



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 482**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99940368 .6**

96 Fecha de presentación : **18.08.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1108030**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2001**

54 Título: **Modificación de fibras vegetales.**

30 Prioridad: **29.08.1998 GB 9818808**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

73 Titular/es:
Advanced Technologies (Cambridge) Limited
Globe House 1 Water Street
London WC2R 3LA, GB

72 Inventor/es: **Burrell, Michael, Meyrick;**
Cambridge, Amanda, Pat;
Maunder, Martin, Jack y
Mcqueen-Mason, Simon

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 482 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

Modificación de fibras vegetales

Esta invención se refiere a la modificación de la morfología de células de fibra de plantas. La invención se ilustra a través de métodos que usan construcciones genéticas para la modificación, en particular, aunque no exclusivamente, de fibras de eucalipto, por ejemplo.

Se considera que el principal producto de la industria forestal es la madera, aunque más fundamentalmente pudiera considerarse que es la fibra. La industria proporciona una amplia variedad de materias primas a las industrias de la madera sólida y la pulpa/papel que producen una multitud de productos. El ingeniero forestal debe procurar que se provea por lo tanto de la materia requerida para las necesidades competentes de estas industrias, e incluso dentro de las industrias particulares, hay cierta variedad de diferentes requerimientos. Por ejemplo, diferentes grados de papel requieren calidades diferentes en el material de partida.

Las operaciones características de la silvicultura dependen de un equilibrio entre la capacidad que tiene el ingeniero forestal de suministrar al procesador la fibra con las propiedades específicas, y la capacidad del procesador de modificar su proceso y así disponer de la materia prima disponible. El diseño y la operación de las plantas procesadoras dependen de las propiedades de la madera (fibra) de la materia prima.

No obstante estos requerimientos específicos, tales como la uniformidad de la fibra y la resistencia son requerimientos comunes para la mayor parte de los usos industriales, y de ahí que la fibra suministrada por el ingeniero forestal deba ser capaz de proporcionar estas propiedades al procesador.

En la fabricación de la pulpa, por ejemplo, las características de resistencia dependen, en parte, de la longitud de fibra. Una mayor longitud de la fibra lleva a una producción de papel con mayor resistencia. La resistencia de unión es atribuida al contacto entre las fibras y las capacidades de adhesión de las superficies, que dependen de la longitud de la fibra, el perímetro y la aspereza. También, durante el procedimiento industrial, una mayor longitud de la fibra aumenta la resistencia de las hojas mojadas permitiendo un manejo más fácil (Seth, 1995).

Sin embargo, las fibras largas no son deseables para todas las aplicaciones. En algunos casos, son preferibles fibras más cortas, tal como en la producción de papeles lisos.

Las propiedades de la fibra se diferencian según el tipo de especie, y por consiguiente históricamente se han limitado las especies particulares a sus aplicaciones particulares. Las fibras de especies de madera dura son generalmente mucho más cortas que las de las maderas blandas. Esto causa una producción de pulpa y papel con características superficiales deseables, tales como una cierta suavidad y brillo, pero con características de resistencia baja. En la práctica, cuando no está disponible una especie que proporciona una cierta fibra con la combinación apropiada de características, se usa una mezcla de fibras largas y cortas de especies diferentes. Si está disponible una sola fuente, que posee las características deseables más la longitud de fibra óptima, esto es de gran ventaja para el procesador. Se muestran en la Tabla 1 a continuación algunas especies comunes y sus longitudes de fibra.

Tabla 1

Longitudes de Fibra de Diversas Especies Arbóreas

Especies	Longitud de Fibra (mm)
Pino rígido	3,5 - 4,5
Tsuga del Pacífico,	2,5 - 4,2
Fronosas de América del Sur	1,2 - 1,4
Fronosas de América del Norte	1,0 - 1,2
Eucalipto	0,8 - 1,0
Roble blanco Americano	0,59
Liquidámbar	0,48
Chopo	0,35

Los árboles de eucalipto representan las fuentes más grandes de fibras usadas globalmente en la industria papelera (Bamber 1985; Ranatunga, 1964), y por todo el mundo, hay aproximadamente de diez a quince millones de

hectáreas de tierra plantada con Eucalipto (Verhaegen y Plomion, 1996). La ventaja principal del eucalipto es su muy alta velocidad de crecimiento y la capacidad de crecer en una amplia variedad de condiciones, tanto tropicales como templadas.

5 Sin embargo, las fibras del eucalipto son considerablemente más cortas que las de otras fuentes de fibra, aunque más populares, como el pino. Así, los papeles que se hacen con la pulpa del eucalipto a menudo son débiles y por lo general requieren un refuerzo con fibras más largas de otras fuentes, lo que aumenta los gastos de producción. Si los árboles pudieran ser producidos con fibras más largas, sería una ventaja considerable para la industria papelera, aumentando la calidad de las materias primas para la síntesis de pulpa y papel.

10 Mediante la mejora genética de los árboles es posible conseguir alguna modificación de las características de la fibra. Por ejemplo, se han desarrollado híbridos triploides interespecíficos del álamo que tienen fibras más largas que las especies parenterales.

15 La variación genética en las propiedades de la fibra también es evidente dentro de las especies. Las características de la fibra están controladas por una serie de factores genéticos complejos y no son fácilmente susceptibles a los métodos de mejora genética clásicos. Por lo tanto, no se ha explotado suficientemente la variación genética existente en los programas de mejora genética de los árboles. Aunque ahora se estén acumulando conocimientos sobre la heredabilidad de las propiedades de la madera, éstos antes no eran a menudo considerados tan importantes como las características de crecimiento y a veces eran sacrificados por la búsqueda de éstas. En algunos casos, la velocidad de crecimiento está correlacionada negativamente con las características de la fibra, aunque esto no siempre sea verdadero (por ejemplo, en el eucalipto), y se están haciendo esfuerzos en la mejora genética para atrapar las ventajas de ambos.

