



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 231 029**

② Número de solicitud: 200302521

⑤ Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12R 1/77 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **23.10.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2005**

Fecha de la concesión: **14.06.2006**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2006**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.07.2006

⑦ Titular/es: **Universidad de Sevilla
Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES**

⑦ Inventor/es: **Ávalos Cordero, Javier y
Prado Cabrero, Alfonso**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Empleo de una mutación en el gen de la deshidrogenasa de fitoeno de *Fusarium fujikuroi* para producción de γ -caroteno y β -caroteno.**

⑦ Resumen:

Empleo de una mutación en el gen de la deshidrogenasa de fitoeno de *Fusarium fujikuroi* para producción de γ -caroteno y β -caroteno.

La presente invención describe una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO 3, la cual incluye el gen *carB36* del mutante SF21 de *Fusarium fujikuroi*, que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa. Dicho gen es empleado para la obtención de estirpes de *Fusarium* que acumulen gamma-caroteno y beta-caroteno como productos finales de la carotenogénesis, puesto que han perdido la capacidad de llevar a cabo la quinta desdeshidrogenación de la ruta biosintética al presentar una mutación en la deshidrogenasa que altera su capacidad para reconocer el gamma-caroteno como sustrato.

ES 2 231 029 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Empleo de una mutación en el gen de la deshidrogenasa de fitoeno de *Fusarium fujikuroi* para producción de γ -caroteno y β -caroteno.

La presente invención se refiere al aislamiento de una mutación en el gen que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa de *Fusarium fujikuroi* y a su utilización para obtener estirpes transformantes de hongos superproductores de carotenoides.

Estado de la técnica anterior

Los carotenoides son pigmentos liposolubles presentes en todas las especies fotosintéticas y en algunos microorganismos no fotosintéticos, como bacterias y hongos (Britton *et al.* 1998 Carotenoids, Vols 1,2 y 3 Basel: Birkhäuser Verlag; Sandmann *et al.* 2002 The Mycota X. Industrial applications, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp 247-262). En los animales, algunos carotenoides juegan un papel esencial como precursores del retinol (vitamina A) y el ácido retinoico, una importante señal reguladora celular. El consumo de carotenoides tiene además efectos beneficiosos en el hombre, protegiendo frente al daño oxidativo, el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (Mayne S.T.; FASEB J. 1996, 10: 690-701).

Las especies de hongos del género *Fusarium* tienen gran importancia aplicada por diversas causas. Muchas de ellas son patógenas de plantas, y sus procesos infectivos producen pérdidas en la Agricultura. Algunas de ellas tienen usos industriales. Así, *Fusarium fujikuroi* (nombre asignado a las estirpes del grupo de cruzamiento C de *Gibberella fujikuroi* por O'Donnell *et al.*, 1998) es usada para la producción industrial de giberelinas (Brückner *et al.*; 1989 Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors. Elsevier Applied Science). *Fusarium venenatum* se utiliza como fuente de micoproteína, material alimentario consistente en micelio compactado del hongo (Yoder *et al.*; Fungal Genet. Biol. 1998, 23: 62-80) sometido a un tratamiento de reducción en su contenido de ARN. El uso de esta especie con fines alimentarios proviene del estudio comparativo del contenido en proteína de unas tres mil especies de hongos (Wiebe M.G.; Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 58:421-427).

Fusarium fujikuroi, como otras especies de *Fusarium* (Avalos y Cerdá-Olmedo; Current Genetics 1987, 11: 505-511) adquiere una pigmentación anaranjada cuando se incuba en la luz debido a la acumulación de neurosporaxantina, un carotenoide sin aparente interés comercial con un grupo *carBoxilo* en el extremo (Aasen *et al.*; Acta Chem. Scand. 1965, 19: 1843-1853). Este carotenoide se sintetiza a partir de un precursor incoloro, el fitoeno, mediante cinco deshidrogenaciones, una ciclación y una rotura oxidativa. Estas reacciones se indican como D1 a D5, C1 y Ox respectivamente en la Figura 1 de los dibujos, que muestra la ruta biosintética de carotenoides en *Fusarium fujikuroi* (Avalos y Cerdá-Olmedo; Current Genetics 1987, 11: 505-511). Los genes responsables de la síntesis de fitoeno, las deshidrogenaciones y la ciclación han sido clonados y caracterizados en la estirpe silvestre IMI58289 (Linnemans-ton *et al.*; Mol. Genet. Genomics 2002, 267: 593-602). La secuencia del gen *carA* de esta estirpe está disponible en las bases de datos bajo el código de acceso AJ426418. Su expresión es reprimida por un gen regulador, cuya pérdida da lugar a un fenotipo de alta producción de carotenoides en cualquier condición de cultivo, incluyendo pequeñas cantidades de γ -caroteno y β -caroteno (Avalos y Cerdá-Olmedo; Current Genetics 1987, 11: 505-511). El γ -caroteno está presente como intermediario, ya que es el sustrato para la síntesis de toruleno (ver Figura 1), y el segundo es un producto lateral menor, resultante de la ciclación del otro extremo de la molécula. En dicha Figura 1 se destacan los dos productos mayoritarios en la carotenogénesis de *Fusarium* en un recuadro de trazo discontinuo.

