello son la resistencia a herbicidas, la resistencia a insectos, la resistencia a hongos, la resistencia bacteriana, la tolerancia al estrés, por ejemplo, frente al frío, una cantidad elevada de sales o minerales, el rendimiento, la acumulación de almidón, la acumulación de ácidos grasos, la fotosíntesis.

De acuerdo con la invención, el tratamiento de transformación es una transformación mediante polietilenglicol. La transformación mediante polietilenglicol es muy ventajosa ya que se puede transformar simultáneamente un número elevado de células y puede tener lugar una selección eficaz de los plastidios transformados dentro de las células.

El período de tiempo durante el cual se coloca el material vegetal tratado en contacto con un medio de cultivo sin un agente de selección, depende del tratamiento de transformación. Para la transformación mediante polietilenglicol, el período de tiempo es de 1 a 14 días, preferiblemente de 3 a 7 días, más preferiblemente de aproximadamente 6 días. Sin agente de selección se entiende que significa sin una cantidad eficaz del agente de selección. Durante este período puede estar presente una cantidad baja, es decir, ineficaz de agente selectivo.

Se ha encontrado que la etapa de colocar el material vegetal tratado en contacto con un medio de cultivo sin agente de selección es importante para la eficacia de la transformación. Además para la transformación de cloroplastos se prefiere mantener el material vegetal tratado en la oscuridad durante esa etapa. De esta manera no se producen cloroplastos nuevos y, por lo tanto, no se producen cloroplastos transformados lo que conduce a una mayor eficacia.

El material vegetal tratado se mantiene preferiblemente en contacto con un medio de cultivo con el agente de selección hasta la regeneración de la planta o parte de planta a partir del material transformado.

El método es adecuado para materiales vegetales tales como protoplastos.

Se ha encontrado sorprendentemente que la eficacia de la transformación se puede aumentar cuando el medio de cultivo que comprende el agente de selección es un medio líquido. De esta manera, las células que se van a transformar están en estrecho contacto con el agente selectivo. Además se ha encontrado sorprendentemente que no se detectaron escapes en los experimentos de transformación.

Quando el medio de cultivo se renueva después del procedimiento de selección, esto puede significar que se añade

medio de nuevo aporte con el agente selectivo (es decir, de manera que el medio de selección no está diluido) o que el medio de selección se cambia por medio con agente selectivo.

La memoria descriptiva describe además un vector de expresión para la transformación de genomas de plastidios de especies vegetales, en particular especies de plantas *Asteraceae*, cuyo vector comprende:

- 5 - un casete de expresión que comprende opcionalmente un promotor activo en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar, un sitio de inserción de ADN para recibir el ADN transformante de interés, opcionalmente uno o varios marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células que tienen plastidios que se transforman con el casete de expresión y, opcionalmente, una secuencia de ADN que codifica una región de terminación de la transcripción activa en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar,
- 10 - opcionalmente un conjunto de segmentos de ADN de direccionamiento situados a ambos lados del casete de expresión que permiten una recombinación homóloga doble del casete de expresión con el genoma del plastidio de interés, y
- opcionalmente una secuencia de ADN de interés insertada en el sitio de inserción del casete de expresión.
- 15 Preferentemente, el vector comprende el promotor, uno o varios marcadores de selección y el conjunto de segmentos de ADN de direccionamiento. Tal vector comprende:
 - un casete de expresión que comprende un promotor activo en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar, un sitio de inserción de ADN para recibir el ADN transformante de interés, uno o varios marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células que tienen plastidios que se transforman con el casete de expresión y, opcionalmente una región de terminación de la transcripción de la
 - 20 secuencia de ADN, activa en los plastidios de la especie vegetal que se va a transformar, y
 - un conjunto de segmentos de ADN de direccionamiento situados a ambos lados del casete de expresión que permiten una recombinación homóloga doble del casete de expresión con el genoma del plastidio de interés.

25 Los diversos elementos del vector son preferiblemente como se han descrito anteriormente para el método. La memoria descriptiva describe tanto el vector en el que no se incorpora ningún gen que va a ser transformado, como el vector que comprende cualquier gen transformable.

Los vectores tal y como se describen proporcionan una transformación estable de los plastidios de estructuras multicelulares, tales como plantas de lechuga.

30 La memoria descriptiva describe además plantas que son portadoras en sus células de plastidios que están transformados, en particular plantas que son portadoras de plastidios transformados por medio del método de la invención. Además, la memoria descriptiva describe la progenie de estas plantas en la que al menos parte de los plastidios transformados está todavía presente.

35 Lo que se describe en este documento se ilustra adicionalmente en los Ejemplos a continuación. En estos ejemplos, como material de explante, se utilizan protoplastos de mesófilo de plantas de lechuga y a través de una transformación mediante PEG se obtienen colonias derivadas de protoplastos transplastómicos y una regeneración de las plantas. Alternativamente, el callo transplastómico se obtuvo utilizando un bombardeo de partículas de cotiledones escindidos de la lechuga. Las estructuras artificiales de ADN comprenden un casete de expresión que contiene el ADN transformante que se dirige a un lugar predeterminado en el genoma del plastidio y se inserta en el genoma del plastidio mediante recombinación homóloga. Los segmentos de direccionamiento en el casete comprenden secuencias preferidas del genoma del ADN de cloroplasto de la lechuga, es decir, la región *trnI(oriA)/trnA* o la región 16S/trnV/ORF70B del genoma del cloroplasto de lechuga. El ADN usado para la transformación contiene además un gen marcador seleccionable no letal que confiere un fenotipo seleccionable a las células que tienen los plastidios con el ADN transformante, en este caso, espectinomicina. La secuencia codificadora, seleccionable no letal preferida es la región que codifica *aadA* de *E. coli*, que codifica la aminoglicósido-3'-adeniltransferasa para conferir resistencia a la espectinomicina y a la estreptomicina. Además, el casete de expresión de ADN comprende al menos una secuencia de ADN adicional, que es la secuencia de ADN de interés, tal como un gen que codifica una proteína verde fluorescente (gfp) (como un sistema modelo) o el gen de la hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Las estructuras artificiales, además, están provistas con un promotor y una secuencia terminadora funcional en los plastidios vegetales.

50 En los ejemplos que siguen se hace referencia a las siguientes figuras:

Figura 1. Secuencia diana del genoma de cloroplasto de lechuga LCV1 (que no incluye el vector de estructura principal) (SEQ ID NO: 1).

Figura 2. Mapa de LCV1 (7.545 pb).

Figura 3. Secuencia diana del genoma de cloroplasto de lechuga LCV1 (SEQ ID NO: 2) alineada con el

genoma de cloroplasto de tabaco (GI Z00044) (SEQ ID NO: 3). SEQ ID NO: 4 y 5 son las proteínas hipotéticas. SEQ ID NO: 41 es la proteína ribosómica.

Figura 4. Etapas de la clonación y cebadores (SEQ ID NOS: 6-9) para la construcción de LCV1. TCG = genoma de cloroplasto de tabaco.

5 Figura 5. Secuencia diana del genoma de cloroplasto de lechuga LCV2 (que no incluye el vector de estructura principal) (SEQ ID NO: 10).

Figura 6. Mapa de LCV2 (6.182 pb).

Figura 7. Secuencia diana del genoma de cloroplasto de lechuga LCV2 (SEQ ID NO: 11) alineada con el genoma de cloroplasto de tabaco (GI Z00044) (SEQ ID NO: 12).

10 Figura 8. Etapas de la clonación y cebadores (SEQ ID NOS: 13-16) para la construcción de LCV2. TCG = genoma de cloroplasto de tabaco.

Figura 9. Mapa de LCV1 MSK18 (9.682 pb).

Figura 10. Mapa de LCV2-MSK18 (8.329 pb).

15 Figura 11. Plantas diploides transplastómicas de lechuga pLCV2-LEC1 en las etapas de floración (panel superior izquierdo), microsporas (panel superior derecho) y conjunto de semillas (panel superior e inferior derecho).

Figura 12. Combinaciones de cebadores (SEQ ID NOS: 17-20) utilizados en el análisis con PCR de un callo transplastómico de lechuga.

Figura 13. Análisis molecular de callos de lechuga resistentes a la espectinomicina.

20 Panel A: productos de la PCR del gen de la ATPasa.

Carril 1. Marcador,

2. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1,
3. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1
4. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-1,
- 25 5. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-2,
6. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
7. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
8. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-2,
- 9 y 10 callos no transformados,
- 30 11 y 12 pLCV2-MSK18

Panel B: productos de la PCR del gen *AadA*.

Carril 1. Marcador,

2. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1,
3. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1
- 35 4. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-1,
5. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-2,
6. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
7. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
8. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-2,
- 40 9 y 10 callos no transformados,

11 y 12 pLCV2-MSK18

Panel C: los productos de la PCR de la unión *trnI*.

Carril 1. Marcador,

2. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1,
3. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1
4. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-1,
5. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-2,
6. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
7. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
8. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-2,
- 9 callo no transformado

Panel D: productos de la PCR de la unión *trnA*.

Carril 1. Marcador,

2. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1,
3. TRSL5-01016 pLCV2-MSK18-1
4. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-1,
5. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-1-2,
6. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
7. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-1,
8. TRSL5-02002 pLCV2-MSK18-2-2,
- 9 callo no transformado

Figura 14. Secuencia de fragmentos de la unión de integración del límite izquierdo (P1-P2) (SEQ ID NO: 21) y del límite derecho (P3-P6) (SEQ ID NO: 22) amplificados con PCR procedentes de ADN transplastómico de lechuga. La secuencia en letras minúsculas es ADN de cloroplasto lechuga externo a la región diana del vector LCV2. Panel superior: secuencia de consenso del fragmento del límite izquierdo P1-P2; Panel inferior: secuencia de consenso del fragmento del límite izquierdo P3-P6.

Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de productos de la PCR procedentes de reacciones con las parejas de cebadores P1+P2, P3+P4 y P1+P4 y ADN molde procedente de una muestra B de callo transplastómico putativo resistente a la espectinomicina (TP) y de callo de tipo silvestre no transformado (WT).

Figura 16. Análisis con PCR de la integración del inserto de callos transformados pLCV2-MSK18. Carril 1: marcador de ADN, carriles 2-7: TRSL05-02002 pLCV2-MSK18-1-1, TRSL05-02002 pLCV2-MSK18-1-2, TRSL05-02002 pLCV2-MSK18-1-3, TRSL05-02002 pLCV2-MSK18-2-1, TRSL05-02002 pLCV2-MSK18-2-2, TRSL05-02001 pLCV2-MSK18-1-1, respectivamente; carril 8 y 9: ADN de lechuga de control, carril 10: ADN plasmídico pLCV2-MSK18.

Figura 17. Análisis con PCR de la unión de integración del límite izquierdo y derecho de un callo, obtenido después de una transformación mediante bombardeo de partículas con plásmido pLCV2-MSK18. Panel A: unión de *trnI* (unión de integración izquierda). Panel B: unión de *trnA* (inserción del límite derecho. Carril 1: marcador lambda, carril 2: callo resistente a espectinomicina pLCV2-MSK18, carril 3, control de lechuga, carril 4: plásmido pLCV2-MSK18.

Figura 18. Análisis con PCR de líneas de callos pLCV2-LEC1 y controles.

A1: productos de la PCR del gen *ATPasa*.

Carril 1; marcador

- 2: pLCV2-LEC1 1.1

	3: pLCV2-LEC1 2.1
	4: pLCV2-LEC1 2.2
	5: pLCV2-LEC1 3.1
	6: pLCV2-LEC1 3.2
5	7: callo de lechuga no tratada de control
	8: callo no transformado de control
	A2: productos de la PCR del gen <i>ATPasa</i>
	Carril 1: marcador
	2: plásmido pLCV2-LEC1
10	3: agua
	B1: productos de la PCR del gen <i>AadA</i> .
	Carril 1; marcador
	2: pLCV2-LEC1 1.1
	3: pLCV2-LEC1 2.1
15	4: pLCV2-LEC1 2.2
	5: pLCV2-LEC1 3.1
	6: pLCV2-LEC1 3.2
	B2: productos de la PCR del gen <i>AadA</i>
	Carril 1: marcador
20	2: plásmido pLCV2-LEC1
	3: agua
	C: productos de la PCR de la unión <i>trnI</i> (límite izquierdo)
	Carril 1; marcador
	2: pLCV2-LEC1 1.1
25	3: pLCV2-LEC1 2.1
	4: pLCV2-LEC1 2.2
	5: pLCV2-LEC1 3.1
	6: pLCV2-LEC1 3.2
	7: ADN de lechuga no tratado de control
30	8: plásmido pLCV2-LEC1
	D: productos de la PCR de la unión <i>trnA</i> (límite derecho)
	Carril 1; marcador
	2: pLCV2-LEC1 1.1
	3: pLCV2-LEC1 2.1
35	4: pLCV2-LEC1 2.2
	5: pLCV2-LEC1 3.1
	6: pLCV2-LEC1 3.2

7: ADN de lechuga no tratado de control

8: plásmido pLCV2-LEC1

E: productos de la PCR del inserto

Carril 1; marcador

5 2: pLCV2-LEC1 1.1

3: pLCV2-LEC1 2.1

4: pLCV2-LEC1 2.2

5: pLCV2-LEC1 3.1

6: pLCV2-LEC1 3.2

10 7: callo de lechuga no tratado de control

8: callo no transformado de control

Figura 19. Análisis con PCR de la integración del inserto en 24 regenerantes transplastómicos diferentes, originados a partir de 1 callo transplastómico TRSL05-02002 pLCV2-MSK18 1-2 (carriles A-L y M-X) y 2 plantas de lechuga de control (lechuga de control)

15 Figura 20. Análisis con PCR de la integración del inserto en 7 regenerantes transplastómicos diferentes, originados a partir de 1 callo transplastómico número pLCV2-LEC1 2.2. Carril 1: marcador, carriles 2-8: plantas regeneradas pLCV2-LEC1 2.2, carril 9: ADN del plásmido pLCV2-LEC1, carril 10: ADN de lechuga de control.

Figura 21. Casete de expresión de lechuga LEC1. Promotor de operón de ARN específico de lechuga *LPrrn B*; secuencia del terminador *psbA* específico de lechuga *L3= psbA B*.

20 Figura 22. Representación esquemática de la PCR y la estrategia de clonación empleada para la construcción de LEC1 junto con secuencias de cebadores (SEQ ID NOS: 23-30).

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcciones de vectores

25 2. Construcción de LCV1

El vector de cloroplasto de lechuga LCV1 consiste en 4571 pb de la secuencia del genoma de cloroplasto de lechuga con un único sitio añadido *Pac1/Asc1* de 16 pb (Figura 1), clonado en los sitios de restricción *Sac1/Kpn1* en el polienlazador de un vector pBluescript SK + estructura principal (Figura 2). La secuencia de lechuga se extiende desde la región intergénica *rps7/3'--rps12* hasta la región intergénica *16SrRNA/trnI* y se corresponde a las posiciones de nucleótidos 100021-104387 en el genoma del cloroplasto de tabaco (número de orden GI Z00044). Una alineación de esta secuencia de lechuga con la secuencia del genoma de cloroplasto de tabaco se proporciona en la Figura 3. La siguiente descripción de la construcción de LCV1 se describe en la Figura 4.

35 Cuatro cebadores LCV1A, LCV1B, LCV1C y LCV1D se utilizaron para amplificar esta región en dos mitades (LCV1A-B y LCV1C-D) y para introducir un único sitio de restricción *Pac1/Asc1* en la región intergénica ORF70B/*trnV* en la posición correspondiente al nt 102367 en la secuencia del genoma de cloroplasto de tabaco. El ADN procedente del clon 6 de la genoteca *Sac1* del genoma de cloroplasto de lechuga (Jansen y Palmer, Current Genetics 11: 553-564 (1987)) se utilizó como molde para el vector de LCV1. LCV1A y LCV1B amplificaron un fragmento de 2575 pb (secuencia de lechuga de 2551 pb + 24 pb de extensión) LCV1A-B que abarcaba desde la región intergénica *rps7/3'rps12* a la región intergénica ORF70B/*trnV* (correspondiente a 100021-102367 en el genoma del cloroplasto de tabaco). El cebador LCV1A contiene un sitio *Sac1* y LCV1B contiene sitios *Pac1/Asc1* de manera que los sitios *Sac1* y *Pac1/Asc1* se incorporan en los extremos 5' y 3', respectivamente, del fragmento LCV1A-B.