20 En muchos casos, las propiedades de la fibra son suficientes para el producto final, y la mejora se considera innecesaria. Por ejemplo, el aumento de la longitud de la fibra más allá de los 2 mm causa poco aumento en la resistencia al desgarro o la resistencia a la tensión, y muchas fibras de madera blanda tienen comúnmente aproximadamente 3 mm de largo, es decir, mayor que el mínimo para la resistencia deseada. Sin embargo, las fibras en la madera joven tienden a ser más cortas y hay un creciente uso de materiales jóvenes por una reducción en los tiempos de rotación. Por eso, hay una tendencia incluso de mejora de aquellas especies que comúnmente proporcionan fibras largas.

25 Desde la perspectiva de la industria de la pulpa y papelera, las fibras son tipos específicos de paredes de células de planta que han sido sometidas a una variedad de tratamientos para eliminar todo el contenido y la mayor parte de los componentes de pared no celulósicos (Stewart *et al.*, 1994). En las plantas arboladas, las fibras están constituidas por el material de la pared celular muerto. A fin de producir fibras más largas es necesario disponer de células vivas más largas durante el crecimiento, antes de la formación de la fibra.

30 La pared celular se puede entender como una red compleja de microfibrillas de celulosa unidas juntas por interacciones no covalentes con polímeros de matriz (Carpita y Gibeau, 1993). Las microfibrillas están cubiertas por una mezcla de hemicelulosas que forman interacciones de puentes de hidrógeno extensas con la superficie de las microfibrillas. Coextensivo a esto, hay otra red formada por varias pectinas que son mantenidas juntas en gran parte por enlaces iónicos (McQueen-Mason, 1995).

35 Para permitir que las células crezcan y se hagan grandes, los componentes de la pared deben estar sueltos para permitir el deslizamiento de los polisacáridos y las proteínas dentro de la matriz (Cosgrove, 1993). La extensión de la célula es realizada entonces por la presión de turgor interna de la célula, que es considerable. El grado de extensión durante el crecimiento de la célula está controlado por las propiedades mecánicas de la pared celular, que resulta de su composición y de la orientación de las fibrillas de la pared y de los polímeros estructurales.

40 El control de la extensión de la pared celular está estrechamente regulado por la planta para facilitar el control del crecimiento y la morfogénesis. Los agentes últimos del control son enzimas localizadas en la propia pared. Si las plantas expresan enzimas de "relajación" de la pared celular en sus paredes, entonces parece probable que estas enzimas puedan regular el crecimiento de las células. Los niveles modificados de expresión pueden causar así un mayor crecimiento o una reducción de las células y de la longitud de la fibra. También pueden producirse cambios de la textura de la pared celular.

45 Una clase de proteínas de la pared celular son las expansinas. Las expansinas inducen la extensión de las paredes de la planta, y actualmente son las únicas proteínas que han demostrado una actividad de relajación de la pared. Las expansinas fueron primero aisladas de las paredes celulares de los hipocótilos del pepino por McQueen-Mason *et al.*, (1992) y se caracterizan por su capacidad de catalizar la relajación de la pared en un ensayo reológico *in vitro*.

50 Se cree que el modo de acción de las expansinas es por el debilitamiento de la unión no covalente entre la celulosa y la hemicelulosa, con la consecuencia de que los polímeros se deslizan entre sí en la pared celular (Cosgrove 1996). La acción bioquímica precisa de las expansinas es confusa, aunque se sepa que sus efectos no son debidos a la actividad de exoglucanasa o xiloglucano endotransglucosilasa (McQueen-Mason *et al.*, 1992, McQueen-Mason y Cosgrove, 1993). Las expansinas parecen romper los puentes de hidrógeno que se adhieren entre las microfibrillas

de celulosa y hemicelulosas. El proceso permite que la pared se suelte sin ninguna degradación de los polímeros o un debilitamiento total de la estructura de la pared durante la extensión. Consecuente con este mecanismo, se ha demostrado que las expansinas debilitan el papel celulósico, lo que deriva su resistencia mecánica de los puentes de hidrógeno entre las fibras de celulosa (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994).