No se han descrito mutantes de la carotenogénesis de *Fusarium* que tengan una deshidrogenasa capaz de hacer las cuatro primeras deshidrogenaciones (D1 a D4 en el esquema), pero que sean incapaces de hacer la quinta (D5). De existir, este mutante acumularía los carotenoides que se destacan en el recuadro de trazo continuo, es decir, γ -caroteno y β -caroteno.

Explicación de la invención

La presente invención describe un método genético que permite la obtención de estirpes de *Fusarium* que acumulen γ -caroteno y β -caroteno como productos finales de la carotenogénesis, puesto que han perdido la capacidad de llevar a cabo la quinta deshidrogenación de la ruta biosintética al presentar una mutación en la deshidrogenasa que altera su capacidad para reconocer el γ -caroteno como sustrato.

El método se ha desarrollado en una estirpe desregulada para la carotenogénesis llamada SF4, obtenida a partir de la estirpe SF1, la cual deriva a su vez de la estirpe silvestre FKMC1995.

SF1 es un mutante carente de actividad nitrato reductasa (genotipo *niaD4*), y su síntesis de carotenoides es normal. El fenotipo de SF4 (genotipo *niaD4 car-35*) es similar al de los mutantes superproductores de carotenoides (llamados *carS*) descritos anteriormente en este hongo, tales como el mutante SG22 (Avalos y Cerdá-Olmedo; Current Genetics 1987, 11: 505-511). El mutante SF4 se obtuvo a partir de esporas de SF1 siguiendo el protocolo de mutagénesis descrito por Avalos *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49: 187-191) basado en la incubación de conidios uninucleados en una solución del agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. La diferencia entre SF4 y SF1 radica en la cantidad de carotenos, no en su composición, ya que acumulan el mismo producto mayoritario, la neurosporaxan-

ES 2 231 029 B1

tina. En consecuencia, no se espera que el gen *carB* de estas estirpes posea ninguna mutación respecto al gen de la estirpe silvestre identificada como SEQ ID NO 1.

5 A partir de SF4, de pigmentación anaranjada, usando el protocolo de mutagénesis ya mencionado (Avalos *et al.*; Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49: 187-191), se identificó un mutante de pigmentación amarilla, al que se llamó SF21 (genotipo *niaD4 car-35 carB36*). El análisis por cromatografía en capa fina y HPLC de los carotenoides acumulados por SF4 y SF21 muestra la pérdida en SF21 de la neurosporaxantina y el toruleno y la presencia en su lugar de una mezcla de gamma-caroteno y beta-caroteno. El fenotipo del mutante indica que posee una mutación en la deshidrogenasa que altera su capacidad para reconocer el gamma- caroteno como sustrato y que, en consecuencia,
10 ha perdido la capacidad de llevar a cabo la quinta deshidrogenación de la ruta biosintética.

Se han determinado las secuencias del gen *carB* silvestre de FKMC1995 (SEQ ID NO 1), responsable de la deshidrogenasa, y del alelo *carB36* de SF21, identificado como SEQ ID NO 3. La comparación de ambas secuencias muestra que *carB36* difiere del alelo silvestre en una sola mutación a nivel de ADN y de un aminoácido a nivel de
15 proteína. En el caso de ADN se trata de una sustitución de una Citosina(C) que ha mutado a Timina(T) en el alelo *carB36*.