45 El fragmento de LCV1 A-B se clonó en el vector plasmídico PCR2.1 de *E. coli* para crear PCR2.1 LCV1A-B. Estos clones fueron escrutados en busca de la orientación usando *Sac1* y *Sac1 + Xba1*. El inserto *Sac1/Xba1* se clonó en el polienlazador de pBluescript para crear pBSLCV1 A-B.

Los cebadores LCV1C y LCV1D amplificaron un fragmento de 2042 pb (secuencia lechuga de 2020 pb + 22 pb de extensión) LCV1 C-D. El cebador LCV1C contiene sitios *Pac1/Asc1* y el cebador LCV1D contiene un sitio de *Kpn1* de modo que un sitio *Pac1/Asc1* y un sitio *Kpn1* se añaden a los extremos 5' y 3', respectivamente, del fragmento

LCV1 C-D. El fragmento LCV1 C-D se clonó en pCR2.1 para crear PCR2.1 LCV1 C-D. Para la etapa final de clonación, PCR2.1 LCV1 C-D fue restringido con *Asc1*+*Kpn1* para liberar un inserto de 2031 pares de bases que se ligó a pBS A-B, el cual fue linealizado con *Asc1*+*Kpn1*, creando LCV1.

2. Construcción de LCV2

LCV2 consiste en una secuencia del genoma de cloroplasto de lechuga de 2.253 pb (Figura 5) que se extiende desde la región intergénica 16SrRNA/*trnI* a la región intergénica *trnA*/23S rRNA, clonada en el vector de la estructura principal PCR2.1 (Invitrogen) (Figura 6). Esta secuencia se corresponde a las posiciones de nucleótidos 104366-106260 en el genoma del cloroplasto de tabaco (número de orden GI Z00044). Una alineación de esta secuencia de lechuga con la secuencia del genoma de cloroplasto de tabaco se proporciona en la Figura 7. La siguiente descripción de la construcción de LCV2 se indica en la Figura 8.

Cuatro cebadores LCV2A, LCV2B, LCV2C y LCV2D se utilizaron para amplificar esta región en dos mitades (LCV2A-B y LCV2C-D) y para introducir sitios de restricción únicos *Pac1*/*Asc1* en la región intergénica entre los genes *trnI* y *trnA* en la posición correspondiente al nucleótido 105370 en el genoma del cloroplasto de tabaco.

Para la primera mitad (A-B) del vector, el ADN procedente del clon 6 de la genoteca *Sac1* del genoma de cloroplasto de lechuga (Jansen y Palmer, Current Genetics 11: 553-564 (1987)) se utilizó como molde. Los cebadores LCV2A y LCV2B amplificaron un fragmento de 1258 pb (1242 pb de la secuencia lechuga + 16 pb de extensión) (LCV2A-B) que abarcaba desde la región intergénica 16SrRNA/*trnI* a la región intergénica *trnI*/*trnA*. Este fragmento se clonó en el vector de clonación plasmídico de *E. coli* pCR2.1 (Invitrogen) para crear PCR2.1 LCV2A-B. El cebador LCV2B contiene sitios *Pac1*/*Asc1* de manera que el fragmento LCV2A-B tiene sitios *Pac1*/*Asc1* en el extremo 3'. Los clones PCR2.1 LCV2 A-B fueron escrutados para la orientación mediante digestión con *Kpn1*/*Asc1*, que libera un fragmento de aproximadamente 1300 pb, y *Xba1*/*Asc1* que linealizaba clones con la orientación correcta para la clonación subsiguiente.

Para la segunda mitad del vector, se utilizó ADN de cloroplasto procedente de la variedad de lechuga Evola (semillas Leen de Moss) como molde porque el gen *trnA* completo no estaba contenido en un solo clon en la genoteca del genoma de cloroplasto de lechuga. Los cebadores LCV2C y LCV2D amplificaron un fragmento de 1011 pb (995 pb de la secuencia de lechuga + 16 pb de extensión) LCV2C-D. Esta secuencia se extiende desde la región intergénica *trnI*/*trnA* hasta la región intergénica *trnA*/23S rRNA. El cebador LCV2C contiene sitios *Pac1*/*Asc1* de modo que el fragmento LCV2C-D tiene sitios *Pac1*/*Asc1* en su extremo 5'. Este fragmento se clonó en PCR2.1 para crear PCR2.1 LCV2 C-D. Estos clones fueron escrutados para la orientación usando *Kpn1*+*Asc1*, que linealiza clones con la orientación requerida y *Xba1*+*Asc1*, que libera un fragmento de aproximadamente 1000 pb en clones con la orientación requerida. Para generar LCV2, el inserto de 1,3 kb *Asc1*+*Xba1* de PCR2.1 LCV2C-D se subclonó en pCR2.1 LCV2A-B linealizado con *Asc1*+*Xba1*.

3. Construcción de LCV1-MSK18 y LCV2-MSK18

MSK18 es un casete de expresión adaptado a partir de pMSK18 (Hibberd et al., The Plant Journal 16, 627-632 (1998)). El plásmido MSK18 fue un regalo de John Gray (Dpto. de Ciencias Vegetales de la Universidad de Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 10 3EA, GB). Los detalles completos de la construcción de pMSK18 se han descrito previamente (Hibberd et al. 1998, *supra*). El casete de expresión MSK18 que consiste en la región que codifica mGFP (Haselhoff et al., Trends in Genetics 11, 328-329 (1997)) fusionada con un promotor *trc* bacteriano (Amman y Brosius, Gene 15 40, 183-190 (1985)), y una región que codifica *aadA*, obtenida a partir de pUC-atpX-AAD (Goldschmidt-Clermont, Nucleic Acids Research 19, 4083-4089 (1991)) fusionada con un promotor *rm* del tabaco obtenido a partir de pZS197 (Svab y Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913-917 (1993)). Una UTR 3' de *psbA* de tabaco obtenida a partir de pSZ197 (Svab y Maliga, 1993 *supra*) se fusiona con el extremo 3' del gen *aadA* (Figura 9).

Usando pMSK18 como molde, se añadieron los sitios *Pac1* y *Asc1* mediante PCR amplificando el casete con cebadores que contenían los sitios de restricción *Pac1* (5') y *Asc1* (3') en los extremos 5' y 3' del casete de expresión MSK18. Los cebadores utilizados para ello eran MSK18 A (directo) 5'-tagttaattaaTTGACAATTAATCATCCGGCTCGT-3' (SEQ ID NO: 31) y MSK18 B (inverso) 5'-tagggcgcgcgcTCAATATAGCTCTTCTTCTTA-3' (SEQ ID NO: 32). El producto de la PCR de MSK18 A-B se clonó en PCR2.1 para crear PCR2.1 MSK18. PCR2.1 MSK18 se restringió con *Pac1*/*Asc1* para liberar el inserto MSK18 que se clonó en los sitios *Pac1*/*Asc1* en LCV1 y LCV2 para crear LCV1-MSK18 (Figura 9) y LCV2-MSK18 (Figura 10).

Ejemplo 2

Construcción de LCV2-LEC1

El casete de expresión de lechuga 1 (LEC1, Figura 21) contiene el gen *aadA*, que confiere resistencia a la espectinomicina y la estreptomycinina en las plantas, y el gen de la hemaglutinina del virus de la gripe (HA) que codifica una vacuna potencial de una subunidad de la gripe. Ambos genes están bajo el control de un único promotor específico de lechuga (*Prrn*) y una secuencia terminadora (3' *psbA*). Un sitio de unión al ribosoma de cloroplasto

también precede a ambos genes. El casete de expresión se ensambló en tres piezas usando una combinación de amplificación por PCR y extensión por solapamiento (Figura 22).

Se amplificó el promotor del operón de ARN ribosómico específico de cloroplasto de lechuga (*Prrn*) a partir de ADN de cloroplasto de lechuga (fragmento 6, SacI de la genoteca cpDNA de Jansen; Jansen y Palmer, (Current Genetics 11: 553-564 (1987)) usando los cebadores A y B de PCR. El gen *aadA* y el sitio de unión al ribosoma aguas arriba (rbs) se amplificaron a partir del vector de transformación de cloroplasto de tabaco pZS197, usando los cebadores de PCR C y D. El gen HA y el rbs aguas arriba se amplificaron a partir de una estructura artificial de gen HA interno (HA con3) utilizando los cebadores de PCR E y F. Se amplificó una secuencia de terminación *psbA* específica de lechuga (3'*psbA*) a partir de ADN de cloroplasto de lechuga (cv. Evola) utilizando los cebadores de PCR G y H. Los productos de la PCR A+B y C+D se fusionaron mediante extensión con solapamiento, utilizando los cebadores de PCR A y D.

El producto A+D resultante de la PCR se clonó en los sitios SacI/NotI de pBS SK+ para crear pBS A+D. El producto de la PCR E+F se clonó en los sitios NotI/BamHI de pBS SK+ para crear pBS E+F. El producto de la PCR G+H se clonó en los sitios BamHI/PstI de pBS E+F para crear pBS E+H. El inserto completo (E+H) se cortó mediante restricción con NotI/PstI y se clonó en los sitios NotI/PstI en pBS A+D para crear pBS SK+ LEC1.

La expresión de *aadA* y HA en pBS SK+ LEC1 se sometió a ensayo en *E. coli*. Las células de *E. coli* transformadas eran resistentes a la estreptomicina, indicando que se expresaba el gen *aadA*. El análisis por transferencia Western de la expresión de HA con sueros anti-HA mostró una expresión de HA en *E. coli*. Se escindió todo el casete de expresión (*Prrn/aadA/HA/psbA*) de pBS SK+ LEC1 usando las enzimas de restricción PacI y AscI y se clonó en los sitios PacI/AscI en el vector de transformación de cloroplasto de lechuga LCV2 para crear LCV2-LEC1.

Ejemplo 3

Obtención de plántulas y una reserva *in vitro* de plantas

Se aíslan protoplastos de plantas a partir de material foliar de plantas donantes. En este ejemplo se proporciona la obtención de cultivos de brotes de hojas.

Las semillas se esterilizan mediante un lavado subsiguiente en etanol al 70%, solución de NaOCl al 0,7% durante 20 minutos y lavado tres veces con agua desmineralizada estéril. Las semillas se siembran en medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, Physiol. Planta., 15: 473-497 (1962)) con sacarosa al 2%, sin hormonas. Preferiblemente, las semillas se pueden cultivar a 15°C durante 2 días en la oscuridad, después de lo cual las semillas se transfieren a 25°C con luz (aproximadamente 3000 lux, fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad TL FTD 840). Cuando aparecen las primeras hojas verdaderas, las puntas del brote se transfieren al medio a base de Murashige y Skoog con sacarosa al 3%, sin hormonas. Estos cultivos de brotes estériles se cultivan en condiciones de crecimiento similares.

Ejemplo 4

Aislamiento de protoplastos

Se usan cultivos de brotes de tres semanas de edad para el aislamiento de protoplastos. Las hojas se cortan en trozos pequeños y se preplasmolizan durante 1 h en la oscuridad en solución PG (54,66 g/l de sorbitol y 7,35 g/l de CaCl₂·2H₂O). La solución PG se reemplaza entonces por una solución enzimática con 1% de celulasa y 0,25% de macerozima. La incubación tiene lugar durante 16 h en la oscuridad a 25°C.

Posteriormente, la suspensión se filtra a través de un filtro de malla de nailon (41 µm) y se lava con un tercio de volumen de solución CPW16S (Frearson et al., Developmental Biology 33: 130-137 (1973)) mediante centrifugación a 700 rpm durante 8 minutos. De esta manera, los protoplastos intactos se recogen en la superficie del material sobrenadante. Los protoplastos se lavan en solución W5 (9 g/l de NaCl, 18,38 g/l de CaCl₂·2H₂O, 0,37 g/l de KCl, 0,99 g/l de glucosa, 0,1 g/l de tampón morfolinoetanatosulfonido (MES)) mediante centrifugación a 600 rpm durante 5 minutos. Con el procedimiento descrito, se puede obtener un rendimiento de protoplastos de aproximadamente 10-15 x 10⁶ protoplastos por gramo de material foliar.

Ejemplo 5

Selección de callos obtenidos a partir de protoplastos con resistencia a espectinomicina

Los protoplastos de lechuga, obtenidos como se ha descrito en el ejemplo 4, se diluyen en medio de cultivo ½ B5 (Gamborg et al. Exp. Cell Res. 50:151 (1968)): 375 mg/l de CaCl₂·2H₂O, 18,35 mg/l de NaFeEDTA, 270 mg/l de succinato de sodio, 103 g/l de sacarosa, 0,1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,3 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0,1 g/l de MES y se ajustan a una densidad de cultivo de 6 x 10⁴ protoplastos por ml.

La suspensión de protoplastos se mezcla 1:1 con medio de cultivo ½ B5 con agarosa. Las perlas de agarosa se extienden en placas de Petri más grandes con medio de cultivo ½ B5 líquido en la parte superior de las mismas.

Las placas de Petri se tapan con una lámina de plástico parafilm y se cultivan a 25°C en la oscuridad. Una semana después del inicio del cultivo, el medio de cultivo se diluye con medio de cultivo ½ B5 líquido de nuevo aporte y 0,1 g/l de MES. Los cultivos se transfieren a la luz (aproximadamente 3000 lux, fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, TL FTD 840).

- 5 Cuando los callos tienen aproximadamente un tamaño de 0,5 mm, se transfieren al medio de crecimiento de callos SH2 (Schenk & Hildebrandt, Can. J. Bot. 50:199-204 (1972)) con 30 g/l de sacarosa, 5 g/l de agarosa, 0,1 mg/l de ácido 1-naftalen acético (NAA) y 0,1 mg/l de bencilaminopurina (BAP), y el agente de selección diclorhidrato de espectinomicina a concentraciones de 0-1000 mg/l. Se encontró que la concentración óptima de selección es de 500 mg/l. Los callos no resistentes aparecen como callos blancos. También crecen más lentamente en comparación con los callos de control. Las condiciones de cultivo son las descritas anteriormente para los callos de protoplastos anteriores.

Ejemplo 6

Transformación de protoplastos con polietilenglicol y selección mediante resistencia a antibióticos codificados por *aadA*

- 15 Los protoplastos de lechuga, obtenidos como se ha descrito en el ejemplo 4, se ajustan a una densidad de aproximadamente $1-1,5 \times 10^6$ protoplastos/0,4-0,6 ml en tampón de transformación (manitol 0,4 M, $MgCl_2$ 15 mM, MES al 1% (p/v), pH 5,8). Posteriormente, se añaden 10 µl de suspensión de plásmido (1 µg de ADN/µl de H_2O estéril) a los protoplastos así como 0,4-0,6 ml de solución PEG (40% p/v de PEG 6000, 2,36 g/l de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ y 7,28 g/100 ml de manitol). La incubación se realiza a temperatura ambiente durante 5-30 minutos. Los protoplastos se lavan y se resuspenden en medio de cultivo ½ B5 (Gamborg et al., Exp. Cell Res. 50:151 (1968)): 375 mg/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 18,35 mg/l de NaFeEDTA, 270 mg/l de succinato de sodio, 103 g/l de sacarosa, 0,1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0,3 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP).

La suspensión de protoplastos se mezcla 1:1 con medio de cultivo ½ B5 con agarosa. Las perlas de agarosa se extienden en placas de Petri más grandes con medio de cultivo ½ B5 líquido encima de las mismas.

- 25 Las placas de Petri se tapan con una lámina de plástico parafilm y se cultivan a 25°C. Después de 6 días, la selección de los microcallos se realiza añadiendo 500 mg/l del agente selectivo diclorhidrato de espectinomicina (concentración final). Una semana después del inicio del cultivo, el medio de cultivo se diluye con medio de cultivo ½ B5 líquido de nuevo aporte, con adición de diclorhidrato de espectinomicina y se cultiva con luz (aproximadamente 3000 lux, fotoperiodo 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, TL FTD 840).