- 5 Las expansinas son capaces de restaurar la capacidad que tiene las paredes de célula aisladas de extenderse de una forma dependiente del pH (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995) y pueden ser responsables del fenómeno del "crecimiento ácido" de las plantas (Shcherban *et al.*, 1995). Las proteínas de expansina se han caracterizado en los hipocótilos del pepino (McQueen-Mason *et al.*, 1992), coleótilos de avena (Li *et al.*, 1993), en la ampliación de las hojas del tomate (Keller y Cosgrove, 1995) y los entrenudos del arroz (Cho y Kende, 1997).
- 10 Se han aislado y caracterizado cDNAs de expansina de diversas plantas y es evidente ahora que las expansinas existen como una familia de multigenes que muestra un alto nivel de conservación entre especies. Se han identificado cDNAs con grados altos de homología en colecciones de cDNAs de un marcador de secuencia expresada (EST) anónima de *Arabidopsis* y arroz. Estos cDNA de EST muestran un alto grado de homología respecto al nivel de la secuencia de proteína (del 60-87 %) indicando que la estructura de expansina está muy conservada (Shcherban *et al.*, 1995). Las expansinas no muestran ninguna semejanza de secuencia para otras enzimas conocidas, aunque realmente tengan semejanzas de secuencia para algunos alérgenos del polen (Shcherban *et al.*, 1995). Recientemente Cosgrove *et al.*, (1997) han demostrado que los alérgenos del polen del maíz también poseen una actividad de expansina considerable.
- 15 Si las plantas pueden ser modificadas para sobreexpresar las expansinas en sus paredes, entonces se esperaría que estas plantas mostrarán un marcado aumento de la extensión de las células o del crecimiento. A la inversa, una reducción de la expresión de expansinas debería llevar a una reducción del crecimiento de las células. Es, por lo tanto, sorprendente que la expresión constitutiva de la expansina en eucalipto cause una reducción de la longitud del entrenudo y de la altura.
- 20 Un intento para modificar la expresión de expansinas es mediante la introducción de secuencias de ADN recombinantes en el genoma de plantas. Se pueden usar varios métodos para introducir ADN ajeno en células de planta (véase la revisión de Weising *et al.*, 1988; Miki e Iyer, 1990 y Walden, 1994). La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es probablemente la más extensamente usada y versátil de estos métodos (Walden, 1994).
- 25 Otros investigadores han investigados experimentos de modificación genética dirigidos hacia el cambio de la calidad de la madera y el papel de árboles, en particular concentrándose en la ruta de la lignina en células y el contenido de lignina en el producto del papel final (Hawkins y Boudet, 1994; Grima-Pettenati, *et al.*, 1993; Poeydomenge *et al.*, 1993; Boudet *et al.*, 1995 e Hibino *et al.*, 1994). El objetivo de la presente invención se diferencia en que procura proporcionar un medio para controlar el crecimiento de la fibra y la morfología de la pared celular.
- 30 El documento WO 96/26639 A describe plantas de algodón transgénicas que llevan los genes implicados en la biosíntesis de etileno en el óvulo lo que genera que las características de las fibras sean modificadas.
- 35 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método por lo cual pueden ser modificados árboles para producir fibras de una longitud deseada para aplicaciones específicas. Esto permitirá al ingeniero forestal controlar la calidad de su producto. Además, esto permitirá que el ingeniero produzca una amplia variedad de tipos de fibra de una sola especie o un pequeño número de especies que puedan ser seleccionadas como que cumplen idealmente el cultivo en un sitio particular. Esto causará tanto una economía para emplear un solo régimen silvicultural uniforme, como una flexibilidad de producción con cualquier tipo de fibra que sea requerida en un tiempo particular.
- 40 La invención también proporciona un medio para producir una fibra del tipo específico de árboles en períodos particulares en su ciclo de crecimiento.
- 45 Esto se consigue aislando y caracterizando en primer lugar secuencias de genes de expansina de especies heterólogas y homólogas y luego introduciendo de nuevo estos genes en árboles para modificar los niveles de expansina en los árboles transgénicos usando la sobreexpresión conocida. Esto llevará a un cultivo de árboles más adecuado para la producción del papel.
- 50 La presente invención proporciona un método para transformar árboles para modificar las características de fibra en árboles, comprendiendo el método incorporar establemente en el genoma de un árbol un gen quimérico que comprenda a un promotor y una secuencia que codifica el ácido nucleico que codifica un gen de expansina capaz de modificar la altura del árbol y/o la longitud de entrenudo, siendo dicha secuencia de ácido nucleico una o varias de SEQ. ID. Nos. 1-6 de la presente o la secuencia de expansina del pepino conocida en este documento como Ex29 del pepino (Nº de entrada del GenBank U30382.1), o una secuencia que tiene homología suficiente para formar híbridos con ésta en una condición de severidad media (2 x SSC a 65°C) y que tiene la misma función, y que
- 55 regenera a una planta,
- en el que dicho ácido nucleico está dispuesto en una orientación de sentido y se consigue una disminución en la

longitud de entrenado y/o la altura de la planta comparando con un control.

Se ilustran en este documento los árboles modificados según el método de la invención.

Preferiblemente, el gen quimérico comprende además un terminador.

5 También se ilustran construcciones que tienen las características estructurales del ADN descritas más arriba y los árboles que incorporan tales construcciones y/o genes quiméricos según la invención.

El gen quimérico puede comprender la secuencia de codificación de ácidos nucleicos cuando existe en el genoma, completo con el promotor endógeno, terminador, intrones y otras secuencias reguladoras, o la secuencia de codificación de ácidos nucleicos, con o sin intrones, puede ser combinada con un promotor heterólogo, terminador y/o otras secuencias reguladoras.

10 El promotor puede ser un promotor constitutivo, tal como el promotor del 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV19S) o el promotor de la nopalina sintasa, un promotor específico de tejido, tal como el *roIC*, promotores de patatina o *petE*, o un promotor inducible, tal como el *AlcR/AlcS*. Otros promotores convenientes serán los normalmente conocidos por los expertos en la técnica.

15 La secuencia de ácidos nucleicos, o sus partes, pueden estar dispuestas en la dirección del marco de lectura normal, es decir sentido, o en la dirección del marco de lectura inverso, es decir antisentido. Puede usarse para conseguir la modificación en la longitud de las paredes de la célula de fibra la sobrerregulación o la desregulación de la actividad de la proteína expansina o del gen que la codifica usando la tecnología de sentido, antisentido o co-supresión.

20 Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos codifica una o varias de la clase de proteínas conocidas como expansinas. Más preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos se deriva del eucalipto o del pepino.

La secuencia de ácidos nucleicos puede ser ventajosamente una o varias de SEQ. ID. Nos. 1-6 de la presente. O bien, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser la secuencia de expansina del pepino Ex29 (Nº de entrada del GenBank U30382 - conocida como Cs-EXP1). La secuencia también es descrita en Shcheraban *et al.*, (1995).