La SEQ ID NO 2 se corresponde con la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *carB* de la estirpe silvestre FKMC1995, mientras que la SEQ ID NO 4 se corresponde con la secuencia de aminoácidos de la
20 proteína codificada por el alelo *carB36* del mutante SF21.

Esta mutación, responsable del fenotipo descrito, se localiza en la posición 170 de la proteína, y consiste en la sustitución de la prolina presente en dicha posición en el gen silvestre por una serina.

25 La disponibilidad de un método de reemplazamiento génico para este hongo (Fernández-Martín *et al.*; Mol. Gen. Genet. 2000, 263: 838-845), permite la introducción de esta nueva versión de la deshidrogenasa en otras estirpes de *Fusarium*, y por lo tanto permitirá la obtención de estirpes transformantes de *Fusarium* y/o *Gibberella* superproductoras de gamma-caroteno y beta-caroteno.

30 La presencia del gen *carB36* identificado como SEQ ID NO 3 en transformantes de *Fusarium* y/o *Gibberella*, permite que el contenido en γ -caroteno y β -caroteno aumente desde un 5% a un 75% de los carotenoides acumulados por el hongo.

La secuenciación del alelo *carB* del mutante SF21 se hizo obteniendo por PCR dos veces de forma independiente
35 dos subsegmentos del gen:

- el primero, obtenido con los oligonucleótidos identificados por SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, es un segmento de 968 pb que abarca desde 11 bases antes del codón ATG de inicio hasta la mitad de la región codificante. Al hacer la amplificación por duplicado, se obtuvieron dos plásmidos pG4460C95a (3987 pb) y pG4460C95b (3987 pb);
40
- el segundo, obtenido con los oligonucleótidos identificados por SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, es un segmento de 1136 pb que incluye el resto de la región codificante de *carB* más 88 pb de la región no codificante, los plásmidos obtenidos fueron pG6769C95a (4155 pb) y pG6769C95b (4155 pb).
45

Debido a su baja tasa de mutación se usó para la amplificación por PCR el kit "Expand TM High fidelity PCR System" de Roche. Los productos se clonaron en el vector pGEM-T Easy de Promega (3018 pb) y se secuenciaron usando los oligos T7 y SP6.

50 Son por tanto objeto de la presente invención, vectores que portan el compuesto de ADN descrito como SEQ ID NO 3 o fragmentos del mismo que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa.

De acuerdo con un modo particular de la presente invención, los vectores que portan dicho compuesto de ADN son plásmidos.
55

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Esquema que muestra la ruta biosintética de carotenoides en *Fusarium fujikuroi*. A partir de Fitoeno y mediante tres deshidrogenaciones consecutivas (D1, D2 y D3) se obtiene Neurosporeno, del cual mediante una ciclación (C1) se obtiene α -zeacaroteno, de éste mediante una cuarta deshidrogenación (D4) se obtiene γ -caroteno, el cual tras una segunda ciclación (C2) da como producto β -caroteno, siendo este el sustrato para una quinta deshidrogenación (D5) se obteniéndose Toruleno, el cual es objeto de una rotura oxidativa (Ox) para la obtención de Neurosporaxantina.
60

Depósito de microorganismos de acuerdo con el Tratado de Budapest.

65 Una cepa del mutante SF21 de *Fusarium fujikuroi* ha sido depositada, según lo previsto en el Tratado de Budapest, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia - Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia (España), con el número CECT 20527.

ES 2 231 029 B1

Exposición detallada de un modo de realización

Ejemplo 1

5 Obtención de la estirpe SF21 de *Fusarium fujikuroi*

Se sembraron mediante trasplantes las estirpes SF4 y SF21 sobre agar DG (Avalos *et al.*; Appl. Envirom. Microbiol. 1985, 49: 187-191) con 3 g/l de asparagina como fuente de nitrógeno y se incubaron durante 9 días en oscuridad. Los micelios se separaron del agar, se liofilizaron y se les extrajo los carotenoides. Su análisis por cromatografía en columna de alúmina muestra que SF4 contiene 802 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (ppm) de carotenoides coloreados, de los cuales la mayoría son neurosporaxantina y toruleno. La estirpe SF21 contiene 2282 ppm de carotenoides coloreados, de los cuales la mayoría son gamma-caroteno y beta-caroteno. Los resultados en ppm se muestran en la tabla 1:

15 TABLA 1

Estirpe	Carotenoides (coloreados)	Fitoeno	Carotenoides (total)	γ -caroteno	β -caroteno	γ - + β -caroteno
20 SF4	802	98	900	36	14	5,6%
SF21	2282	212	2494	909	951	74,6%

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO 3, la cual incluye el gen *carB36* del mutante SF21 de *Fusarium fujikuroi*, que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa.