- 30 Cuando los callos tienen un tamaño de aproximadamente 0,5 mm, se transfieren al medio de crecimiento de callos SH2 (Schenk & Hildebrandt, 1972, *supra*) con 30 g/l de sacarosa, 5 g/l de agarosa, 0,1 mg/l de ácido 1-naftalen acético (NAA) y 0,1 mg/l de bencilaminopurina (BAP), y el agente de selección diclorhidrato de espectinomicina en las concentraciones descritas anteriormente. Las condiciones de cultivo son como las descritas anteriormente.

- 35 Después de 2 semanas, se transfieren callos al medio de regeneración SHreg (Schenk y Hildebrandt, 1972, *supra*) con 15 g/l de sacarosa, 15 g/l de maltosa, 0,1 mg/l de NAA y 0,1 mg/l de BAP y diclorhidrato de espectinomicina en las concentraciones descritas anteriormente. Los callos resistentes a la espectinomicina aparecen como callos verdes entre los callos blancos (no resistentes).

- 40 Las plantas de regeneración aparecen después de aproximadamente 6 semanas y posteriormente, se transfieren al medio de enraizamiento (Schenk y Hildebrandt, *supra*) con 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar con las concentraciones de diclorhidrato de espectinomicina mencionadas anteriormente. Alternativamente, en los vectores de transformación en los que se añade gfp (proteína fluorescente verde) como gen de interés, la fluorescencia de gfp se detecta utilizando un microscopio invertido con las combinaciones de filtros adecuadas. Los callos verdes se detectaron 4-5 semanas después del inicio de cada experimento.

- 45 La Tabla 1 ofrece una visión general de los resultados obtenidos en experimentos de transformación de protoplastos con tres plásmidos diferentes. Los callos resistentes a la espectinomicina se obtuvieron después de una transformación de los protoplastos con los plásmidos PLCV2-MSK18 y PLCV2-LECI. Aproximadamente el 40-50% de los protoplastos sobrevivieron al tratamiento con PEG. Las líneas de callos de cada evento individual se mantienen en medio SHreg con el agente selectivo diclorhidrato de espectinomicina y se obtienen plantas regeneradas a partir de los plásmidos pLCV2-MSK18 y pLCV2-LEC1 (Tabla 1). También se observaron diferencias de ploidía entre callos individuales.

50

Tabla 1. Selección de transformantes de plastidios

Tratamiento/Experimento	Nº de pps tratados	Nº de callos verdes	Nº de callos regenerados
Control	Ninguno	0	
Control + PEG	$1,26 \times 10^6$	0	
pLCV1-MSK18	$1,26 \times 10^6$	0	
pLCV2-MSK18/exp 1	$1,26 \times 10^6$	1	0
pLCV2-MSK18/exp 2	$2,40 \times 10^6$	1	0
pLCV2-MSK18/exp 3	$4,80 \times 10^6$	5	2 (1 ++, 1 +/-)
pLCV2-LEC1/exp 1	$3,60 \times 10^6$	5	3 (1 ++, 2 +/-)

El callo transgénico se ha obtenido utilizando vectores con secuencias homólogas específicas de ADN de cloroplasto de lechuga. La selección de las células transformadas con el agente selectivo no letal espectinomicina ha sido exitosa. La frecuencia de transformación óptima para la lechuga, determinada como el número de callos verdes frente al número de protoplastos sobrevivientes es de aproximadamente 1 en $3-6 \times 10^5$ protoplastos (Tabla 1).

Se encontró que las plantas obtenidas a partir de los experimentos de transformación con pLCV2-LEC1 tenían un nivel normal de ploidía diploide y mostraban un crecimiento normal. El conjunto de semillas después de la autopolinización se obtuvo a partir de estas plantas (Figura 11).

Ejemplo 7

Transformación de protoplastos mediante electroporación y selección con resistencia a antibióticos codificada por *aadA*

Protoplastos, obtenidos como se ha descrito en el ejemplo 4, se suspenden en tampón de transformación HBS (KCl 150 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2)), y suficiente manitol para equilibrar osmóticamente los protoplastos. Esto depende del genotipo, pero se puede detectar fácilmente de forma experimental. Partes alícuotas de 1×10^6 protoplastos/0,5 ml de tampón HBS y manitol se ponen en un tubo cónico de centrifuga, y se añade una solución de ADN plasmídico. Las concentraciones de ADN plasmídico en el tampón de transformación deberían estar preferiblemente en el intervalo de 10-100 µg/ml. La suspensión de ADN de protoplastos se transfiere a la cámara de electroporación y se electropora utilizando un solo impulso eléctrico (por ejemplo, 325 µF, 300 V). El ajuste óptimo puede variar con la especie y el tipo de célula, y se debe determinar en experimentos preliminares. Los parámetros más eficaces se determinan encontrando los ajustes del impulso que dan como resultado la muerte del 50% de los protoplastos, 24 h después de los choques. Más detalles del método están descritos por G.W. Bates (Transformación de plantas mediante electroporación de protoplastos. De: Methods in Molecular Biology Vol 111: Plant Cell Culture Protocols, págs. 359-366 (1999)).

Después de la electroporación, el cultivo de protoplastos y la selección se realizan como se ha descrito en el ejemplo 6.

EJEMPLO 8

Ajuste de los niveles umbrales de espectinomicina en los cotiledones

Para el ajuste de la concentración óptima de espectinomicina para una selección de las células con cloroplastos/plastidios, las cuales se transforman con estructuras artificiales que tienen el gen *aadA* como marcador seleccionable, se sembraron cotiledones de 4-10 días con el lado abaxial sobre medio MS (Murashige y Skoog, *supra*) con agar al 0,8%, 30 g/l de sacarosa, 100-200 mg/l de carbenicilina, 0,1 mg/l de bencilaminopurina (BAP), 0,1 mg/l de ácido 1-naftalen acético (1-NAA) a pH 5,8, y con diversas concentraciones de diclorhidrato de espectinomicina. Los cotiledones se obtuvieron como se ha descrito en el Ejemplo 3 y se cultivaron a 25°C con luz (aproximadamente 3000 lux, fotoperiodo 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, TL FTD 840). Se encontró que una concentración de 0,5-1 g/l de diclorhidrato de espectinomicina era suficiente para una selección eficaz, que conducía a un blanqueo completo y una pérdida de crecimiento y regeneración de los cotiledones de control.

Ejemplo 9

Transformación de material vegetal a través de biolística y selección por resistencia a antibióticos codificada por *aadA*

- 5 Para el bombardeo de cotiledones, las semillas se sembraron como se ha descrito en el ejemplo 3. Alternativamente, trozos de hojas se pueden usar como material de explante para disparar, en condiciones similares. Se colocan cotiledones (de 3 a 12 días de edad) o trozos de hojas de plántulas de 10-14 días de edad sobre medio MS (Murashige y Skoog, *supra*) con 0,8% de agar, 0,3 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de 2,4-D (pH 5,8) y se preincubaron durante 1-6 días antes de la transformación con una pistola de partículas.
- 10 Los cotiledones se cultivan a 25°C con luz (aproximadamente 3000 lux, fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, TL FTD 840).
- 15 Partículas de oro (0,6 a 1,6 µm) se prepararon para la transformación, mezclando 50 µl de suspensión (60 mg/ml de glicerol al 50%) con 5 µg de ADN (1 µg/µl de H₂O), 50 µl de CaCl₂ (2,5 M) y 20 µl de espermidina (base 0,1 M). La mezcla de partículas-ADN se incubó a temperatura ambiente durante 1-3 minutos y se centrifugó durante 3-10 s en una centrífuga Eppendorf. Después de retirar el material sobrenadante, las partículas recubiertas se lavan y se diluyen en 48-60 µl de etanol. Las partículas (6-8 µl por vehículo) se aplican a los recipientes de macrovehículos y el bombardeo se realiza con el sistema de suministro de partículas de biobalística PDS-1000/He (BioRad).
- Los explantes se colocan a aproximadamente 6 cm de distancia de la diana y se bombardean usando un disco de ruptura de 1100 p.s.i. Los detalles del procedimiento han sido descritos por Klein et al. (Bio/Technology 6: 559-563 (1988)).
- 20 De dos a catorce días después del bombardeo, los cotiledones se transfieren a medio MS1 líquido (Murashige y Skoog, *supra*) con 30 g/l de sacarosa y se complementa con 100-200 mg/l de carbenicilina, 0,1 mg/l de bencilaminopurina (BAP) y 0,1 mg/l de ácido 1-naftalén acético (1-NAA) a pH 5,8 como se ha descrito anteriormente, con la adición de un agente selectivo (por ejemplo, diclorhidrato de espectinomicina a una concentración de 500 mg/l). Se incuban en medio líquido a 25°C con luz (aproximadamente 3000 lux, fotoperiodo 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, TL FTD 840) durante aproximadamente 1-8 días, después de lo cual se transfieren a medio MS1 sólido (véase anteriormente, con la adición de 8 g/l de agar). Los cultivos se transfieren a medio de nuevo aporte cada 2 semanas.
- 25 Cuando aparecen callos verdes o brotes, se transfieren a medio MS1 sin carbenicilina, pero que incluye el agente selectivo diclorhidrato de espectinomicina.
- 30 La Tabla 2 presenta los resultados de los experimentos de transformación con pLCV2-MSK18. Se encontró que un callo verde, resistente a espectinomicina se había formado sobre cotiledones bombardeados, aproximadamente 2,5 meses después del inicio del experimento. El callo resistente a la espectinomicina se mantuvo sobre medio MS1 con el agente selectivo.
- 35 Tabla 2. Resultados de los experimentos de bombardeo de partículas con pLCV2-MSK18 utilizando cotiledones o trozos de hoja.

Tipo de explante/tratamiento	Número de explantes bombardeados	Número de explantes con callo resistente a la espectinomicina
Selección de cotiledón bombardeado	180	1
Selección de cotiledón de control	30	0
Selección de hoja bombardeada	96	0
Selección de hoja de control	16	0

Ejemplo 10

Análisis molecular de callos de lechuga resistentes a la espectinomicina

- 40 La resistencia a la espectinomicina de células vegetales puede ser el resultado, además de la transformación con el vector LCV2-MSK18, de una mutación espontánea del ADN de cloroplasto o la inserción del ADN en el genoma nuclear. Por lo tanto, se escrutó el callo y las plantas regeneradas en busca de la integración del segmento del límite homólogo derecho e izquierdo como se describe en este Ejemplo. Además, se determinó si el gen *aadA*, el gen *gfp* y HA estaban correctamente integrados en el ADN del cloroplasto.

1. Análisis de los callos obtenidos a partir de transformaciones de protoplastos mediante PEG con pLCV2-MSK18

Un callo de lechuga resistente a la espectinomicina se analizó mediante PCR usando diferentes combinaciones de cebadores para confirmar la integración del plásmido pLCV2-MSK18 en el genoma del cloroplasto.

Como control endógeno para la amplificación del ADN de cloroplasto, se llevó a cabo un análisis con PCR del gen ATPasa (número de orden: AF162208) utilizando el cebador directo 5'-ACTAATAGTGGACAAATTGGC-3' (SEQ ID NO: 33) y el cebador inverso 5'-TTGCTTGATTGTATTTACTCG-3' (SEQ ID NO: 34). Para detectar la presencia del gen marcador seleccionable *AadA*, se usó la siguiente combinación de cebadores: directo 5'-AAGTCACCATTGTTGTGCACG-3' (SEQ ID NO: 35) e inverso 5'-TATGACGGGCTGATACTGGGC-3' (SEQ ID NO: 36). Con el fin de demostrar la integración física del plásmido en el genoma del cloroplasto, se desarrollaron 2 combinaciones de cebadores que amplificaban regiones híbridas del plásmido y del genoma de cloroplasto (véase la Figura 12). La primera combinación de cebadores que consistía en P1 y P2, amplifica la unión que contiene la secuencia *trnI* del genoma de cloroplasto (integración del límite izquierdo). La segunda combinación de cebadores que consistía en P3 y P4, amplifica la unión que contiene la secuencia de *trnA* del genoma de cloroplasto (integración del límite derecho).

El ADN total se aisló a partir de un callo resistente a la espectinomicina utilizando un kit de aislamiento de ADN comercialmente disponible procedente de Sigma (Genelute Plant Genome DNA Kit). La reacción de PCR se llevó a cabo usando una cantidad total de 30 ng de ADN, después de la cual los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

El resultado del análisis de 5 callos independientes resistentes a espectinomicina, obtenidos a partir de transformaciones de protoplastos mediante PEG, se muestra en la Figura 13 (datos de 2 callos no mostrados pero idénticos a los otros 5). El fragmento de ATPasa de aproximadamente 424 pb solo está presente en el material de callo y material de hoja de lechuga, y como se esperaba no era visible el ADN de pLCV MSK18 (Figura 13A). La amplificación con PCR del gen *aadA* proporcionó el fragmento esperado de aproximadamente 413 pb para el callo transgénico y el plásmido pLCV2-MSK18 (Figura 13B).

Para confirmar la integración del vector pLCV2-MSK18 en el genoma de cloroplasto de lechuga, se utilizaron las dos combinaciones de cebadores que detectaban específicamente cualquiera de las dos uniones que surgen después de la integración del plásmido mediante recombinación homóloga. La integración en la unión *trnI* se investigó utilizando los cebadores de PCR indicados anteriormente, lo que daba lugar también a una banda esperada de aproximadamente 2000 pb (Figura 13C). La Figura 13D muestra la amplificación de la unión *trnA* que da como resultado una banda esperada de aprox. 1500 pb en el callo resistente a espectinomicina. Los resultados de este análisis confirman la naturaleza transplastómica de los callos de lechuga pLCV2-MSK18 obtenidos, resistentes a la espectinomicina, y no se encontraron escapes.

Para confirmar adicionalmente la integración, las uniones de integración izquierda y derecha se amplificaron mediante PCR usando las parejas de cebadores P1+P2 y P3+P4. Los productos de la PCR procedentes de una muestra de callo resistente a espectinomicina se clonaron en PCR2.1 y se secuenciaron utilizando cebadores M13 directos y M13 inversos. Estas secuencias confirmaron que LCV2-MSK18 se integraba en el genoma de cloroplasto de lechuga (Figura 14).

Para eliminar la posibilidad de una amplificación del ADN del plásmido LCV2-MSK18 no integrado, los cebadores P1 y P4 se diseñaron a partir de secuencias de cloroplasto de lechuga externas a la región diana del vector (Figura 12). El análisis con PCR se llevó a cabo en ADN aislado a partir de 6 callos supuestamente transformados. En todos los casos, P1 y P4 proporcionan dos productos de PCR, una banda de 2476 pb correspondiente al tamaño esperado de un producto amplificado procedente de un genoma de cloroplasto de tipo silvestre no transformado y una banda de 4623 pb correspondiente al tamaño de un producto de PCR esperado procedente de un genoma de cloroplasto transformado. La Figura 15 muestra los resultados en detalle para un callo, y la Figura 16 muestra los resultados de la PCR sobre la integración de insertos para 6 callos independientes.

2. Análisis molecular de callos resistentes a la espectinomicina, obtenidos después de una transformación biolística con pLCV2-MSK18

Se usaron combinaciones de cebadores similares, tales como las que se usaron para el callo resistente a la espectinomicina de los experimentos con protoplastos mediante PEG, para evaluar la naturaleza transplastómica del callo obtenido a partir del tejido bombardeado. La Figura 17 muestra los productos de la unión de *trnI* y *trnA*, respectivamente. Se comprobó que el callo era de naturaleza transplastómica.

3. Análisis molecular de un callo transplastómico putativo, obtenido a partir de experimentos de transformación de protoplastos mediante PEG con pLCV2-LEC1.

Para el análisis de los callos, obtenidos mediante experimentos de transformación de protoplastos con pLCV2-LEC1, se podían utilizar combinaciones de cebadores similares a las transformaciones del plásmido pLCV2-MSK18 para el gen *aadA*, el control endógeno y la integración del inserto P1 + P4 (véase la Figura 13). Además, se realizó un análisis con PCR sobre la integración en el límite izquierdo usando el cebador directo 5'-

ACTGGAAGGTGCGGCTGGAT-3' (SEQ ID NO: 37) y el cebador inverso 5'-TATGACGGGCTGATACTGGGC-3' (SEQ ID NO: 38). La integración en el límite derecho se realizó usando el cebador directo 5'-ATGCAAAAACCTCCCGGAAAT-3' (SEQ ID NO: 39) y el cebador inverso 5'-CTCGCCCTTAATTTTAAGGC-3' (SEQ ID NO: 40).