25 O bien, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser una secuencia que tiene una homología suficiente para formar híbridos con cualquiera de SEQ. ID. Nos. 1-6 o pepino Ex29 en condiciones de severidad medias (lavados en 2x SSC a 65°C).

Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia mRNA o cDNA, aunque pueda ser ADN genómico.

30 Los árboles que pueden ser modificados apropiadamente usando el método inventivo incluyen eucaliptos, chopos, pinos y alerces.

La secuencia de ácidos nucleicos puede ser introducida por cualquiera de las técnicas de modificación genética conocidas, tal como la modificación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, la modificación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, biolística, electroporación, poración química, microinyección o modificación de fibra de silicio, por ejemplo.

35 A fin de que la invención pueda ser fácilmente entendida y fácilmente llevada a efecto, se hará referencia ahora, por vía del ejemplo, a las figuras siguientes, en las que:

La figura la es una representación esquemática de la secuencia de codificación para el Ex29 de pepino clonado entre el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y números terminador en el vector pDE326;

40 La figura lb es una representación esquemática que muestra el inserto de la Figura la entre los sitios de restricción de EcoR I y Hind III introducidos en un plásmido de Ti modificado pDE 1001 para producir pDE/EXP29, y

La figura lc es una representación esquemática que muestra el inserto de la Figura la entre los sitios de restricción de EcoR I y Hind III introducidos en un plásmido de Ti modificado p35GUSINT para producir pATC/EXP29; y

45 La figura 2 es una representación esquemática que muestra un inserto que contiene SEQ. ID. No 1 entre los sitios de restricción de EcoR I y Hind III introducidos en un plásmido de Ti modificado p35GUSINT para producir pATC/SEQ. ID. No. 1.

EJEMPLO 1

Aislamiento de nuevas secuencias de expansina de tejido de tallo de *B. grandis*

5 Extracción de ARN de hipocótilos de pepino. Fueron sembradas semillas del pepino (*Cucumis sativus* L., cv pepino, de A. W. Burpee, Westminster, Penn, EE. UU.) en una estera capilar empapada en agua (Provisiones de Cultivadores Fordingbridge, Arundel, W. Sussex, Reino Unido) en bandejas de plástico (35 cm x 25 cm x 6 cm) y germinaron en la oscuridad a 27°C. Después de 4 días, las plantas del semillero etioladas fueron cosechadas bajo una luz verde extirpando los 20 mm superiores de los hipocótilos en nitrógeno líquido y moliendo a un polvo fino a mano y en un mortero que había sido enfriado antes a - 80°C. El ARN total fue extraído en un tampón de fenol/ cloruro de litio caliente según el procedimiento de Verwoerd *et al.*, (1989).

10 Extracción del ARN de *Eucalyptus grandis*. Fueron sembradas en bandejas (35 cm x 25 cm x 6 cm) semillas de *E. grandis* con abono orgánico F2 de Levington (Levington Horticulture Ltd., Ipswich, Suffolk, Reino Unido) y germinaron en un invernadero (18-24°C, a una intensidad de luz de aproximadamente 10.000 lux, y 16 horas de luz de día). Después de 8 semanas, las plantas del semillero fueron transferidas a potes individuales, y luego fueron conservadas si era necesario (aproximadamente cada 6-7 semanas). El tejido del tallo en crecimiento fue cosechado desde los últimos 40-50 mm de las puntas de la rama en nitrógeno líquido. Las hojas inmaduras, por lo general las dos más jóvenes desde las puntas de la rama en crecimiento, también fueron cosechadas directamente en nitrógeno líquido; las raíces fueron lavadas en varios platos hondos con agua del grifo, fueron aclaradas con agua destilada y las puntas en crecimiento luego fueron extirpadas en nitrógeno líquido. El ARN fue extraído como se describe en Pawlowski *et al.*, (1994) utilizando un protocolo especialmente modificado para la extracción del ARN de plantas que contienen niveles altos de compuestos fenólicos.

20 Aislamiento del mRNA de Poly (A⁺) del ARN total extraído de tejido de tallo de *E. grandis*. Fue aislado el mRNA de Poly (A⁺) del ARN total usando tanto columnas de oligo (dt) de empuje (Stratagene, Cambridge, Reino Unido) como de centrifuga (Clontech Laboratories, Inc. CA., EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del proveedor y las recomendaciones.

25 RT-PCR y Secuenciación. La secuencia de ácidos nucleicos de expansinas muestra un grado considerable de divergencia. Sin embargo, fueron identificadas y usadas dos regiones con un grado razonable de consenso para sintetizar dos cebadores de oligonucleótido de complejidad baja (véase la Tabla 2).

El ARN total fue extraído del tejido del tallo joven y el mRNA de Poly (A⁺) utilizando columnas de oligo (dt) aislado como se describe más arriba. Se usó 1 µg de mRNA en un experimento PCR (50°C temperatura de templadura, 30 ciclos, principio caliente) con los dos cebadores de consenso de expansina y la ADN polimerasa Taq (Promega UK Ltd.).

30

Tabla 2**Secuencia de Cebadores de Expansina Consenso**

	Secuencia (5'-3')
P. 1 (SEQ. ID. No. 7)	ATGGIGGIGCNTGYGGNTA
P. 2 (SEQ. ID. No. 8)	TGCCARTTYTGCCCCARTT

Clave : Y=C o T, N=A o G o C o T, R=A o G, I=Inosina

35 Construcción de Biblioteca de cDNA. Para la primera síntesis de cadena de cDNA se usó 1 µg de mRNA en una reacción con 0,15g de cebadores OG1 oligo dt y Transcriptasa inversa AMV (9 unidades/µl, Promega UK Ltd., Southampton, Reino Unido).