5

2. Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO 4, que se corresponde con la enzima fitoeno deshidrogenasa codificada por el gen *carB36* del mutante SF21 de *Fusarium fujikuroi*.

3. Un método de producción de gamma-caroteno y beta-caroteno del hongo *Fusarium fujikuroi* **caracterizado** por la presencia de una mutación en su gen *carB* que da lugar a la sustitución en la proteína de la prolina de la posición 170 por una serina.

10

4. Un método según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el gen mutado de *carB* tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO 3.

15

5. Uso de la secuencia de ADN según la reivindicación 1, en la obtención de estirpes transformantes de especies del género *Fusarium* o *Gibberella* capaces de acumular gamma-caroteno y beta-caroteno.

20

6. Vectores (plásmidos) que portan el compuesto de ADN descritos como SEQ ID NO 3 o fragmentos del mismo que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa.

7. Vectores de acuerdo con la reivindicación anterior 6, **caracterizado** por consistir en un plásmido.

25

30

35

40

45

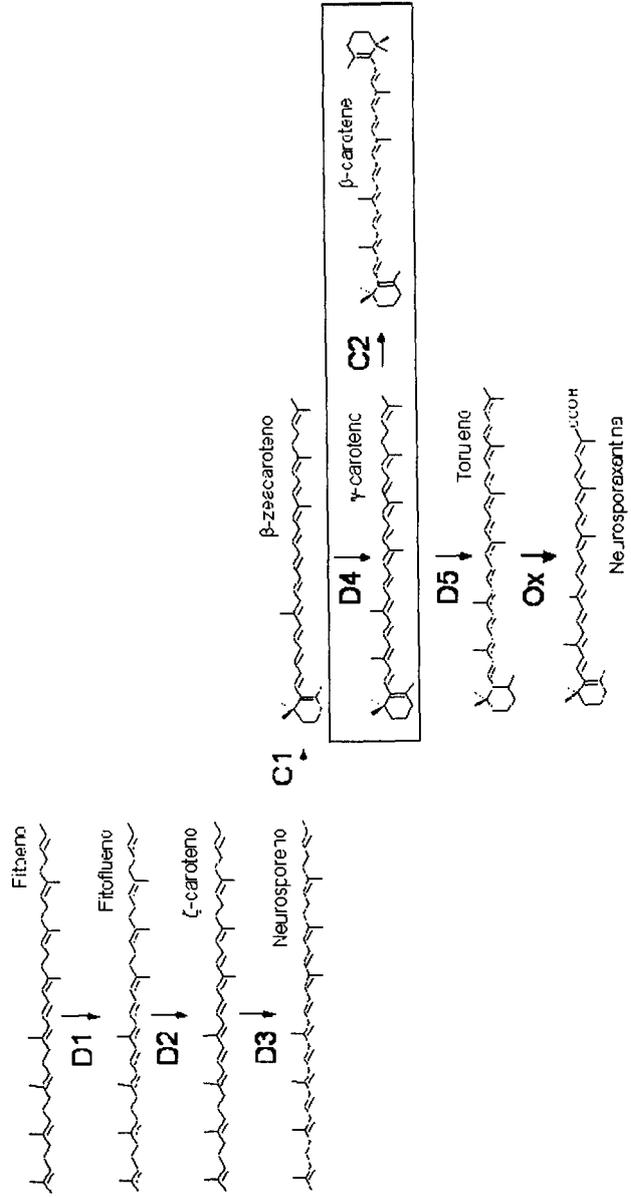
50

55

60

65

FIGURA 1



ES 2 231 029 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Sevilla

5 <120> EMPLEO DE UNA MUTACION EN EL GEN DE LA DESHIDROGENASA DE FITOENO DE *FUSARIUM FUJIKUROI* PARA PRODUCCIÓN DE GAMMA-CAROTENO Y BETA-CAROTENO