- 5 Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 18. Está claro que los 5 callos independientes son verdaderamente transplastómicos y no se encontraron escapes.

4. Análisis molecular de plantas regeneradas a partir de un callo transplastómico, obtenido a partir de experimentos de transformación de protoplastos mediante PEG con pLCV2-MSK18 y LEC1

- 10 La Figura 19 muestra los resultados de una PCR a partir de ADN obtenido a partir de varias plantas regeneradas a partir de un callo transplastómico pLCV2-MSK18. La Figura 20 muestra el análisis con PCR de plantas regeneradas pLCV2-LECI. Está claro que ambos tipos de plantas son realmente transplastómicas.

REIVINDICACIONES

1. Método para la transformación de genomas de plastidio de lechuga, que comprende las etapas de:

a) transformar protoplastos de lechuga con un vector de transformación que es portador de una secuencia de ADN de interés por medio de una transformación mediante polietilenglicol;

5 b) colocar los protoplastos tratados de ese modo durante un período de tiempo en contacto con un medio de cultivo sin agente de selección;

c) posteriormente añadir un agente de selección al medio de cultivo;

d) renovar el medio de cultivo que comprende un agente de selección mediante la adición de medio de nuevo aporte con agente de selección o cambiar el medio de selección por un medio con un agente selectivo;

10 e) crecimiento de los protoplastos que comprenden plastidios que han adquirido el ADN de interés en transformantes.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el vector de expresión comprende:

15 - un casete de expresión que comprende opcionalmente un promotor activo en la lechuga, un sitio de inserción de ADN para recibir el ADN transformante de interés, opcionalmente uno o varios marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células que tienen plastidios que se transforman con el casete de expresión y, opcionalmente, una secuencia de ADN que codifica una región de terminación de la transcripción activa en la lechuga,

20 - opcionalmente un conjunto de segmentos de ADN de direccionamiento situados a ambos lados del casete de expresión que permiten una recombinación homóloga doble del casete de expresión con el genoma del plastidio de interés, y

- opcionalmente una secuencia de ADN que codifica un gen de interés, insertada en el sitio de inserción del casete de expresión.

3. Método según la reivindicación 2, en el que el vector comprende el promotor, la secuencia de ADN que codifica el gen de interés, uno o varios marcadores de selección y el conjunto de segmentos de direccionamiento de ADN.

25 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que los transformantes son portadores del ADN de interés en su genoma.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los plastidios que se van a transformar se seleccionan a partir del grupo que consiste en cloroplastos, amiloplastos, elaioplastos, etioplastos, cromoplastos, leucoplastos y proplastidios.

30 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el promotor se selecciona a partir del grupo que consiste en el promotor del operón de ARN ribosómico específico de cloroplasto *rrn* (ARNr 16S), *psbA*, *rbcL*, *trnV* o *rps16*.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el ADN de interés es un gen que codifica un (poli)péptido (bio)farmacéutico terapéutico o profiláctico, tal como una vacuna comestible.

35 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el ADN de interés se selecciona a partir del grupo que consiste en genes que codifican la resistencia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a hongos, resistencia bacteriana, genes que conducen a una tolerancia del estrés, por ejemplo frente al frío, una cantidad elevada de sales o minerales, genes que mejoran el rendimiento, la acumulación de almidón, la acumulación de ácidos grasos, la fotosíntesis.

40 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que el terminador se selecciona a partir del grupo que consiste en una secuencia de terminación *psb A*, *rrn*, *rbcL*, *trnV* o *rps16*.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el marcador de selección se selecciona a partir del grupo que consiste en genes que confieren resistencia a la espectinomicina, estreptomycin, kanamicina, higromicina y cloranfenicol, glifosato, bialafos.

45 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el marcador de selección es un marcador visual, tal como un marcador fluorescente de tipo *gfp* (proteína fluorescente verde).

12. Método según la reivindicación 11, en el que las etapas d) y e) del método de transformación se omiten y los transformantes se seleccionan mediante una iluminación de los transformantes putativos con una fuente luminosa apropiada correspondiente al marcador visual y una selección del material vegetal que muestra fluorescencia.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en el que los segmentos de ADN que permiten una recombinación homóloga doble del ADN de interés con el genoma del plastidio de interés tienen una secuencia de ADN que es homóloga a una parte del genoma de plastidio.
14. Método según la reivindicación 13, en el que el conjunto de segmentos de ADN se selecciona a partir del grupo que consiste en la región *trnI(oria)/trnA* y la región 16S/*trnV*/ORF70B del genoma de cloroplasto de lechuga.
15. Método según la reivindicación 13, en el que el conjunto de segmentos de ADN se selecciona a partir de LCV1 A-B y LCV1 C-D, y LCV2 A-B y LCV2 C-D, en donde LCV1 A-B es un fragmento de 2575 pb amplificado por los cebadores LCV1A (SEQ ID NO: 6) y LVC1B (SEQ ID NO: 7), y LCV1 C-D es un fragmento de 2042 pb amplificado por los cebadores LCV1C (SEQ ID NO: 8) y LVC1D (SEQ ID NO: 9) (Figura 4) y en donde LCV2 A-B es un fragmento de 1258 pb amplificado por los cebadores LCV2A (SEQ ID NO: 13) y LVC2B (SEQ ID NO: 14), y LCV2 C-D es un fragmento de 1011 pb amplificado por los cebadores LCV2C (SEQ ID NO: 15) y LVC2D (SEQ ID NO: 16) (Figura 8).
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el período de tiempo durante el cual el material vegetal tratado se pone en contacto con un medio de cultivo sin agente de selección es de 1 a 14 días, preferentemente de 3-7 días, más preferiblemente de aproximadamente 6 días.
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que la etapa c) se lleva a cabo en la oscuridad.

Fig. 1-1

SEQ ID NO:1

GTTCAAGAATCAGTTTTCTTTTATAAGGGCTAAAAATCACTTATTTTGGCTTTTTTACCCCATATGTAGGGTG
 GATCTCGAAAGATATGAAAGATCTCCCTCCAAGCCGTACATACGACTTTTCATCGAATACGGCTTTCCGCAGAAT
 TCTATATGTATCTATGAGATCGAGTATGGAATTCGTCTTACTCACTTTAAATTGAGTATCCGTTTTCCCTCCCTTT
 TCCTGCTAGGATTGAAATCCTGTATTTTACATATCCATACGATTGAGTCCTTGGGTTTCCGAAATAGTGATAA
 AAGAAGTGCTTCAAATCATTGCTATTTGACTCGGACCTGTTCTAAAAAGTCGAGGTATTTCAATTGTTTGTG
 ACACGGACAAAAGTCAGGGAAAACCTCTGAAATTTTTCATATTTGAACCTTGGACATATAATAGTTCGGAATCG
 AATCTCTTTAGAAAGAGATCTTTTGTCTCATGGTAGCCTGCTCCAGTCCCTTACGAAACTTTTCGTTATTGGG
 TTAGCCATACACTTCACATGTTTCTAGCGATTACATGGCATCATCAATGATACAGTCTTGGATAAGAATCT
 ACAACGCACTAGAACGCCCTTGTGACGATCCTTTACTCCGACAGCATCTAGGGTTCCTCGAACAAATGTGATAT
 CTCACACCGGGTAAATCCTTAACCCCTCCCCCTCTTACTAAGACTACAGAATGTTCTTGTGAATTATGGCCAA
 ACCGGGTATATAAGCAGTGATTTCAAATCCAGAGGTTAATCGTACTCTGGCACTTTACGTAAGGCAGAGTTTG
 GTTTTTTTGGGGTGATAGTGGAAAAGTTGACAGATAAGTCAACCCTTACTGCCACTCTACAGAACCGTACATGAG
 ATTTTCACCTCATAACGGCTCCTCGTTCAATTCTTTTCGAAGTTATTGGATCCTTTTCCGCTTCGAGAATCCCT
 CCCTTCTTCCACTCCGTCCCGAAGAGTAACTAGGACCAATTTAGTCACGTTTTCATGTTCCAATTGAACACTTT
 CCGTTTTTGATTATTCTCTTTACCAAACATATGCGGATCCAATCAGCATCTTATAATAAGAACAAGAGATCTTT
 CTCGATCAATCCCTTGGCCCTCATTTCTCGAGAATCAGAAAGATCCTTTTCAAGTTTGAATTTGTCTATTGG
 AATCTGAGTCTTCTACTTCATTATTTATTTAATATCAATATTTTGCCTCTCTTTTTTTATATTTATCTCTTA
 AGTCCCATAGGTTTGATCCTTTAGAATTGGACTCATTTTCTCATTGAGCGAAGGGTACGAAATAAATCAGATTG
 ATTTAAAGCACTATGTGAAATATTCGGTTTTTCTCTCTCCTCTATCCCATAGGTACAGTGTTTGAATCAATCG
 AGAAGCTTTTCTCTGTCTGAATCGATATTATTCATTCCAATTCCTTCCCGATACCTCTCAAGGAAAATCTCG
 AATTGGATCCTAAATTGACGGGTTAGTGTGAGCTTATCCATGCGGTTATGCACCTCTTCGAATAGGAATCCATTT
 TCTGAAAGATCCTGGCTTTCGTGCTTTGGTGGGTCTCCGAGATCCTTTCGATGACCTATGTTGTGTTTGTGAA
 GGGATATCTATATAATACGATCGATTGCGTAAAGCCCGCGGTAGCAGTGGAAACCGGGGAAAGTATACAGAAAAG
 ACAGTCTCTTTCTATATATATATATATAGTCTTTTCTATTTAATTCATATTAGATTAGTCTTAGTTAGTGATC
 CCGCTTAGTGAGTCTTTCTTCCGTGATGAACCTGTGCGCGCAGTCTTACATTTTGTCTCTGTGGACAGAGGA
 GAAAAGGGGCTCCGCGGGAAGAGGATTGTACCGTGAGAGAAGCAAGGAGGTCAACCTCTTTCAAATATACAACA
 TGGATTCTGGCAATGCAATGACTTGGACTCTCATGTGATCCGAATGAATCATCCTTTCCACGGAGGCAAAATC
 TTTGCTTGTAGGTAAACAGGATAGCAAGTTACAAACTCTGTCTCGGTAGGACATGGATCTCTATTACTATGAAT
 TTCATAAATGAAGTAGTGAATGGTGGGGTTACCAATTATCCTTTTTGTAGTGACGAATCCTGTATGTGTTCTCAA
 GAAAAGGAATTTGTACATTTTTCGGGATCTCAAAGGAGCGTGGAACACATAAGAATCCTTGAATGGAATGGA
 AAAGAGATGGAATCCAGTTCCTTCGGAATGGTAAGATCTTTGGCGCAAAAAAGGGTTGATCCGTATCATC
 TTGACTTTGGTTCTGCTTCTCTATTTTTTAATAATACCGGGTCGGGTTCTTCTCTACCCGTATCGAATAGAA
 CACGCTGAGCCAAATCTTCTCATGTAAAACCTGCTTGATTTAGATCGGGAAATCGTGTGGTTTTATGAAACC
 ATGTGCTATGGCTCGAATCCGTAGTCAATCCTATTTCCGATAGGGACAGTTGACAACCTGAATCCTATTTTCCCA
 TTATTTTTCATATCCGTAATAGTGCGAAAAAAAAGATTAATTAAGGCGCGCCAGGCCCGGCCCAAGTTGTTCAA
 GAATAGTGTGTTGAGTTTCTCGACCTTTGCCTTAGGATTAATCAGTTCTATTTCTCGATGGGGGACAGGGAAG
 GGATATAACTCACCGGTAGAGTGTACCCCTTGACGTGGTGGAAAGTCATCAGTTTCGAGCCTGATTATCCCTAAAC
 CCAATGTGAGTTTGTATATTTTGATTGCTACCCCGCCGTGATTGAATGAGAATGGATAAGAGGCTCGTGGGAT
 TGACGTGAGGGGGCAGGGATGGCTATATTTCTGGGAGCGAACTCCGGCGCAATATGAAGCGCATGGATACAAGT
 TAGGCCTTGGAAATGAAAGACAAATCCGAATCCGCTTTGTCTACGAACAAGGAAGCTATAAGTAATGCAACTATG
 AATCTCATGGAGAGTTCGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGGACGGGA
 AGTGGTGTTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACAGCTGGAAA
 CGGCTGCTAATACCCCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCCGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCT
 AGTTGGTGAGGTAATAGCTTACCAAGCGATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAACCTGACGGAGCAA
 TGCCGCGTGGAGGTAGAAGGCCACGGGTGATGAACCTTTTCCCGGAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGG
 AATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGG
 CGTAAAGCGTCTGTAGTGGCTTTTAAAGTCCGCGTCAAATCCAGGGCTCAACTCTGGACAGGCGGTGGAAA
 CTACCAAGCTGGAGTACGGTAGGGGACAGAGGAATTTCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGAAAGAA
 CACCAACGGCCAAAGCACTCTGCTGGGCCCACACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTA

Fig. 1-2

(continuación)

GATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGCTGTGCGTATCGACCCGTGCAGTGCTGTAGCT
AACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAAGCGAAGAACCCTACCAGGGCTTGACATGCCGCGAATCCTCT
TGAAAGAGAGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGCCGTAAAGGTGT
TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTGTTAGTTGCCATCATTGAGTTTGGAAACCCTGAACAGACTG
CCGTTGATAAGCCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACACGTGC
TACAATGGCCGGGACAAAGGGTCGCGATCCCGCGAGGGTGAGCTAACCCAAAAACCGTCCTCAGTTCGGATT
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCATACGGCGGTGAATCCGTT
CCCGGGCCTTGTAACACCCGCCGTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCGAAGTCGTTACCTTAACCGCAAGG
AGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTGACTGGAGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACTGGAAGGTGCGGCTG
GATCACCTCCTTTTCAGGGAGAGCTAATGCTTGTGGGTATTTGGTTTGACACTGCTTCACACCCAAAAAGA
AGGGAGCTACGTCTGAGTTAACTTGAGATGGAAGTCTTCATTCGTTTCTCGACAGTGAAGTAAGACCAAG

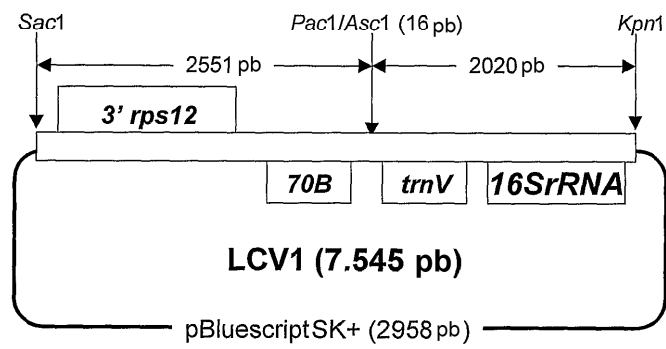


Fig. 2

Fig. 3-1

```

LCV1 (SEQ ID NO:2): 1      gttcaagaatcagttttctttttataaagggtctaaatcacttattttggctttttacc 60
                        |||
tabaco (SEQ ID NO:3): 100021 gttcaagaatcagttttctttttataaagggtctaaatcacttattttggctttttacc 100080
                        |||
proteína ribosómica S12 (SEQ ID NO:41) 80      ^^^ K P K K V G

LCV1: 61      catattgtagggtggatctcgaagatatgaaagatctccctccaagccgtacatacgac 120
tabaco: 100081 catattgtagggtggatctcgaagatatgaaagatctccctccaagccgtacatacgac 100140
proteína ribosómica S12 78      Y K ~~~~~

LCV1: 121     tttcatcgaatacggctttccgcagaattctatatgtatctatgagatcgagatggaat 180
tabaco: 100141 tttcatcgaatacggctttccgcagaattctatatgtatctatgagatcgagatggaat 100200
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 181     tctgtttactcactttaaattgagtatccgtttccctccttttctgctaggattggaaa 240
tabaco: 100201 tctgtttactcactttaaattgagtatccgtttccctccttttctgctaggattggaaa 100260
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 241     tcctgtattttacatatccatacgattgagtccttgggtttccgaaatagtgtaaaaaga 300
tabaco: 100261 tcctgtattttacatatccatacgattgagtccttgggtttccgaaatagtgtaaaaaga 100320
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 301     agtgcttcaaatcattgctattttgactcggacctgttctaaaaa-gtcgaggtatttcga 359
tabaco: 100321 agtgcttcaaatcattgctattttgactcggacctgttctaaaaaagtcgaggtatttcga 100380
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 360     attgtttgttgacacggacaaaagtcagggaacacctctgaaatttttcaattatgaacc 419
tabaco: 100381 attgtttgttgacacggacaaaagtcagggaacacctctgaaatttttcaattatgaacc 100440
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 420     ttggacatataatagttccgaatcgaatctctttagaagaagatctttgtctcatggt 479
tabaco: 100441 ttggacatataatagttccgaatcgaatctctttagaagaagatctttgtctcatggt 100500
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 480     agcctgctccagtcctcccttacgaaactttcggtatttgggttagccatacacttcacatgt 539
tabaco: 100501 agcctgctccagtcctcccttacgaaactttcggtatttgggttagccatacacttcacatgt 100560
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 540     ttctagcgattcacatggcatcatcaaatgatacaagtccttgataagaatctacaacgc 599
tabaco: 100561 ttctagcgattcacatggcatcatcaaatgatacaagtccttgataagaatctacaacgc 100620
proteína ribosómica S12 1      ~~~~~

LCV1: 600     actagaacgccttgttgacgatcctttactccgacagcatctagggttcctcgaacaat 659
tabaco: 100621 actagaacgccttgttgacgatcctttactccgacagcatctagggttcctcgaacaat 100680
proteína ribosómica S12 59     ~~~ S R G Q Q R D K V G V A D L T G R V I