La biblioteca fue construida en el vector ZAP II de Lambda (Stratagene, Cambridge, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del proveedor.

40 Usando los métodos descritos, fueron aislados clones transformados por selección de colonia azul-blanca en placas agar-agar siguiendo los métodos descritos por el proveedor (R&D Systems). Fueron seleccionadas y secuenciadas veinte colonias blancas ("positivo"). De éstas, se identificaron seis que contenían secuencias que tenían semejanzas con otras secuencias de expansina conocidas usando una búsqueda BLAST básica proporcionada por NCBI. Las supuestas transcripciones tenían un tamaño de aproximadamente 450 bps (determinado por PCR y electroforesis de gel). Los productos de la PCR fueron secuenciados usando un cebador directo y fueron obtenidas las secuencias identificadas como SEQ. ID. Nos. 1-6.

45

EJEMPLO 2**Análisis Northern**

El ARN total fue aislado de tallos, hojas y raíces de *E. grandis* como se describe anteriormente. Fueron

desnaturalizados 6 µg de ARN en 20 µl de H₂O DEPC en un volumen igual de la solución desnaturalizante (formamida al 50 %, 2x TBE) y se corrió en un gel de agarosa al 1,5 % estándar a 75 voltios durante 200 minutos. El ARN del gel fue transferido sobre Membranas de Transferencia Probadas Genómicas de GT "Zeta-Probe" (Laboratorios Biorad, California, EE.UU.) por transferencia capilar. Se usaron secuencias de expansina parciales de *E. grandis* generadas por RT-PCR de mRNA de tallo (como se describe anteriormente) para el marcaje de ³²P-aleatorio principal y se formaron híbridos con el ARN transferido siguiendo los métodos recomendados por el proveedor de membranas (Laboratorios Biorad).

EJEMPLO 3

Preparación del vector de transformación Exp29.

10 Extracción de ARN de hipocótilos de pepino. Fueron sembradas semillas del pepino (*Cucumis sativus* L., cv pepino, de A. W. Burpee, Westminster, Penn, EE.UU.) en una estera capilar empapada en agua (Fordingbridge Growers Supplies, Arundel, W. Sussex, Reino Unido) en bandejas de plástico (35 cm x 25 cm x 6 cm) y germinaron en la oscuridad a 27°C. Después de 4 días, las plantas del semillero etiolado fueron cosechadas bajo luz verde extirpando los 20 mm superiores de los hipocótilos en nitrógeno líquido y moliéndolo en un polvo fino a mano y en un mortero que había sido enfriado previamente a -80°C. El ARN total fue extraído en un tampón de fenol/cloruro de litio caliente según el procedimiento de Verwoerd *et al.*, (1989).

20 Construcción del vector. La secuencia de codificación para el Ex29 de pepino (Nº de entrada del GenBank U30382; conocido como Cs-EXP1, y Shcherban *et al.*, 1995) fue generada por RT-PCR y se clonó entre el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador *nos* (véase la Figura 1a) en pDE326, un vector amablemente proporcionado por el doctor Jurgen Denecke de la universidad de York. Después de la introducción de la secuencia de expansina Ex29 los insertos fueron secuenciados para comprobar que la introducción de marco era la correcta secuenciando utilizando un cebador localizado dentro de la región del promotor 35S.

25 Los insertos que contienen al promotor 35S, la secuencia de Ex29 y el terminador *nos* fueron cortados entre los sitios de restricción EcoRI y HindIII y fueron insertados en plásmidos de Ti modificados para producir construcciones de modificación. Se usaron dos plásmidos de Ti modificados: pDE1001 (Denecke *et al.*, 1992 o Shcherban *et al.*, 1995) proporcionado por el doctor Jurgen Denecke y p35GUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990). Los plásmidos producidos que contenían el inserto se denominaron pDE/EXP29 (pDE1001 + Ex29) (véase, Figura 1b) y pATC/EXP29 (p35GUSINT + Ex29) (Véase, Figura 1c), agradeciendo la fuente de los plásmidos.

30 Los plásmidos fueron transferidos en *E. coli* por procedimientos estándares; fueron cultivadas cepas de *E. coli* en placas LB (incubadas a 37°C y almacenadas a 4°C) o en medio LB con el antibiótico apropiado para la selección positiva.

Las construcciones fueron introducidas en *Agrobacterium* vía la modificación de ADN directa o por acoplamiento triparental usando la función de movilización de *E. coli* cepa HB101 (pRK2013) (Figurski y Helinski 1979).

35 Se usaron dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Una cepa de C58 (C58Cl (pGV2260) Deblaere, R. *et al.*, 1985) amablemente donada por el doctor Jurgen Denecke, y EHA105 (Hood *et al.*, 1993). *Agrobacterium* fueron cultivados en placas LB (incubadas a 27°C y almacenadas a 4°C) o en medio LB con el antibiótico apropiado para la selección positiva.

40 El *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pATC/EXP29 fue depositado por Advanced Technologies (Cambridge) Limited of 210 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 4WA, conforme al Tratado de Budapest del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el fin del Procedimiento de Patentes en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marítimas (NCIMB), 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia el 25 de agosto de 1998 con el Nº de depósito NCIMB 40968. El microorganismo es *Agrobacterium tumefaciens*: cepa EHB105, conteniendo pATC/EXP29. El cDNA para el EX29 de pepino en el cual fue insertado en pBIN19 incapacitado/desarmado (Bevan, 1984) con el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S y el terminador *nos*. El plásmido fue transferido entonces en la cepa de EHA105 de *Agrobacterium*. La construcción es útil para cambiar la extensión de las paredes de las células de fibra.