<160> 8

10 <170> Patent/In version 3.1

<210> 1

<211> 1859

15 <212> DNA

<213> *Gibberella fujikuroi*

<400> 1

20 atgagcgaca ttaagaaatc tgttattgtt attggtatgt tactcctaata atcatgagca 60
tgagaaggta tgactgaca gttaccagggt gctgggtgctg gtgggtgttc tactgctgcg 120
agacttgcaa aagctggcct caaagtcact atcctcgaga agaatgactt taccgggtgga 180
25 cgttgctctc taatctacaa cgatggccac gtacgtcttc ctctcactc ttttacgcc 240
cactaacctt gtcagcgctt cgatcaaggt ccatctcttc ttctcctccc tcgctcttc 300
cacgagatct tccaagacct aggaacatct ctaactgctg agggcggtga gctttgaaa 360
30 tgtgaacca attacaacat ctgggtcggc gacgggtcat ctttgagat gtctactgat 420
ctcaccaaga tgaagaaagc tatcgaagcc gttgaaggta tcgatgggtt tgagaggtag 480
ctcgggtttc ttcaggagtc gcatcgacat tatgaagtca gtgttgagtc tgtgctgcca 540
35 agaaacttc ctagtatttt gagcttggcg agacctgagg tgctgttcaa tctgttcaat 600
attcatccc ttgagagtat ctggacgaga gcgagcaagt acttctggac tgagagggta 660
agaagagtct ttacattcgg aagcatgtac atgggcatga gtccggttga tgcgccagga 720
40 acgtatagct tgcttcagta tactgagcct gctgagggtta tcctatatcc tcgagggtgga 780
ttccacaagg ttagtcttgc aaccggacat gatagggttc tcaactaacag cttcaggtcg 840
ttgaggcact ggtaacggtt ggtcagcgtc tcggtgtcga gtaccgtctc tccactggcg 900
45 tcaagtccat ttctattgac caagcaaccg gcaaggcaaa cgggtgctgtt ctgagcgacg 960
gaacacattt acctcagac attgtcatct caaacgccga ccttgtctat acttacaaca 1020
acctccttc taagaccagc tacgcagact cgctatcaaa acgagaaacc tctgcagta 1080
50 gtatctctt ctactggtct gcttctaaga tcgttctga actcaacgct cacaacatct 1140
tcctgcgga tgagtaccag gactctttg acagcatct caaggagcac ctcatcctt 1200
cagaaccatc ctctatgtc aatgttctt cacgcatcga ccctcagct gctcctgaag 1260

55

60

65

ES 2 231 029 B1

gtaaggactc tatagtcgtc cttgtaccgc ttggccatct tctgtcagat tctgaaggaa 1320
cacatcgtgg ttgtccaag tctggaaatt ctggggcct tgaacaagc caggactggg 1380
5 ataagatgat ctctctggcc cgtgacacag tcatcgcaac aatgcgtgcg agaataggcg 1440
ttgatcttgc tcctctcatt gaaaacgaaa tcatcaacac tccttcacg tggcaagaga 1500
agttcaacct cgacaagggt gctattcttg gcttgagcca ctccatcatg aatgttctcg 1560
10 ccttccgacc tggactcag cactccaagt acaagaactt atactttgct ggtgccagca 1620
cacatcctgg tactggtgtt cctgtctgca ttgctgtag taagattgtt gcagagcaga 1680
ttctcaagga ttcaggtttc aagaacaacc agatcccctg ggctcaggat actaccaagt 1740
15 ctccaaggg tggactggat aagatgagcg attcgtctt gactctgttc caagggttct 1800
tgggggctct ggttgcgatt ttgctggcft attattatct tgcattgct gcgaattag 1859