```

Fig. 3-2

(continuación)

```

LCV1:      660      gtgatatctcacaccgggtaaatccttaaccctccccctcttactaagactacagaatg 719
|||||
tabaco:    100681  gtgatatctcacaccgggtaaatccttaaccctccccctcttactaagactacagaatg 100740
proteína ribosómica S12 39      H Y R V G F L D K V R G G R V L V V S H

LCV1:      720      ttcttgtgaattatggccaataccgggtatataagcagtgatttcaaatccagaggtaa 779
|||||
tabaco:    100741  ttcttgtgaattatggccaataccgggtatataagcagtgatttcaaatccagaggtaa 100800
proteína ribosómica S12 19      E Q L N H G I G P I Y A T I E F G S T L

LCV1:      780      tcgtactctggcaactttacgtaaggcagagtttggttttttggggtgatagtgaaaa 839
|||||
tabaco:    100801  tcgtactctggcaactttacgtaaggcagagtttggttttttggggtgatagtgaaaa 100860
proteína ribosómica S12 1      R V R A V K R L A S N P K K P T I T

LCV1:      840      gttgacagataagtcacccttactgccactctacagaaccgtacatgagattttcacctc 899
|||||
tabaco:    100861  gttgacagataagtcacccttactgccactctacagaaccgtacatgagattttcacctc 100920

LCV1:      900      atacggctcctcgttcaattctttcgaagttattggatcctttccgcgttcgagaatcc 959
|||||
tabaco:    100921  atacggctcctcgttcaattctttcgaagttattggatcctttccgcgttcgagaatcc 100979

LCV1:      960      cctcccttcttccactccgtcccgaagagtaactaggaccaatttagtcacgttttcatg 1019
|||
tabaco:    100980  cc-ccttcttccactccgtcccgaagagtaactaggaccaatttagtcacgttttcatg 101038

LCV1:      1020     ttccaattgaacactttccgttttt-----
|||||
tabaco:    101039  ttccaattgaacactgtccatttttgattattctcaaaggataa 101082

LCV1:    1045      gattattctctttaccaaacatatgcggatccaatcacgatcttata----ataagaaca 1100
|||||
tabaco:    101083  gattattctctttaccaaacatatgcggatccaatcacgatcttataataagaagaaca 101142

LCV1:    1101      agagatctttctcgatcaatccccttgccctcattctctcgagaatcagaaagatccttt 1160
|
tabaco:    101143  aaagatctttctcgatcaatccccttgccctcattctctcaagaataagggaagatccttt 101202

LCV1:    1161      tcaagtttgaatttggtcatttggaatctgagttcttctacttcattattttatataat 1220
|||||
tabaco:    101203  tcaagtttgaatttggtcatttggaatctgagttcttctacttcattattttatataat 101261

LCV1:    1221      caatatattttgcctctcttttttttatattatcttacttaagtcoccataggtttgatccttt 1280
|||||
tabaco:    101262  gaatatatttc-cctctcttttttttatatcattccttaagtcoccataggtttgatcctgt 101320

LCV1:    1281      agaattggactcattttctcattgagcggaagggtacgaaataaatcagattgattaaaag 1340
|||||
tabaco:    101321  agaatttgaccattttctcattgaacgaaagggtacgaaataaatcagattgat-aaaag 101379

```

Fig. 3-3

(continuación)

```

LCV1: 1341 cactatgtgaaatattcggttttt-----tcctcttccctctatcccataggt-----aca 1390
      || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101380 taccatgtgaaatcttcggtttttcccttccctcgatcccatcccataggttaggtaca 101439

LCV1: 1391 gtgtttgaatcaatcgagaaccttttcttctgtctgaatcgatattattccattccaatt 1450
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101440 gtgtttgaatcaatagagaaccttttcttctgtatgaatcgatattattccattccaat 101499

LCV1: 1451 ccttcccgatacctctcaagaaaaatctcgaatt-ggatccctaaattgacgggttagtgt 1509
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101500 ccttcccgatacctcccaagaaaaatctcgaatttggaatcccaattgacgggttagtgt 101559

LCV1: 1510 gagcttatccatgcggttatgcactcttcgaataggaatccattttctgaaagatcctgg 1569
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101560 gagcttatccatgcggttatgcactctttgaataggaatccgttttctgaaagatcctgg 101619

LCV1: 1570 ctttcgtgctttgggtgggtctccgagatcctttcgatgacctatgttggtttgttgaag 1629
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101620 ctttcgtactttgggtgggtctccgagatcctttcgatgacctatg-----ttgaag 101670

LCV1: 1630 ggatatctatataatacgcgatcgattgcgtaaaagcccgcggtagcagtggaacgggggaaa 1689
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101671 ggatatctatctaatacgcgatcgattgcgtaaaagcccgcggtagcaacgggaacgggggaaa 101730

LCV1: 1690 gtatacagaaaagacagttcttttctattatat 1722
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101731 gtatacagaaaagacagttcttttctattatat 101763

LCV1: 1723 attatattagtccttttctatttaattc 1749
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101764 tagta ttttctattatattaagatatattagactatt 101799

LCV1: 1750 atattagattagtccttagtttagtgatcccggttagtgagtcctttcttccgtgatgaac 1809
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101800 atattagattagttattagtttagtgatcccgacttagtgagtc-----tgatgaat 101849

LCV1: 1810 tgttggcgccagtcctacattttgtctctgtggacagaggagaaaaggggctccgcggga 1869
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101850 tgttggcaccagtcctacattttgtctctgtggacgaggagaaaaggggctccgcggga 101909

LCV1: 1870 agaggattgtaccgtgagagaagcaaggaggtcaacctctttcaaatacatacatggat 1929
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101910 agaggagtgtagcatgagagaagcaaggaggtcaacctctttcaaatacatacatggat 101969
      127 ^^^ I Y L M S

LCV1: 1930 tctggcaatgcaatgtacttggactctcatgtcgatccgaatgaatcatcctttccacgg 1989
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
tabaco: 101970 tctggcaatg-----tagttggactctcatgtcgatccgaatgaatcatcctttccacgg 102024
      123 E P L T T P S E H R D S H I M R E V S

```

Fig. 3-4

(continuación)

LCV1:	1990	aggcaaatctttgcctgttaggtaacaggatagcaagttacaaactctgtctcggtagga	2049
tabaco:	102025	aggtaaactctttgcctgttaggcaagaggatagcaagttccaaactctgtctcggtagga	102084
proteína hipotética	88	T F R Q R S F L L I A L E L N Q R F L V	
LCV1:	2050	catggatctctattactatgaatttcataaatgaagtagtgaatgggtgggttaccatta	2109
tabaco:	102085	catgtatttctattactatgaatttcataaatgaagtagtgaatgggtgggttaccatta	102144
proteína hipotética (SEQ ID NO:5)	1	M K F I N E V V N G R V T I	
proteína hipotética	68	H I E I V I F N M F S T T L P L T V M I	
LCV1:	2110	tcctttttgtagtacgaatcctgtatgtgttcctaagaaaaggaaatttgatcttttc	2169
tabaco:	102145	tcctttttgtagtacgaatcctgtatgtgttcctaagaaaaggaaatttgatcttttc	102204
proteína hipotética	15	I L F V V T N L V C V P K K R N L S I F	
proteína hipotética	48	R K T T V F R T H T G L F L F K D M K R	
LCV1:	2170	gggatctcaaaggagcgtggaaacacataagaactccttgaatggaatggaaaagagatg	2229
tabaco:	102205	gggtctcaaaggcgtggaaacgcataagaactcctg-----aatggaaaagagatg	102258
proteína hipotética	35	R G L K G A W K R I R T L E W K R D	
proteína hipotética	35	P R L P A H F R M L V R S H F L S T	
LCV1:	2230	gaactccagttccttcggaatggtaagatccttggcgcaaaaaagggttgatccgta	2289
tabaco:	102259	taactccagttccttcg-----	102275
proteína hipotética	24	V G T G E	
proteína hipotética	53	V T P V P S	
LCV1	2290	tcactcttgacttggttctgcttctctatttttttaataataccgggtcggttcttctc	2349
Tabaco:		-----	
LCV1	2350	ctaccogtatcgaaatagaacacgctgagccaaatcttcttcatgtaaaacctgcttgatt	2409
Tabaco:		-----	
LCV1	2410	tagatcgggaaaaatcgtgtggttttatgaaccatgtgctatggcto	2456
Tabaco:		-----	
LCV1:	2457	gaatccgtagtcaatcctatttccgatagggacagttgacaactgaatcctatttt-ccc	2515
tabaco:	102276	gaatcggtagtcaatcctatttccgatagggcagttgacaattgaatcctattttgacc	102335
proteína hipotética	6	S D T T L G I E S L P L Q C N F G I K V	
proteína hipotética	59	E S V V N P I S D R G S ^^^	
LCV1:	2516	attattttcatatccgtaaatagtcgcaaaaaaagatttaattaaggcgccg	2567
tabaco:	102336	attattttcatatccgtaaatagtcgcaaaaga-----	102367
proteína hipotética	1	M I K M	

Fig. 3-5

(continuación)

LCV1:	2568	aggcccgcccccaagttgttcaagaatagtgctggttgagtttctcgaccctttgccttag	2627
tabaco:	102368	aggcccggtccaagttgttcaagaatagtggttgagtttctcgaccctttgacttag	102427
LCV1:	2628	gattaatcagttctatttctcgatggggcagggaaaggatataactcaccggtagagt	2687
tabaco:	102428	gattagtcagttctatttctcgatgggg-cggggaaggatataactcagcggtagagt	102486
LCV1:	2688	tcacccttgacgtggtggaagtcacagttcgagcctgattatccctaaccacaatgtga	2747
tabaco:	102487	tcacc-ttgacgtggtggaagtcacagttcgagcctgattatccctaaggccaatgtga	102545
LCV1:	2748	gttttgatattttgatttgcaccccgccgtgattgaatgagaatggataagaggctcgt	2807
tabaco:	102546	gtttttctagttgatttgcaccccgccgtcgttcaatgagaatggataagaggctcgt	102605
LCV1:	2808	gggattgacgtgagggggcagggatggctatatatttctgggagcgaactccgggcgaatat	2867
tabaco:	102606	gggattgacgtgagggggcagggatggctatatatttctgggagcgaactccgggcgaatat	102665
LCV1:	2868	gaagcgcagtgatgatacaagtttaggccttggaatgaaagacaattccgaatccgctttgtct	2927
tabaco:	102666	gaagcgcagtgatgatacaagtttaggccttggaatgaaagacaattccgaatccgctttgtct	102725
LCV1:	2928	acgaacaaggaagctataagtaaatgcaactatgaatctcatggagagttcgatcctggct	2987
tabaco:	102726	acgaacaaggaagctataagtaaatgcaactatgaatctcatggagagttcgatcctggct	102785
LCV1:	2988	caggatgaacgctggcgcatgcttaacacatgcaagtcggacgggaagtgggtgttcca	3047
tabaco:	102786	caggatgaacgctggcgcatgcttaacacatgcaagtcggacgggaagtgggtgttcca	102845
LCV1:	3048	gtggcggacgggtgagtaacgcgtaagaacctgcccttgggaggggaacaacagctggaa	3107
tabaco:	102846	gtggcggacgggtgagtaacgcgtaagaacctgcccttgggaggggaacaacagctggaa	102905
LCV1:	3108	acggctgctaatacccgtaggctgaggagcaaaaggaggaatccgcccgaggagggct	3167
tabaco:	102906	acggctgctaatacccgtaggctgaggagcaaaaggaggaatccgcccgaggagggct	102965
LCV1:	3168	cgcgtctgattagctagttggtgaggtaatagcttaaccaaggcgatgatcagtagctggt	3227
tabaco:	102966	cgcgtctgattagctagttggtgaggtcaatagcttaaccaaggcgatgatcagtagctggt	103025
LCV1:	3228	ccgagaggatgatcagccacactgggactgagacacggccagactcctacgggaggcag	3287
tabaco:	103026	ccgagaggatgatcagccacactgggactgagacacggccagactcctacgggaggcag	103085
LCV1:	3288	cagtggggaattttccgcaatgggcgaaagcctgacggagcaatgccgcgtggaggtaga	3347
tabaco:	103086	cagtggggaattttccgcaatgggcgaaagc-tgacggagcaatgccgcgtggaggtaga	103144

Fig. 3-6

(continuación)

```

LCV1: 3348 aggccccacgggtcatgaacttcttttcccgagaagaagcaatgacggatatctggggaat 3407
|||||
tabaco: 103145 aggccccacgggtcgtgaacttcttttcccgagaagaagcaatgacggatatctggggaat 103204

LCV1: 3408 aagcatcggctaactctgtgccagcagccggttaatacagaggatgcaagcgttatccg 3467
|||||
tabaco: 103205 aagcatcggctaactctgtgccagcagccggttaatacagaggatgcaagcgttatccg 103264

LCV1: 3468 gaatgattggcgtaaacgctctgtaggtggctttttaagtcgcccgtcaaatcccagg 3527
|||||
tabaco: 103265 gaatgattggcgtaaacgctctgtaggtggctttttaagtcgcccgtcaaatcccagg 103324

LCV1: 3528 ctcaactctggacagggcggtgaaactaccaagctggagtacggtaggggcagagggaat 3587
|||||
tabaco: 103325 ctcaaccctggacagggcggtgaaactaccaagctggagtacggtaggggcagagggaat 103384

LCV1: 3588 ttccggtggagcggtgaaatgcgtagagatcggaagaacaccaacggccaaagcactct 3647
|||||
tabaco: 103385 ttccggtggagcggtgaaatgcgtagagatcggaagaacaccaacggccaaagcactct 103444

LCV1: 3648 gctgggcccacactgacactgagagacgaaagctaggggagcgaatgggattagataccc 3707
|||||
tabaco: 103445 gctgggcccacactgacactgagagacgaaagctaggggagcgaatgggattagataccc 103504

LCV1: 3708 cagtagtcctagccgtaaacgatggatactaggcgctgtgctatcgaccgtgcagtgc 3767
|||||
tabaco: 103505 cagtagtcctagccgtaaacgatggatactaggcgctgtgctatcgaccgtgcagtgc 103564

LCV1: 3768 ttagctaacgcgttaagtatcccgctggggagtagcttgcgaagaatgaaactcaaag 3827
|||||
tabaco: 103565 ttagctaacgcgttaagtatcccgctggggagtagcttgcgaagaatgaaactcaaag 103624

LCV1: 3828 gaattgacggggggccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgatgcaaagcgaag 3887
|||||
tabaco: 103625 gaattgacggggggccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgatgcaaagcgaag 103684

LCV1: 3888 aaccttaccagggttgacatgccgcgaatcctcttgaaagagaggggtgccttcgggaa 3947
|||||
tabaco: 103685 aaccttaccagggttgacatgccgcgaatcctcttgaaagagaggggtgccttcgggaa 103744

LCV1: 3948 cgcggacacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgccgtaaggtgttggttaagtc 4007
|||||
tabaco: 103745 cgcggacacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgccgtaaggtgttggttaagtc 103804

LCV1: 4008 ccgcaacgagcgcacccctcgtgttagttgccatcattgagtttggaaccctgaacaga 4067
|||||
tabaco: 103805 ccgcaacgagcgcacccctcgtgttagttgccatcattgagtttggaaccctgaacaga 103864

LCV1: 4068 ctgccggtgataagccggaggaaggtgaggatgacgtcaagtcacatgccocttatgcc 4127
|||||
tabaco: 103865 ctgccggtgataagccggaggaaggtgaggatgacgtcaagtcacatgccocttatgcc 103924