EJEMPLO 4

Transformación de la planta

50 Las hojas jóvenes fueron disecadas en condiciones estériles, de cultivos de aproximadamente 4 semanas de *E. grandis* cultivadas en cajas de Magenta (7 cm x 7 cm x 13 cm) en medio LS a 25°C, en un cuarto de crecimiento en el laboratorio de cultivo de tejido de los inventores y se usaron para la infección mediada por *Agrobacterium* (Horsch, Fry, Hoffman, Eichholtz, Rogers, *et al.*, 1985). El tejido inoculado fue dejado co-cultivar durante 4 días en medio LS (más 20g/l de glucosa, agarosa al 0,7 %, Zeatin 0,01 mM, NAA 1 µM) en luz difusa en un cuarto de crecimiento, condiciones como antes. Los transformantes fueron seleccionados en 50 mg/l de kanamicina y 250 mg/l de cloranfenicol.

Se prepararon dos construcciones para la modificación de plantas y se introdujeron en dos cepas de *Agrobacterium*, C58 y EHA105 para producir C58 que contiene pDE + Ex29, C58 que contiene pATC + Ex29 y EHA105 que contiene pATC + Ex29. Cada construcción - conteniendo la cepa se usó para inocular 400 hojas disecadas de tejido de *E. grandis* (en dos ocasiones separadas, cada vez inoculando 200 hojas).

- 5 Los experimentos de modificación fueron repetidos con unas 240 hojas más, inoculadas con EHA105 que contiene pATC + Ex29 para aumentar la cantidad de posibles transformantes asequibles.

Del lote original del tejido inoculado con EHA105, fueron cultivadas 25 plantas en el invernadero y se determinaron las propiedades de los brotes.

- 10 Parece que la introducción de la secuencia de codificación de expansina unida al promotor 35SCAmV ha causado una reducción de la altura total de las plantas desde un valor de control medio de 603 mm en las plantas de control a 546 mm en las plantas transformadas. De los sobrevivientes de las 25 plantas, 4 plantas control y 13 plantas transgénicas fueron incluidas en este análisis. Esta reducción de la altura tiene que ver con un cambio en la longitud de entrenudo como se analiza en la tabla más abajo. Un análisis Chi cuadrado de los datos de la Tabla 3 indica que las dos poblaciones de plantas son sustancialmente diferentes a un valor de $p < 0,01$.

15

TABLA 3

Clase de longitud de internodo (mm)	Número de internodos en clase		% de internodos en clase	
	Control	Expansina	Control	Expansina
10	1	7	3	6
20	10	28	28	24
30	9	28	28	24
40	21	11	18	
50	1	9	3	8
60	6	12	17	10
70	2	7	6	6
80	3	4	8	3
>80	01			

- 20 A partir de estos datos, está claro que puede ser usada la modificación en el nivel de la actividad de expansina en el árbol para producir el efecto requerido. A fin de aumentar el crecimiento puede ser necesario usar la tecnología de desregulación, por ejemplo, la expresión de la cadena inversa o complementaria de la secuencia de expansina, o una secuencia de expansina sentido parcial, a fin de aumentar la longitud de la fibra.

EJEMPLO 5

- 25 Las secuencias SEQ. ID. Nos. 1-6 fueron cada una introducidos en pATC en ambas orientaciones, es decir, orientación antisentido y sentido, y se usaran para transformar eucaliptos y tabaco usando la misma metodología que la descrita en los Ejemplos 3 y 4. La figura 2 muestra el plásmido pATC/SEQ. ID. No 1 en la orientación sentido, como un representante del plásmidos usado en la modificación. Puede usarse cualquier vector de modificación adecuado.

- 30 Se encontró que la introducción de las nuevas secuencias de expansina diferentes produjo plantas transformadas a partir de las plantas de control.

REFERENCIAS

Bamber RK (1985) The wood anatomy of Eucalypts and papermaking. *Appita* **38**: 210-216

- Bevan MW (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucl. Acid Res.* **12**, 871-8721
- Boudet AM, Lapierre C + Grima-Pettenati J (1995) Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol. Tansley rev.* **80**, 129 203-236
- 5 Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3** (1): 1-30.
- Cho H-T, Kende H (1997) Expansins in deepwater rice internodes. *Plant Physiol* **113** 1137-1143
- Cho H-T, Kende H (1997) Expansins and internodal growth of deepwater rice. *Plant Physiol* **113** 1145-1151
- Cosgrove DJ (1993) Wall extensibility - its nature, measurement and relationship to plant cell growth. *New Phytol* **124** (1): 1-23
- 10 Cosgrove DJ (1996) Plant cell enlargement and the action of expansins. *BioEssays* **18** (7): 533-540
- Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachro (1997) Group I allogens of grass pollen as cell wall loosening agents. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94** 6559-6564
- Deblaere, R. Bytebier, B. De Greve, H. , DeBoaeck, F. , Schell, J. , Van Montagu, M. Leemans, J. (1985) Efficient octopine T- plasmid vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acid. Res.*, **13**, 4777-4788
- 15 Denecke J. Rycke RD, Botterman J (1992) Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *The EMBO Journal* **11** (6): 2345-2355
- Figurski D, Helinski DR (1979) Replication of an origin- containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1648-1652
- 20 Grima-Pettenati J, Feuillet C, Goffner D, Borderies G, Boudet AM (1993) Molecular cloning and expression of a Eucalyptus gunnii clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol Bio* **21**: 1085-1095
- Hawkins SW, Boudet AM (1994) Purification and characterisation of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of Eucalyptus gunnii Hook. *Plant Physiol* **104** : 75-84
- Herrera-Estrella I, De Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal* **2**: 987-995
- 25 Hibino T, Chen J-Q, Shibata D + Miguchi T (1994) Nucleotide sequences of a Eucalyptus botryoides gene encoding dinnamyl alcohol dehydrogen. *Plant Physiol.* **104** 305-306
- Hood EE, Gelvin SB, Melcheri LS, Hoekma A (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* **2**, 208-218
- 30 Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-2123
- Keller E, Cosgrove DJ (1995) Expansins in growing tomato leaves. *Plant J* **8**: 795-802
- Li Z-C, Durachko DM, Cosgrove DM (1993) An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* **191**: 349-356
- McQueen-Mason S (1995) Expansins and cell wall expansion. *J. Exp. Bot.* B46 (**292**): 1639-1650
- 35 McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1993) Cucumber expansins disrupt hydrogen-bonds between cellulose fibers *in vitro*. *Plant Physiol* **102** (1): 122
- McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1994) Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6574-6578
- 40 McQueen-Mason S, Cosgrove DJ (1995) Expansin mode of action on cell walls; Analysis of wall hydolysis, stress relaxtion and Binding. *Plant Physiol* **107**: 87-100
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433
- Miki BLA, Iyer VN (1990) Fundamentals of gene transfer in plants. En: Dennis DT, Turpin DH (eds) *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 1 edn. Longman Scientific & Technical Publishers, UK
- 45 Pawlowski K, Kunze R, De Vries S, Bisseling T (1994) Isolation of total, poly (A) and polysomal RNA from plant