<210> 2
20 <211> 570
<212> PRT
<213> *Gibberella fujikuroi*
25 <400> 2

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

60

65

ES 2 231 029 B1

Val Leu Phe Asn Leu Phe Asn Ile His Pro Leu Glu Ser Ile Trp Thr
 165 170 175
 Arg Ala Ser Lys Tyr Phe Trp Thr Glu Arg Leu Arg Arg Val Phe Thr
 5 180 185 190
 Phe Gly Ser Met Tyr Met Gly Met Ser Pro Phe Asp Ala Pro Gly Thr
 10 195 200 205
 Tyr Ser Leu Leu Gln Tyr Thr Glu Leu Ala Glu Gly Ile Leu Tyr Pro
 15 210 215 220
 Arg Gly Gly Phe His Lys Val Val Glu Ala Leu Val Asn Val Gly Gln
 225 230 235 240
 Arg Leu Gly Val Glu Tyr Arg Leu Ser Thr Gly Val Lys Ser Ile Ser
 20 245 250 255
 Ile Asp Gln Ala Thr Gly Lys Ala Asn Gly Val Val Leu Ser Asp Gly
 25 260 265 270
 Thr His Leu Pro Ser Asp Ile Val Ile Ser Asn Ala Asp Leu Val Tyr
 275 280 285
 Thr Tyr Asn Asn Leu Leu Pro Lys Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Leu Ser
 30 290 295 300
 Lys Arg Glu Thr Ser Cys Ser Ser Ile Ser Phe Tyr Trp Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Lys Ile Val Pro Glu Leu Asn Ala His Asn Ile Phe Leu Ala Asp Glu
 35 325 330 335
 Tyr Gln Glu Ser Phe Asp Ser Ile Phe Lys Glu His Leu Ile Pro Ser
 340 345 350
 Glu Pro Ser Phe Tyr Val Asn Val Pro Ser Arg Ile Asp Pro Ser Ala
 40 355 360 365
 Ala Pro Glu Gly Lys Asp Ser Ile Val Val Leu Val Pro Val Gly His
 45 370 375 380
 Leu Leu Ser Asp Ser Glu Gly Thr His Arg Gly Leu Ser Lys Ser Gly
 385 390 395 400
 Asn Ser Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Asp Trp Asp Lys Met Ile Ser
 50 405 410 415
 Leu Ala Arg Asp Thr Val Ile Ala Thr Met Arg Ala Arg Ile Gly Val
 55 420 425 430

60

65

ES 2 231 029 B1

Asp Leu Ala Pro Leu Ile Glu Asn Glu Ile Ile Asn Thr Pro Phe Thr
 435 440 445
 5 Trp Gln Glu Lys Phe Asn Leu Asp Lys Gly Ala Ile Leu Gly Leu Ser
 450 455 460
 His Ser Ile Met Asn Val Leu Ala Phe Arg Pro Gly Thr Gln His Ser
 10 465 470 475 480
 Lys Tyr Lys Asn Leu Tyr Phe Ala Gly Ala Ser Thr His Pro Gly Thr
 485 490 495
 15 Gly Val Pro Val Cys Ile Ala Gly Ser Lys Ile Val Ala Glu Gln Ile
 500 505 510
 Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Asn Asn Gln Ile Pro Trp Ala Gln Asp
 20 515 520 525
 Thr Thr Lys Ser Pro Lys Gly Gly Leu Asp Lys Met Ser Asp Ser Ser
 530 535 540
 25 Leu Thr Leu Phe Gln Gly Phe Leu Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu
 545 550 555 560
 Ala Tyr Tyr Tyr Leu Val Ile Ala Ala Asn
 30 565 570

<210> 3

<211> 1859

35 <212> DNA

<213> *Gibberella fujikuroi*

<400> 3

40 atgagcgaca ttaagaaatc tgttattggt attggtatgt tactccta atcatgagca 60
 tgagaaggta tgactgaca gttaccaggt gctggtgctg gtggtgttc tactgctgcg 120
 45 agactgcaa aagctggctt caaagtcact atcctcgaga agaatgactt taccggtgga 180
 cgttgctctc taatctacaa cgatggccac gfacgtcttc cttctcactc ttttacgcc 240
 cactaacctt gtcagcgctt cgatcaaggt ccatctcttc ttctctccc tcgcttctc 300
 cacgagatct tccaagacct aggaacatct ctaactgctg agggcggtga gctttgaaa 360
 50 tgtgaacca attacaacat ctggttcggc gacggttcat ctttgagat gtctactgat 420
 ctaccaaga tgaagaaagc tatcgaagcc gttgaaggta tcgatggtt tgagaggtac 480
 ctcggttttc tcaggagtc gcatcgacat tatgaagtca gtgttgagtc tgtgctgcga 540
 55 agaaacttct ctagtatttt gagcttggcg agacctgagg tgctgttcaa tctgttcaat 600
 attcatctcc ttgagagtat ctggacgaga gcgagcaagt acttctggac tgagaggtta 660