```

Fig. 3-7

(continuación)

```

LCV1:  4128  ctggcgacacacgtgctacaatggccgggacaaagggtcgcgatcccgcgagggtgagc 4187
|||||
tabaco: 103925 ctggcgacacacgtgctacaatggccgggacaaagggtcgcgatcccgcgagggtgagc 103984

LCV1:  4188  taacccccaaaaaccgtcctcagttcggattgcaggctgcaactcgctgcatgaagccg 4247
|||||
tabaco: 103985 taacccccaaaaaccgtcctcagttcggattgcaggctgcaactcgctgcatgaagccg 104044

LCV1:  4248  gaatcgctagtaatcgccggtcagccatacggcgggtgaatccgttcccgggccttgtaga 4307
|||||
tabaco: 104045 gaatcgctagtaatcgccggtcagccatacggcgggtgaatccgttcccgggccttgtaga 104104

LCV1:  4308  caccgcccgtcacactatgggagctggccatgcccgaagtcgttaccttaaccgcaagga 4367
|||||
tabaco: 104105 caccgcccgtcacactatgggagctggccatgcccgaagtcgttaccttaaccgcaagga 104164

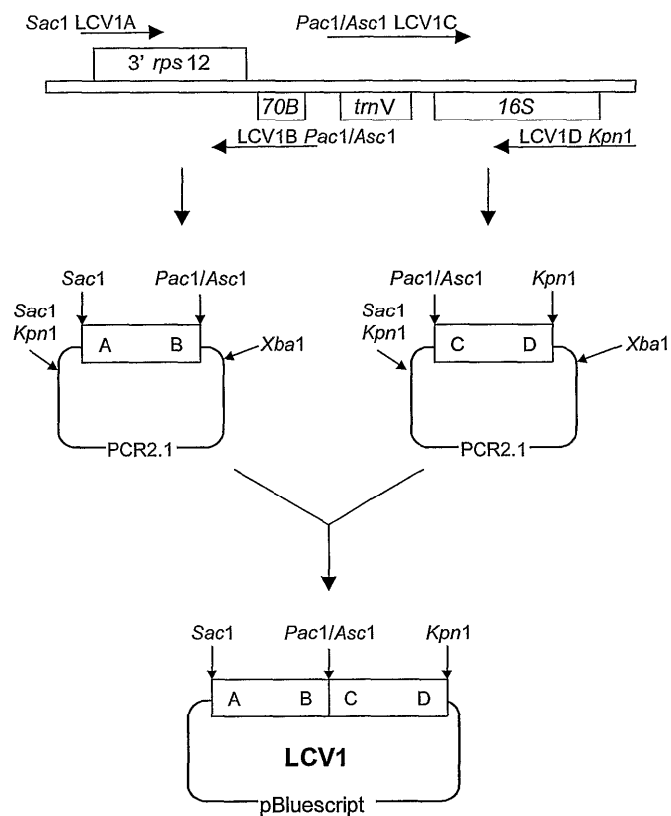
LCV1:  4368  gggggatgccgaaggcagggttagtgactggagtgaaagtcgtaacaaggtagccgtactg 4427
|||||
tabaco: 104165 gggggatgccgaaggcagggttagtgactggagtgaaagtcgtaacaaggtagccgtactg 104224

LCV1:  4428  gaaggtgcggctggatcacctccttttcaggagagctaagcttggtgggtattttggt 4487
|||||
tabaco: 104225 gaaggtgcggctggatcacctccttttcaggagagctaagcttggtgggtattttggt 104284

LCV1:  4488  ttgacactgcttcacaccc-----aaaaaagaaggagctacgtctgagttaaacttgag 4543
|||||
tabaco: 104285 ttgacactgcttcacaccccaaaaaaagaaggagctacgtctgagttaaacttgag 104344

LCV1:  4544  atggaagtcttcatttcgtttctcgacagtgaagtaagaccaag 4587
|||||
tabaco: 104345 atggaagtcttc-tttcctttctcgacggtgaagtaagaccaag 104387

```



LCV1A-5' ATGAGCTCGTTCAAGAATCAGTTTTCCTT3' (100021-100040 en TCG) (SEQ ID NO:6)
 LCV1B-5' GCGCGCCTTAATTAACTCTTTTTTTCGCACTATTACGGATAT3' (102345-102367 en TCG)
 (SEQ ID NO:7)
 LCV1C-5' TTAATTAAAGCGCGCCAGGCCCGGCCCAAGTT3' (102368-102384 en TCG) (SEQ ID NO:8)
 LCV1D-5' ATGGTACCCTTGCTTACTTCACTGTCA3' (104366-104387 en TCG) (SEQ ID NO:9)

Fig. 4

Fig. 5

SEQ ID NO:10

TCGACAGTGAAGTAAGACCAAGCTCATGAGCTTATTATCTCAGGTTCGGAACAAGTTGATAGGATCCCCCTTTT
 ACGTCCCCATGCCCCCTGTGTGGCGACATGGGGGCGAAAAAGGAAAGAGAGAGATGGGGTTTCTCTCGCTTTT
 GGCATAGTGGGCCCCAGTGGGGGCTCGCACGACGGGCTATTAGCTCAGTGGGTAGAGCGGCCCTGATAAT
 TGGCTCGTTGTGCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACATGGATAGTTCAATGTGCTCATCGGCGCTGACCCCT
 GAGATGTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTACTCCTCCTGTTTCAACCGGGGTTTGAACCAAACTTC
 TCCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTGAGGTGAGATCCAATGTAGATCCAACCTTCGATTCACCTCGTGGGATCC
 GGGCGGTCCGGGGGGGACCACCATGGCTCCTCTCTCGAGAATCCATACATCCCTTATCAGTGTATGGACAG
 CTATCTCTCGAGCACAGGTTTAGGTTTCGGCTCAATGGGAAAAATAAATGGAGCACCTAACAACGCATCTTCAC
 AGACCAAGAACTACGAGATCACCCCTTTCATTCTGGGGTGACGGAGGGATCATACCATTTCGAGCCTTTTTTTTT
 CATGCTTTTCCCCGAGGTCTGGAGAAAGCTGAAATCAATAGGATTTCCCTAATCCTCCCTTACCGAAAGGAAGA
 GCGTGAAATCTTTTCTTCCGAGGGACAGGAGATTGGATCTAGCCGTAAGAAGATGCTTGGTATAAAT
 AACTCACTTCTTGGTCTTCGACCCCGCAGTCACTACGAACGCCCCCGATCAGTGAATGGGATGTGCTATTT
 ATCTATCTCTTGACTCGAAATGGGAGCAGGTTTGAAGAAGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGT
 CTCTTAACGCCTTCTTTTTCTTCTCATCGGAGTTATTTACAAAGACTTGCCATGGTAAGGAAGAAGGGGGGA
 ACAGGCACACTTGGAGAGCGCAGTACAACGGAGAGTTGTATGCTGCGTTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCCGAAA
 AGGAATCTATTGATCTCTCCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTCACGGGCGAGGTCTCTGGT
 TCAAGTCCAGGATGGCCCGAGTGCGCCAGGGAAAAAGAAATAGAAGAAGCGTCAGACTATTAATTAAGGCCGCC
 ATGCATGCTCCACTTGGCTCGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAGAGCTCCGCTCTTGCAATTTGGGTCGTTGCGA
 TTACGGGTTGGATGTCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTACCTGAACCGGTGGCTCACTTTTTCT
 AAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACATGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAAGATGGGCTGTCAAGAACGTC
 AAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCAGTTGGTCAGATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAGTCG
 GCGGCTCTCTAGGGTTCCCTTATCGGGGATCCCTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGAT
 GCACTATCTCCCTTCAACCCCTTGAAGCAATGCGGCAAAAGGAAGGAAATCCATGGACCGACCCCATCATCT
 CCACCCCGTAGGAACACGAGATTACCCCAAGGACGCCTTCGGCATCCAGGGGTACGGACCGACCATAGAACC
 CTGTTCAATAAGTGGAAACGCATTAGCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGCAGTAAGGGTCGGAGAAGGGCAATCACTC
 ATTCTTAAACCAGCGTCTTAAAGGCCAAAGAGTCGGCGGAAAAGGGGGAAAGCTCTCCGTTCCTGGTTTCCT
 GTAGCTGGATCCTCCGGAACCACAAGAATCTTAGTTAGAATGGGATCCAACCTCAGCACCTTTTGTAGTGAAT
 TTTGAGAAGAGTTGCTCTTTGGAGAGCACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTTCGGGGGGGAGTTATTGTC
 TATCGTTGGCCTCTATGGTAGAATCAGTCGGGGGACCTGAGAGGCGGTGGTTTACCCTGCGGCGGATGTCAGCG
 GTTCGAGTCCGCTTATCTCCAACCTCGTGAACCTAGCCGATACAAAGCTATATGACAGCACCAATTTTCCGAT
 TTGGCGGTTTCATCTATGATTTATCATTCATG

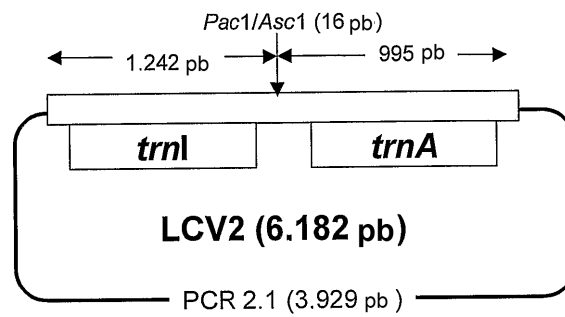


Fig. 6

(231 pb presentes en lechuga, maíz, arroz y soja pero no en tabaco)

Fig. 7-2

(continuación)

```

LCV2 : 896      tcttgactcgaaatgggagcaggtttgaaaaaggatcttagagtgtctagggttgggcca 955
                |||
tabaco: 105022  tcttgactcgaaatgggagcaggtttgaaaaaggatcttagagtgtctagggttgggcca 105081

LCV2 : 956      ggagggtctcttaacgccttctttttcttctcatcggagttatttcacaaagacttgcc 1015
                |||
tabaco: 105082  ggagggtctcttaacgccttctttttcttctcatcggagttatttcacaaagacttgcc 105141

LCV2 : 1016     atggtaaggaagaagggggaacaggcacacttgagagcgcagtagacaacggagagttgt 1075
                |
tabaco: 105142  agggtaaggaagaagggggaacaggcacacttgagagcgcagtagacaacggagagttgt 105201

LCV2 : 1076     atgctcgcttcgggaaggatgaatcgctcccgaaaaggatctattgattctctcccaat 1135
                |||
tabaco: 105202  atgctcgcttcgggaaggatgaatcgctcccgaaaaggatctattgattctctcccaat 105261

LCV2 : 1136     tggttggaccgtaggtgcatgatatttacttcacgggaggtctctggttcaagtccagg 1195
                |||
tabaco: 105262  tggttggaccgtaggtgcatgatatttacttcacgggaggtctctggttcaagtccagg 105321

LCV2 : 1196     atggcccagctgcgccagggaagaatagaagaagcgtcagactccttaattaaggcgccg 1258
                |||
tabaco: 105322  atggcccagctgcgccagggaagaatagaagaagcgtcagactccttaattaaggcgccg 105370

LCV2 : 1259     catgcatgctccacttggctcggggggatagctcagttggtagagctccgctcttgca 1318
                |||
tabaco: 105371  catgcatgctccacttggctcggggggatagctcagttggtagagctccgctcttgca 105430

LCV2 : 1319     attgggtcggttgcatgacgggttgatgtctaatgtccaggcggtaatgatagtatct 1378
                |||
tabaco: 105431  attgggtcggttgcatgacgggttgatgtctaatgtccaggcggtaatgatagtatct 105490

LCV2 : 1379     tgtacctgaaccggtggctcactttttctaagtaatggggaagaggaccgaaacatgcc 1438
                |||
tabaco: 105491  tgtacctgaaccggtggctcactttttctaagtaatggggaagaggaccgaaacatgcc 105550

LCV2 : 1439     ctgaaagactctactgagacaaagatgggctgtcaagaacgtcaagaacgtagaggaggt 1498
                |||
tabaco: 105551  ctgaaagactctactgagacaaagatgggctgtcaagaacgtcaagaacgtagaggaggt 105601

LCV2 : 1499     aggatgggcagttggtcagatctagtagtgatogtacatggacggtagttggagtcggcg 1558
                |||
tabaco: 105602  aggatgggcagttggtcagatctagtagtgatogtacatggacggtagttggagtcggcg 105661

LCV2 : 1559     gctctctaggggtcccttatcggggatccctggggaagaggatcaagttggcccttgcg 1618
                |||
tabaco: 105662  gctctccagggtccctcatctgagatctctggggaagaggatcaagttggcccttgcg 105721

LCV2 : 1619     aacagcttgatgcactatctccctcaaccctttgagcgaaatgcggc-----aaaagga 1673
                |||
tabaco: 105722  aacagcttgatgcactatctccctcaaccctttgagcgaaatgcggc-----aaaagga 105781

```

Fig. 7-3

```

(continuación)
LCV2 : 1674   aggaaaatccatggacgcaccccatcatctccaccccgtaggaactacgagattacccca 1733
            |||
tabaco: 105782 aggaaaatccatggacgcaccccatcatctccaccccgtaggaactacgagatcacccca 105841

LCV2 : 1734   aggacgccttcggcatccaggggtcacggaccgaccatagaaccctgttcaataagtgga 1793
            |||
tabaco: 105842 aggacgccttcggcatccaggggtcacggaccgaccatagaaccctgttcaataagtgga 105901

LCV2 : 1794   acgcattagctgtccgctctcaggttgggcagtaagggtcggagaagggaatcactcat 1853
            |||
tabaco: 105902 acgcattagctgtccgctctcaggttgggcagtcagggtcggagaagggaatgactcat 105961

LCV2 : 1854   tctta 1858
            |
tabaco: 105962 t---- 105962

LCV21859aaaccagcgttcttaagccaaagagtcggcggaaggggggaaagctctccgttccgttcttctgtagctggatcctc
cggaaccacaagaatc 1955 (97 pb de secuencia ausente en tabaco pero presente en espinacas, Solanum nigrum,
Arabidopsis, soja, arroz y trigo)

LCV2 : 1956   cttagttagaatgggattccaactcagcaccttttgagtggagattttgagaagagttgct 2015
            |||
tabaco: 105963 cttagttagaatgggattccaactcagcaccttttgagtggagattttgagaagagttgct 106022

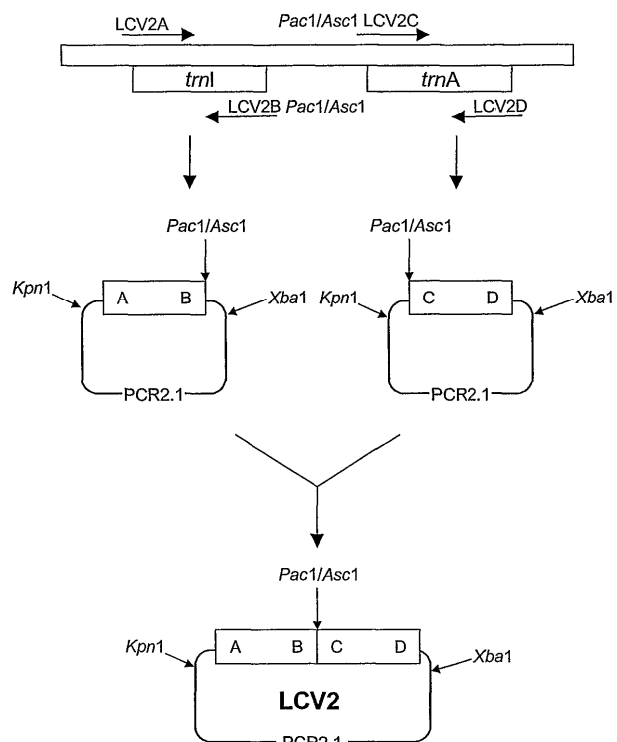
LCV2 : 2016   ctttgagagcacagtcagatgaaagttgtaagctgtgttcgggggggagttattgtcta 2075
            |||
tabaco: 106023 ctttgagagcacagtcagatgaaagttgtaagctgtgttcgggggggagttattgtcta 106082

LCV2 : 2076   tcgttggcctctatggtagaatcagtcgggggacctgagaggcggtggtttaccctgcgg 2135
            |||
tabaco: 106083 tcgttggcctctatggtagaatcagtcgggggacctgagaggcggtggtttaccctgcgg 106142

LCV2 : 2136   cggatgtcagcggttcgagtcogcttatctccaactcgtgaacttagccgatacaaaagct 2195
            |||
tabaco: 106143 cggatgtcagcggttcgagtcogcttatctccaactcgtgaacttagccgatacaaaagct 106202

LCV2 : 2196   atatgacagcacccaattttccgatttggcggttcgatctatgatttatcattcatg 2253
            |||
tabaco: 106203 ttatgatagcacccaattttccgatttggcggttcgatctatgatttatcattcatg 106260