tissues. Kluwer Academic Publishers, Belgique

Poeydomenge O, Boudet AM, Grima-Pettenati J (1994) A cDNA encoding S-adenosyl-L-methionin : caffeic acid 3-O-methyltransferase from Eucalyptus. *Plant Physiol* **105**: 749-750

Ranatunga MS (1964) A study of the fibre lengths of Eucalyptus grandis grown in Ceylon. *Ceylon For* **6**: 101-112

- 5 Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Guiltinan MJ, McQueen-Mason S, Shieh M, Cosgrove DJ (1995) Molecular cloning and sequence analysis of expansins - a highly conserved and multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc. Natl Acad Sci USA* **92** : 9245-9249

Seth RS (1995) The effect of fibre length and coarseness on the tensile strength of wet webs: a statistical geometry explanation. *Tappi J* **78** (3) 99-102

- 10 Stewart *et al* (1994) Vanncanneyt, G, Schmidt, R. , O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene : Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 245-250

Verhaegen, D, Plomion C (1996) Genetic mapping in Eucalyptus urophylla using RAPD markers. *Genome* **39**: 1051-1061

- 15 Verwoerd TC, Dekker BMM, Hoekema A (1989) A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17** (6): 2362

Walden R (1994) Cell Culture, Transformation and Gene Technology. En: Lea PJ, Leegood RC (eds) Plant Biochemistry and Molecular Biology, 1st edn. John Wiley & Sons Ltd. , London Weising K, Schell, J, Kahl G. (1988) Foreign genes in plants : transfer, structure, expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* **22** 421-477

20

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 **(1) INFORMACION GENERAL**
- (i) SOLICITANTES :
- 10 (A) NOMBRE: Advanced Technologies (Cambridge) Limited
 (B) CALLE: Globe House, 1 Water Street
 (C) CIUDAD: Londres
 (E) PAIS: Inglaterra
 (F) CODIGO POSTAL: WC2R 3LA
- 15 (ii) TITULO DE LA INVENCION: Modificación de Fibras Vegetales
- (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 8
- (iv) DIRECCION DE CORRESPONDENCIA:
- 20 (A) DESTINATARIO: British American Tobacco (Investments)Limited
 (B) CALLE: Regents Park Road
 (C) CIUDAD: Southampton
 (D) ESTADO: Hampshire
 (E) PAIS: Inglaterra
 (F) CODIGO POSTAL: SO15 8TL
- 25 (v) FORMATO QUE PUEDE LEERSE CON ORDENADOR:
- 30 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete 8,89 cm (3,50 pulgadas)
 (B) ORDENADOR: Viglen P5/75
 (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS Windows 95
 (D) SOFTWARE: Microsoft Word 97
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
- 35 (A) NUMERO DE LA SOLICITUD : Aún no conocido
 (C) CLASIFICACION : Aún no conocida
- (viii) INFORMACION DEL AGENTE/ABOGADO :
- 40 (A) NOMBRE: Mrs. M.R. Walford/ Mr. K.J.H. MacLean
 (C) REFERENCIA: RD-ATC-19
- (ix) INFORMACION PARA TELECOMUNICACION:
- (A) TELEFONO: 01703 777155
 (B) TELEFAX: 01703 779856
- 45 **(2) INFORMACION DE SEQ.ID. NO:1**
- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA :
- 50 (A) LONGITUD: 488 pares de bases
 (B) TIPO: Acido nucléico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGIA: Lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 55 (A) ORGANISMO: Eucalyptus grandis

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. NO:1:

ATGGGGGGGG CTGTGGGTA TGGCAACCTG TACAGCCAAG GCTATGGCAC	50
CAACACTGCA GCTTTGAGCA CTGCCCTGTT CAACAATGGC C'TGAGCTGCG	100
GGGCATGTTA CGAGATGCGG TGCAACGACG ACCCCAGGTG GTGCCTCCCG	150
GGGACCATCA TGGTCAAGGC AACCAACTTT TGCCCTCCCA ACTTGGCCCT	200
CTCCAACGAC AATITCGGCT GGTGCAACCC CCTCTCCAG CACTTCGATA	250
TGGCCGAGCC TGCTTTCTTG CAGATTGCC AGTACAAAGC TGGGATTGTC	300
CAGGTTTCCT TCAGAAGGT TCCGTGTGTG AAGAAAGGAG GGGTAAGGTT	350
CACCATCAAT GGGCACTCCT ACTTCAACTT GGTCCTGATC ACCAACGTGG	400
GAGGTGCTGG TGATGTCCAT TCCGTTTCCA TCAAGGGCTC GAGGACTGGT	450
TGGCAAGCCA TGTC AAGGAA CTGGGGCAAA AACTGGCA	488