60

65

ES 2 231 029 B1

agaagagtct ttacattcgg aagcatgtac atgggcatga gtccgittga tgcgccagga 720
 acgtatagct tgcttcagta tactgagctt gctgagggta tcctatatcc tcgaggtgga 780
 5 ttccacaagg ttagtcttgc aaccgcacat gataggttcc tactaacag cttcaggtcg 840
 ttgaggcact ggtaacgtt ggtcagcgtc tcgggtcga gtaccgtctc tccactggcg 900
 tcaagtccat ttctattgac caagcaaccg gcaaggcaaa cgggtgcgtt ctgagcgacg 960
 10 gaacacattt accttcagac attgcatct caaacgccga cttgtctat acttacaaca 1020
 acctcctcc taagaccagc tacgcagact cgctatcaaa acgagaaacc tcctgcagta 1080
 gtatctctt ctactggtct gcttctaaga tcgttctga actcaacgct cacaacatct 1140
 15 tccttgcgga tgagtaccag gagtctttg acagcatct caaggagcac ctactcctt 1200
 cagaaccatc ctctatgtc aatgttctt cacgcatcga cccttcagct gctcctgaag 1260
 gtaaggactc tatagtcgtc ctgtacccg ttggccatct tctgtcagat tctgaaggaa 1320
 20 cacatcgtgg ttgtccaag tctgaaatt ctgggtggct tgaacaagc caggactggg 1380
 ataagatgat ctctctggcc cgtgacacag tcatcgcaac aatgcgtgcg agaataggcg 1440
 ttgatcttgc tcctctcatt gaaaacgaaa tcatcaacac tccttcacg tggcaagaga 1500
 25 agttcaacct cgacaagggt gctattcttg gcttgagcca ctccatcatg aatgttctcg 1560
 ccttccgacc tggactcag cactccaagt acaagaactt atactttgct ggtgccagca 1620
 cacatcctgg tactggtgtt cctgtctgca ttgctggtag taagattgtt gcagagcaga 1680
 30 ttctcaagga ttcaggttcc aagaacaacc agatcccctg ggctcaggat actaccaagt 1740
 ctccaaggg tggactggat aagatgagcg attcgtctt gactctgttc caagggttct 1800
 tgggggctct ggttgcgatt ttgctggctt attattatct tgcattgct gcgaattag 1859

35

<210> 4

<211> 570

40 <212> PRT

<213> *Gibberella fujikuroi*

<400> 4

45

Met Ser Asp Ile Lys Lys Ser Val Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Gly

1 5 10 15

Gly Val Ser Thr Ala Ala Arg Leu Ala Lys Ala Gly Phe Lys Val Thr

50

20 25 30

Ile Leu Glu Lys Asn Asp Phe Thr Gly Gly Arg Cys Ser Leu Ile Tyr

35 40 45

55

Asn Asp Gly His Arg Phe Asp Gln Gly Pro Ser Leu Leu Leu Leu Pro

50 55 60

60

65

ES 2 231 029 B1

Arg Phe Phe His Glu Ile Phe Gln Asp Leu Gly Thr Ser Leu Thr Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Glu Leu Leu Lys Cys Glu Pro Asn Tyr Asn Ile Trp Phe
 5 85 90 95
 Gly Asp Gly Ser Ser Phe Glu Met Ser Thr Asp Leu Thr Lys Met Lys
 10 100 105 110
 Lys Ala Ile Glu Ala Val Glu Gly Ile Asp Gly Phe Glu Arg Tyr Leu
 15 115 120 125
 Gly Phe Leu Gln Glu Ser His Arg His Tyr Glu Val Ser Val Glu Ser
 20 130 135 140
 Val Leu Arg Arg Asn Phe Pro Ser Ile Leu Ser Leu Ala Arg Pro Glu
 25 145 150 155 160
 Val Leu Phe Asn Leu Phe Asn Ile His Ser Leu Glu Ser Ile Trp Thr
 30 165 170 175
 Arg Ala Ser Lys Tyr Phe Trp Thr Glu Arg Leu Arg Arg Val Phe Thr
 35 180 185 190
 Phe Gly Ser Met Tyr Met Gly Met Ser Pro Phe Asp Ala Pro Gly Thr
 40 195 200 205
 Tyr Ser Leu Leu Gln Tyr Thr Glu Leu Ala Glu Gly Ile Leu Tyr Pro
 45 210 215 220
 Arg Gly Gly Phe His Lys Val Val Glu Ala Leu Val Asn Val Gly Gln
 50 225 230 235 240
 Arg Leu Gly Val Glu Tyr Arg Leu Ser Thr Gly Val Lys Ser Ile Ser
 55 245 250 255
 Ile Asp Gln Ala Thr Gly Lys Ala Asn Gly Val Val Leu Ser Asp Gly
 60 260 265 270
 Thr His Leu Pro Ser Asp Ile Val Ile Ser Asn Ala Asp Leu Val Tyr
 65 275 280 285
 Thr Tyr Asn Asn Leu Leu Pro Lys Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Leu Ser
 305 290 295 300
 Lys Arg Glu Thr Ser Cys Ser Ser Ile Ser Phe Tyr Trp Ser Ala Ser
 310 315 320
 Lys Ile Val Pro Glu Leu Asn Ala His Asn Ile Phe Leu Ala Asp Glu
 325 330 335
 Tyr Gln Glu Ser Phe Asp Ser Ile Phe Lys Glu His Leu Ile Pro Ser
 340 345 350