```



LCV2A 5' TCGACAGTGAAGTAAGACCAAG3' (104366-104387 en TCG) (SEQ ID NO:13)
 LCV2B 5' GGCGCGCCTTAATTAAGGAGTCAGACGCTTCTTCTATTC3' (10346-105370 en TCG)
 (SEQ ID NO:14)
 LCV2C 5' TTAATTAAAGCGCGCCCATGTCATGCTCCACTTGGCTCGG3' (105371-105393 en TCG)
 (SEQ ID NO:15)
 LCV2D 5' CATGAATGATAAATCATAGATCGAAC3' (106234-106260 en TCG) (SEQ ID NO:16)

Fig. 8

Mapa de LCV1-MSK18 (9.682pb)

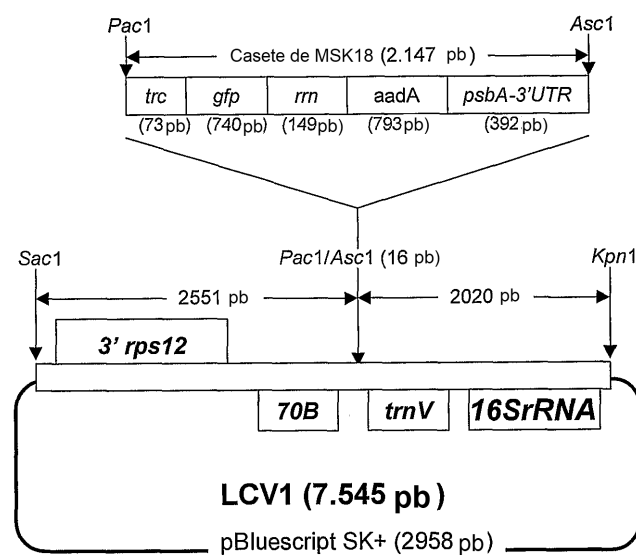


Fig. 9

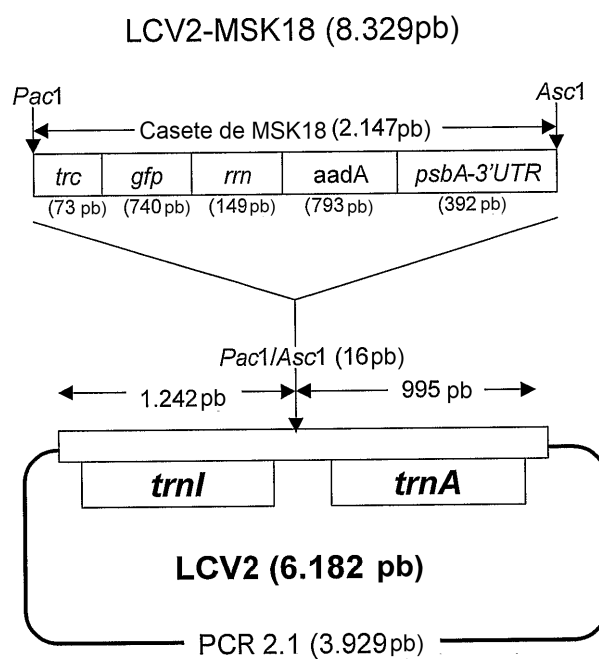
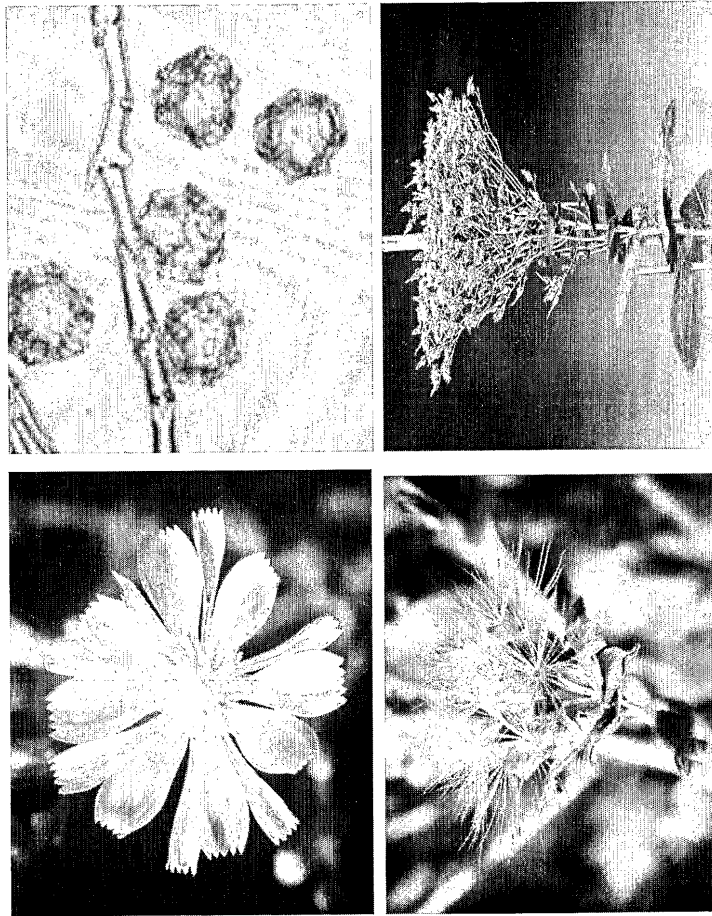
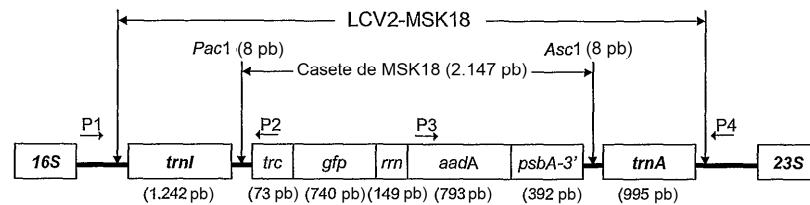


Fig. 10

Fig. 11





P1 + P2 = 1415 pb

P3 + P4 = 2006 pb

P1 + P4 = 4623 pb

P1 5'-ACTGGAAGGTGCGGCTGGAT-3' (SEQ ID NO:17)

P2 5'-ACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATTAATTAATA-3' (MSK18A comp) - (SEQ ID NO:18)

P3 5'-AAGTCACCATTTGTTGTGCACG-3' (comienza en 259 pb en la CDS de aadA) (SEQ ID NO:19)

P4 5'-CTCGCCCTTAATTTTAAGGC-3' (SEQ ID NO:20)

Fig. 12

Figura 13

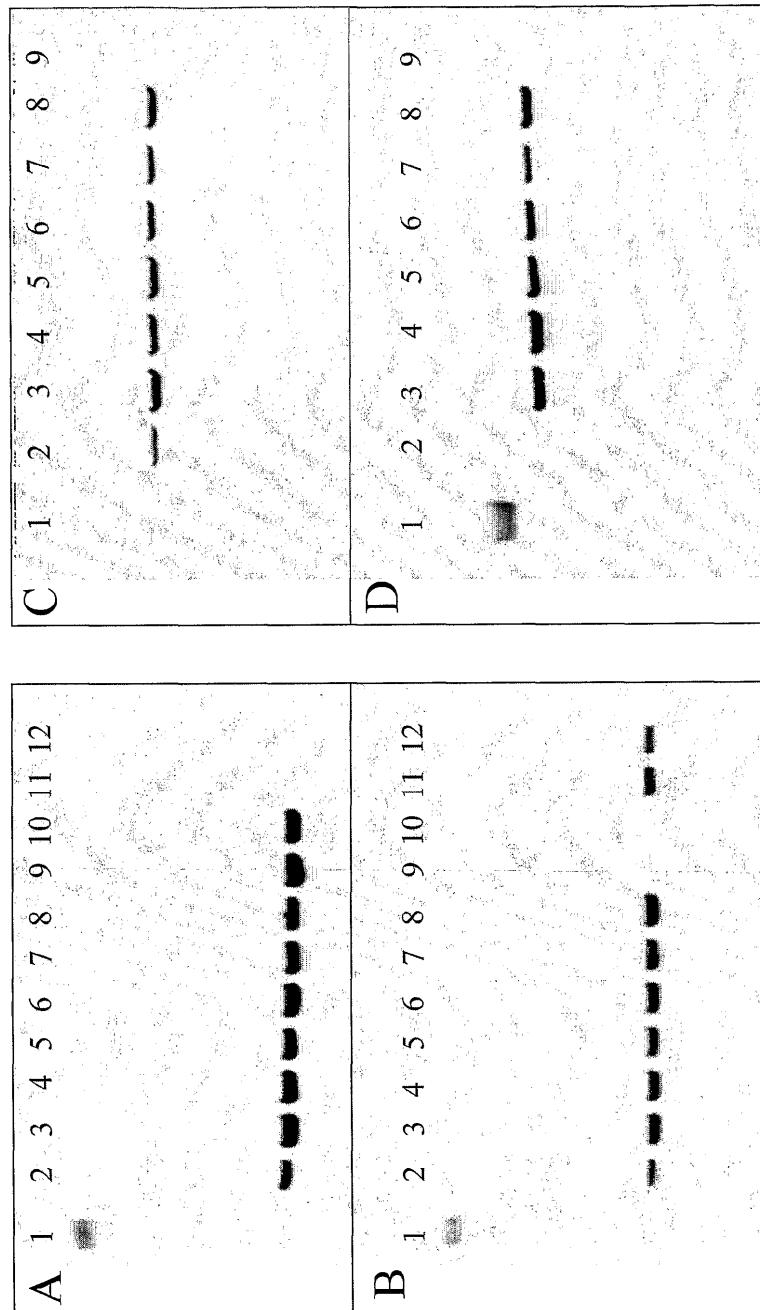


Fig. 14-1

Secuencia de consenso del fragmento del límite izquierdo P1-P2 (SEQ ID NO:21)

Cebador P1→

actggaaggtgcggtggatcacctccttttcaggagagctaatgcttgttgggtattttggtttgacac
tgcttcacaccccaaaaaaagaaggagctacgtctgagttaaacttgagatggaagtcttcatttcgtttc

Cebador LCV2A→=LCV2A límite izquierdo

TCGACAGTGAAGTAAGACCAAGCTCATGAGCTTATTATCTCAGGTCGGAACAAGTTGATAGGATCCCCCTT
TTTACGTCCCATGCCCTCTGTGTGGCGACATGGGGGCGAAAAAGGAAAGAGAGATGGGGTTTCTCTC
GCTTTTGGCATAGTGGGCCCCAGTGGGGGGCTCGCACGACGGGTATTAGCTCAGTGGGTAGAGCGGCC
CCTGATAAATTGCGTCGTGTGCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACATGGATAGTTCAATGTGCTCATCG
GCGCCTGACCCTGAGATGTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTACTCCTCCTGTTCGAACCGGGT
TTGAAACCAAACTTCTCCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTAGGTGAGATCCAATGTAGATCCAACCTTTC
GATTCACTCCTGGGATCCGGGCGGTCCGGGGGGGACCAACCATGGCTCCTCTCTTCTCGAGAATCCATACAT
CCCTTATCAGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAGGTTTCGGCTCAATGGGAAAATAAAATG
GAGCACCTAACAACGCATCTTCACAGACCAAGAACTACGAGATCACCCCTTTCATTCTGGGGTGACGGAGG
GATCATACCATTCGAGCCTTTTTTTTTCATGCTTTTCCCGAGGTCTGGAGAAAGCTGAAATCAATAGGAT
TTCCCTAATCCTCCCTTACCGAAAGGAAGAGCGTGAAATCTTTTTCTTTCCGAGGACACGAGATTG
GATCTAGCCGTAAAGAAATGCTTGGTATAAATAACTCACTTCTTGGTCTTCGACCCCGCAGTCACTACG
AACGCCCCCGATCAGTGCAATGGGATGTGTCTATTTATCTATCTCTTGACTCGAAATGGGAGCAGGTTTGA
AAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGTCTCTTAACGCCTTCTTTTTTCTTCTCATCGGA
GTTATTTCAAAAAGACTTGCCATGGTAAGGAAGAAGGGGGGAACAGGCACACTTGGAGAGCGCAGTACAAC
GGAGAGTTGTATGCTGCGTTGGGAAGGATGAATCGCTCCGAAAAGAACTATATGATTCTCTCCCAATT
GGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTCACGGGCGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATGGCCAGCTG

Pac1 trc | promotor → ←Cebador P2

CGCCAGGGAAAAGAATAGAAGAAGCGTCTGACTCC [TTAATTAA] [TTGACAATTAATCATCCGGCTCGT]**Secuencia de consenso del fragmento del límite izquierdo P3-P6 (SEQ ID NO:22)**

Cebador P3→ (gen aadA)

AAGTCACCATTTGTTGTCACGACGACATCATTCGGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGGAACTGCAATTTGGA
GAATGGCAGCGCAATGACATTTCTTGCAAGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTT
GCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCCTGGTAGGTCCAGCGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTC
CTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACTCGCCGCCGACTGGGCTGGC
GATGAGCGAAATGTAGTGTCTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCGAA
GGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGAC
AGGCTTATCTTGACAAGAAGAAGATCGCTTGCCCTCGCGCGAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTAC

aadA stop/psbA 3' UTR→

GTGAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCTAGAGCGATCCTGGCTAGTCTATAGGAGGT
TTTGAAAAGAAAGGAGCAGTAATCATTTTCTTGTCTATCAAGAGGGTGCTATTGCTCCTTCTTTTTTTC
TTTTTATTTATTTACTAGTATTTTACTTACATAGACTTTTTTGTTTACATTATAGAAAAAGAGGAGAGGT
TATTTTCTTGCAATTATTCATGATTGAGTATCTATTTGATTTTGTATTGTTTAAATTTAGAAATAG
AACTTGTCTCTCTTGTCTAATGTTACTATATCTTTTGTATTTTTCACAAAAAATAATCAATTTT
GACTTCTTCTTATCTTATCTTTGAATATCTTATCTTTGAAATAATAATATCATTGAAATAAGAAAGA

AacI

gen trnA →

AGAGCTATATTCTGA [GGCGCGCC] CATGCTGCTCCACTTGGCTCGGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAGA
GCTCCGCTCTTGCAATTGGGTCGTTGCGATTACGGGTTGGATGTCTAATTGTCCAGCGGTAATGATAGTA
TCTTGTACCTGAACCGGTGGCTCACTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACATGCCACTGAAAGA
CTCTACTGAGACAAAGATGGGCTGTCAAGAACGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCGATTGGTCAG
ATCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAGTCGGCGGCTCTCCTAGGGTTCCCTTATCGGGGATCC

Fig. 14-2

(continuación)

CTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGATGCACTATCTCCCTTCAACCCCTTTGAGCGAA
 ATGCGGCAAAAGGAAGGAAAATCCATGGACCGACCCCATCATCTCCACCCCGTAGGAACTACGAGATTACC
 CCAAGGACGCCTTCGGCATCCAGGGGTACGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATAAGTGGAACGCATTA
 GCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGCAGTAAGGGTCGGAGAAGGGCAATCACTCATTTCTAAAACCAGCGTCTT
 AAGGCCAAAGAGTCGGCGGAAAAGGGGGAAAGCTCTCCGTTCCCTGGTTTCTGTAGCTGGATCCTCCGGA
 ACCACAAGAATCCTTAGTTAGAATGGGATTCCAACCTCAGCACCTTTTGAGTGAGATTTTGAGAAGAGTTGC
 TCTTTGGAGAGCACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTTCGGGGGGGAGTTATGTCTATCGTTGGCCT
 CTATGGTAGAATCAGTCGGGGGACCTGAGAGGCGGTGGTTTACCCTGCGGCGGATGTCAGCGGTTTCGAGTC
 trnA final
 CGCTTATCTCCAACCTCGTGAACCTTAGCCGATACAAAGCTATATGACAGCACCCAATTTTCCGATTGGCG
 ←Cebador LCV2D = RB de LCV2
gttcgatctatgatttatcattcatggacggttgataaagatccatccatttagcagcaccttaggatggcat
 ←Cebador P6
agccttaaaattaaggcgag

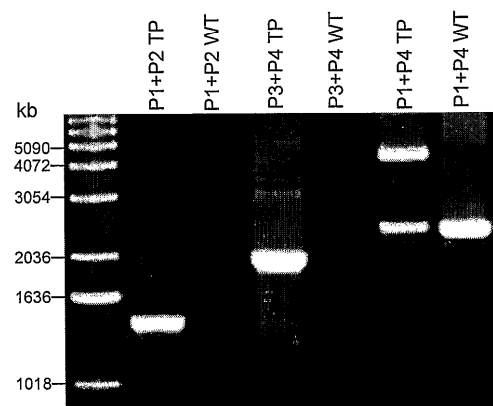


Fig. 15

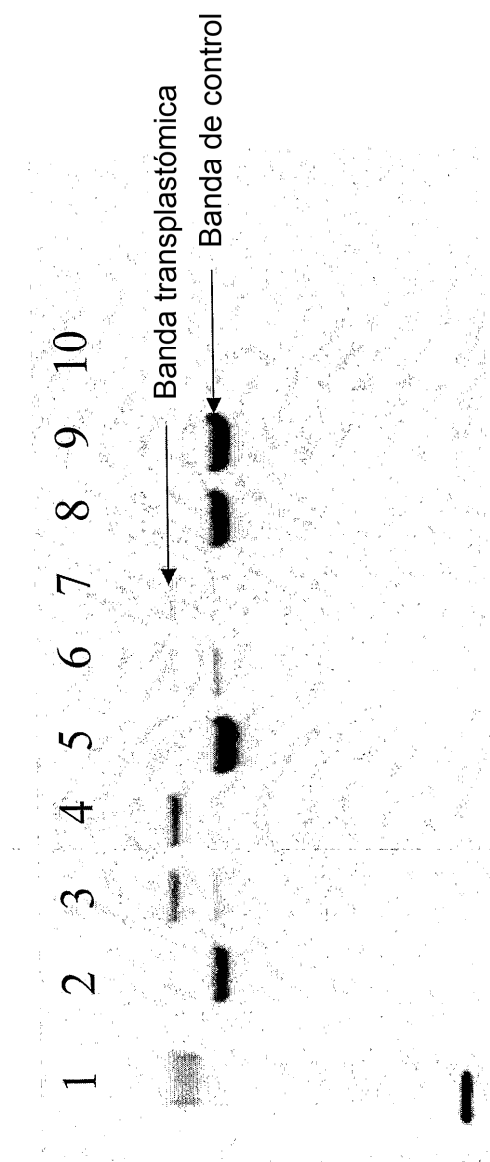


Fig. 16

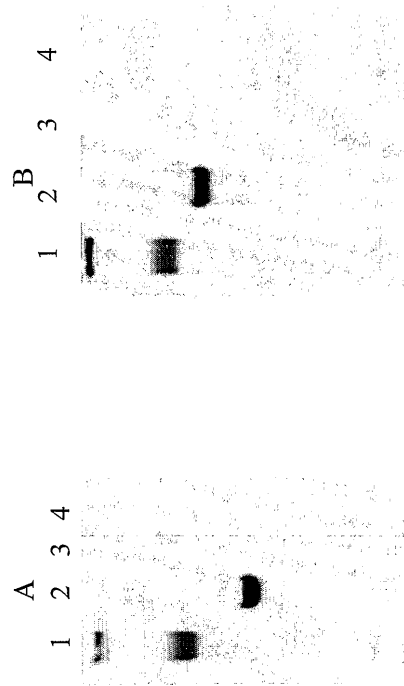
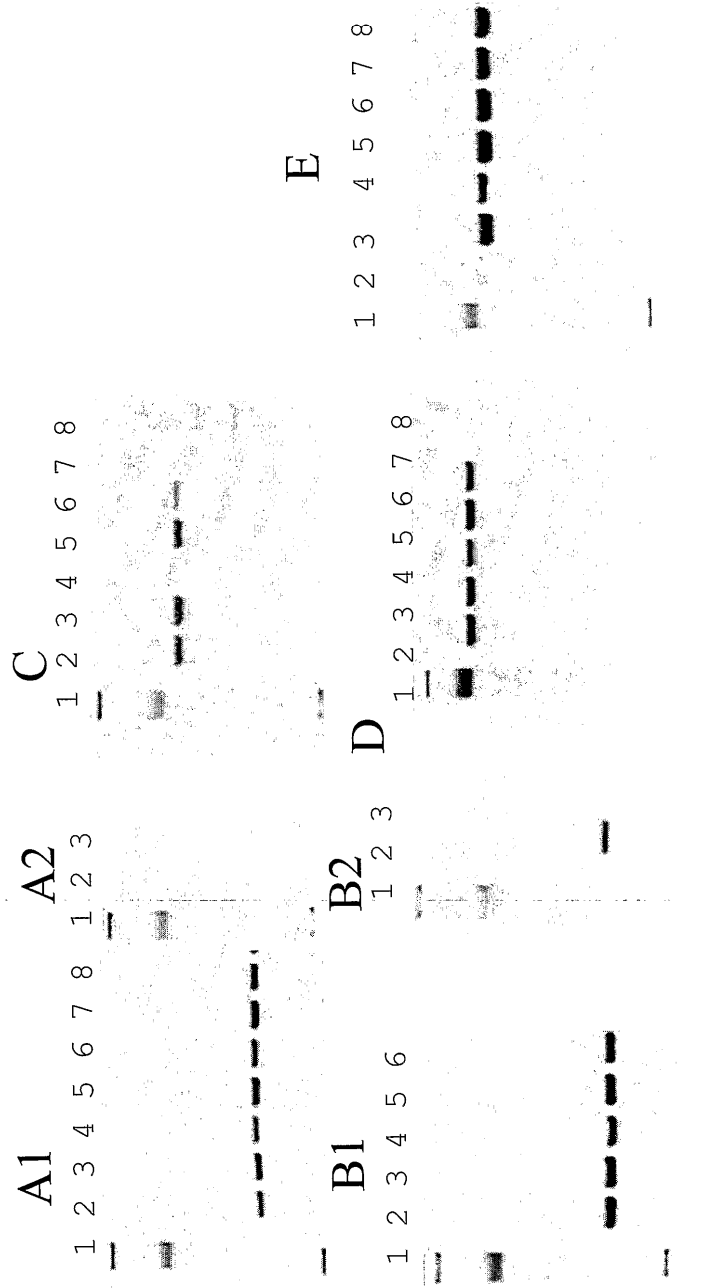


Fig. 17

Fig. 18



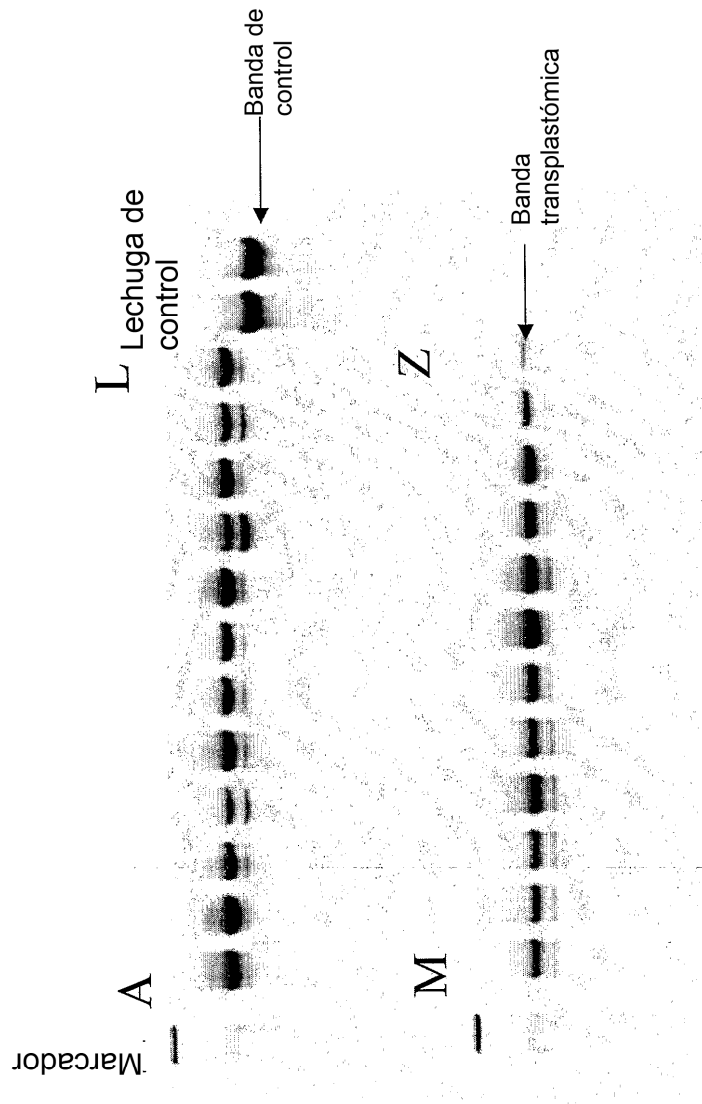


Fig. 19

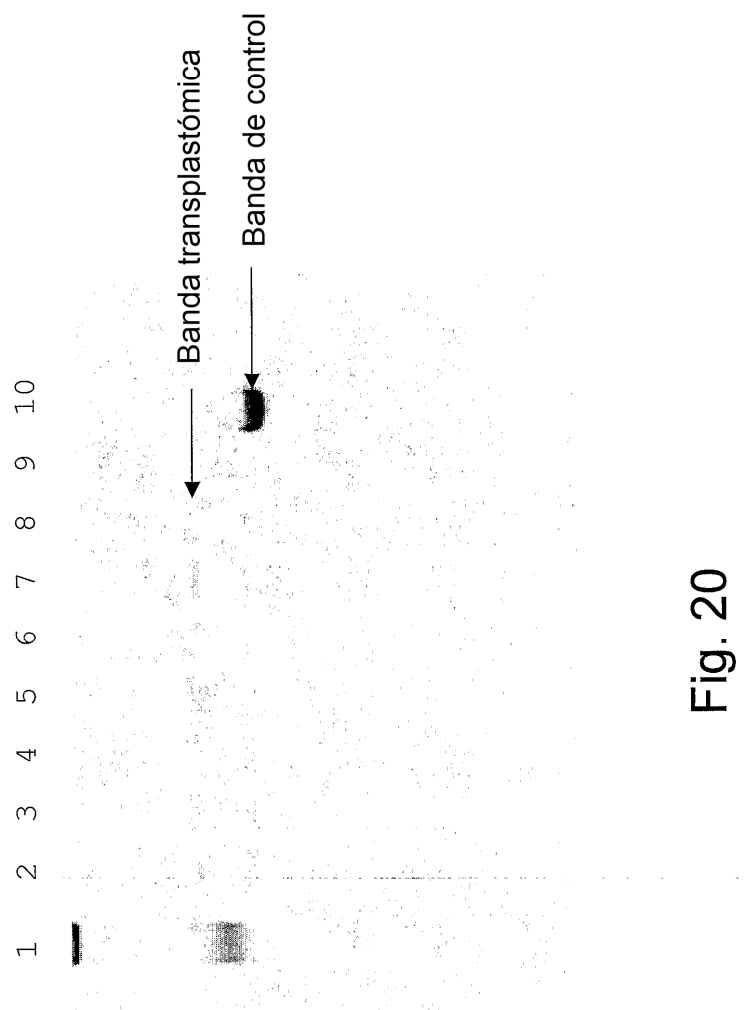


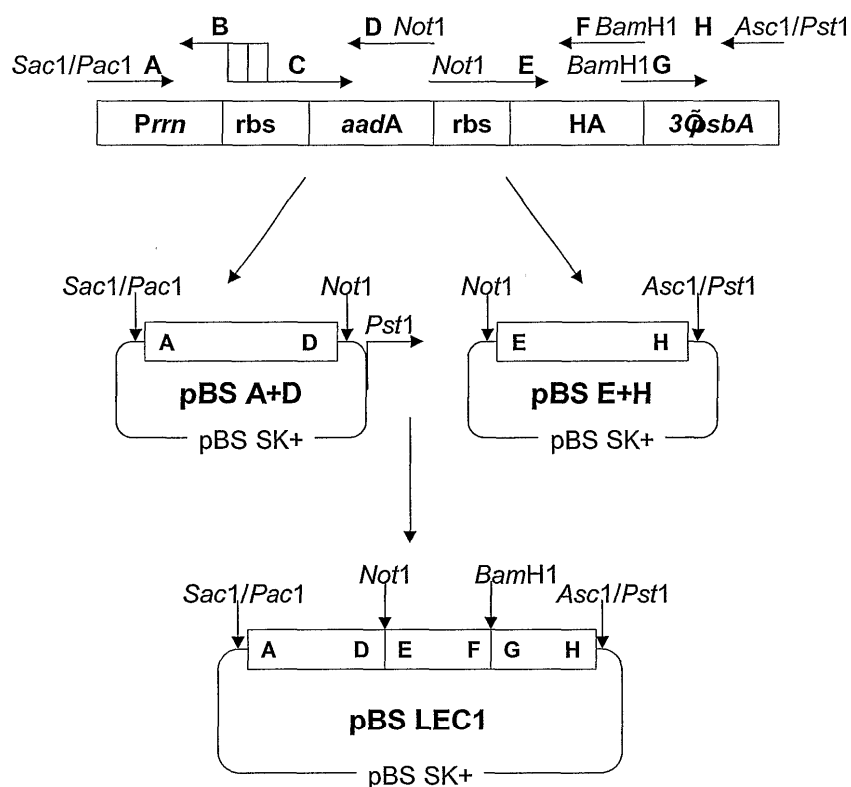
Fig. 20

Fig. 21

LEC1 (dicistrónico)



Construcción de LEC1



Lista de cebadores de PCR usados en la construcción de LEC1

LEC1 A	tcg agc tct taa tta agc tac ccc gcc gtc att gaa tga gaa t (SEQ ID NO:23)
LEC1 B	aaa tcc ctc cct aca act gta tcc aag cgc ttc gta ttc gc (SEQ ID NO:24)
LEC1 C	gtt gta ggg agg gat tta tgg cag aag cgg tga tcg ccg aa (SEQ ID NO:25)
LEC1 D	tcg cgg ccg ctt att tgc cga cta cct tgg tga t (SEQ ID NO:26)
LEC1 E	tcg cgg ccg cag ttg tag gga ggg att tat gca aaa act tcc cgg aaa tga caa (SEQ ID NO:27)
LEC1 F	gga tcc tta gta tcc tga ctt cag ctc aac (SEQ ID NO:28)
LEC1 G	aac att taa gga tcc gac ttt ggt ctt att gta att gta tag (SEQ ID NO:29)
LEC1 H	atc tgc agg gcg gcc atc cac ttg gct aca tcc gcc (SEQ ID NO:30)

Fig. 22