ES 2 231 029 B1

5 Glu Pro Ser Phe Tyr Val Asn Val Pro Ser Arg Ile Asp Pro Ser Ala
 355 360 365

10 Ala Pro Glu Gly Lys Asp Ser Ile Val Val Leu Val Pro Val Gly His
 370 375 380

15 Leu Leu Ser Asp Ser Glu Gly Thr His Arg Gly Leu Ser Lys Ser Gly
 385 390 395 400

20 Asn Ser Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Asp Trp Asp Lys Met Ile Ser
 405 410 415

25 Leu Ala Arg Asp Thr Val Ile Ala Thr Met Arg Ala Arg Ile Gly Val
 420 425 430

30 Asp Leu Ala Pro Leu Ile Glu Asn Glu Ile Ile Asn Thr Pro Phe Thr
 435 440 445

35 Trp Gln Glu Lys Phe Asn Leu Asp Lys Gly Ala Ile Leu Gly Leu Ser
 450 455 460

40 His Ser Ile Met Asn Val Leu Ala Phe Arg Pro Gly Thr Gln His Ser
 465 470 475 480

45 Lys Tyr Lys Asn Leu Tyr Phe Ala Gly Ala Ser Thr His Pro Gly Thr
 485 490 495

50 Gly Val Pro Val Cys Ile Ala Gly Ser Lys Ile Val Ala Glu Gln Ile
 500 505 510

55 Leu Lys Asp Ser Gly Phe Lys Asn Asn Gln Ile Pro Trp Ala Gln Asp
 515 520 525

60 Thr Thr Lys Ser Pro Lys Gly Gly Leu Asp Lys Met Ser Asp Ser Ser
 530 535 540

65 Leu Thr Leu Phe Gln Gly Phe Leu Gly Ala Leu Val Ala Ile Leu Leu
 545 550 555 560

70 Ala Tyr Tyr Tyr Leu Val Ile Ala Ala Asn
 565 570

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Cebador PCR

<400> 5

tgggcgagct catgagcgac attaagaaat ctg

33

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Cebador PCR

ES 2 231 029 B1

<400> 6	
cgctcagaac gacaccgttt g	21
5	
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
10 <213> Artificial Sequence	
<223> Cebador PCR	
<400> 7	
15 cgttgaggca ctggtaacg	20
<210> 8	
<211> 20	
20 <212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> Cebador PCR	
25 <400> 8	
cgagaatcat ggacatagac	20
30	
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 231 029

② Nº de solicitud: 200302521

③ Fecha de presentación de la solicitud: **23.10.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C12N 1/14, 15/01 // (C12N 1/14, C12R 1:77)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LINNEMANNSTONS P.; PRADO M.M.; FERNANDEZ-MARTIN R.; TUDZYNSKI B.; AVALOS J. "A carotenoid biosynthesis gene cluster in Fusarium fujikuroi: the genes carB and carRA". Mol. Genet. Genomics. 2002 Jul., 267 (5):593-602. Epub 2002 Jun 11.	1-7
A	FERNANDEZ-MARTIN R.; CERDA-OLMEDO E.; AVALOS J. "Homologous recombination and allele replacement in transformants of Fusarium fujikuroi". Mol. Gen Genet. 2000 Jun., 263 (5):838-45.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.01.2005

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1