(2) INFORMACION DE LA SEQ. ID. NO:2

- 5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 475 pares de bases
 - (B) TIPO : Acido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: Doble
 - (D) TOPOLOGIA: Lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Eucalyptus grandis
- 15

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ. ID NO:2:

ATGGGGGGGG CATGCGGGTA TGGCAACCTG TACAGCCAAG GCTATGGCAC	50
CAACACTGCA GCTTTGAGCA CTGCCCTGTT CAACAATGGC CTGAGCTGCG	100
GGGCATGTTA CGAGATGCGG TGCAACGACG ACCCCAGGIG GTGCCTCCCG	150
GGGACCATCA TGGTCACGGC AACCAACTTT TGCCCTCCCA ACTTGGCCCT	200
CTCCAACGAC AATGGGGCT GGTGCAACCC CCTCTCCAG CACTTCGATA	250
TGGCCGAGCC TGCTTTCTTG CAGATTGCC AGTACAAAGC TGGGATTGTC	300
CCGGTTTCCT TCAGAAGGGT TCCGTGTGTG AAGAAAGGAG GGGTAAGGTT	350
CACCATCAAT GGGCACTCCT ACTTCAGCTG TGGTGTGAT CACCAACGIG	400
GGAGGTGCTG GTGATGTCCA TTCGGTTCC ATCAAGAGCT CGAGGACTGG	450
TGGCAAGCC ATGTCAAGGA ATGA	475

(2) INFORMACION DE SEQ. ID. NO:3

5

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 494 pares de bases
- (B) TIPO: Acido nucléico
- (C) TIPO DE CADENA: Doble
- (D) TOPOLOGIA: Lineal

10

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(vi) FUENTE ORIGINAL:

15

- (A) ORGANISMO: *Euclayptus grandis*

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ. ID. NO:3:

```

ATGGGGGGGG CATGTGGTTA CGGGGAOCTT CACAGGGCCA CCTATGGCAA 50
GTACAGTGCC GGCTTGTAGCT CGATGCTGTT CAACAGAGGG AGTACCTGCG 100
GGGCTTGCIT CGAGCTCCGG TCGTTCGACC ACATTTTGIG GTGCCITCCCT 150
GGTAGCCCGT CGGTGATCCT CACCGCCACC GACTTCTGCC CTCGAACTA 200
CGGGCTGCG GCAGATTACG GCGGGTGGTG CAACTTCCCG CAGGAGCACT 250
TCGAGATGTC GGAGCGGCC TTCGCCGAGA TTGCGGTGG AAGGGCTGAT 300
GTGGTGCCTA TCCAGTACAG GAGGGTGAAC TGTCTGAGAA GCGGIGTCT 350
GAGATTACA TTGAGCGGAA ACTCTCACTT CTTTCAGGTC TTGGIGACGA 400
ATGTAGGCCT AGATGGGGAG GTGATTGCCA TGAAAATGAA GGATCGAAA 450
ACAGGGTGGT TACCGATGGC AAGAAACTGG GCACAAAACCT GGCA 494
    
```

(2) INFORMACION DE SEQ. ID. NO:4

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD : 437 pares de bases
- (B) TIPO : Acido Nucléico
- (C) TIPO DE CADENA: Doble
- (D) TOPOLOGIA: Lineal

10

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Eucalyptus grandis

```

ATGGGTTGCC ACCGGGTCCT TGATCCPTTG ATGGCCACGG AGTGACATC 50
CCCTGCTCCG CCGACATTGG TTATGAGCAC GAGGTTGAAA TAAGAATGGC 100
CGTTGACGGT GAACCGGATC CCTCCGCTTC TCCTGCACCT CACTCTTCGG 150
TAGGCCACCG GGACGATCCC GGCCCTGTAC TGCGCAATGT GCTGGAAGAC 200
CGGCTGGGAG AGGTGAAAT GGAGTTGAGG AGGGTCGCAC CACCCTCCTG 250
GAGGGCAGAA GTTGGTCCG GTGACCACAA TGGCGCCCGG GAGGCACCAC 300
TGCGGGTGGT TCACGCACCG GAGCTCAAAG CACGCGCCGC AGCTCAGCCC 350
ATTGTTGAAC AATGCAGTGC TCAGTGCAGC TGIGTPTTGIG CCGTACCCTT 400
GGCTGTATAG ATTCCATAA CCACACGCC CCCCAT 437
    
```

15

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. No. 4

(2) INFORMACION DE SEQ. ID. NO:5

- 5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 437 pares de bases
 (B) TIPO : Acido Nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: Doble
 (D) TOPOLOGIA: Lineal

10 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Eucalyptus grandis

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID. No. 5

ATGGGTTGCC ACCGGTCTCT TGATCCTTTG ATGGCCACCG AGTGCACATC	50
CCCTGCTCCG CCGACATTGG TTATGAGCAC GAGGTTGAAA TAAGAATGGC	100
CGTTGACGGT GAACCGGATC CCTCCGCTTC TCCTGCACCT CACTCTTCGG	150
TAGGCCACAG GGACGATCCC GGCCCTGTAC TGGCAATGT GCTGGAAGAC	200
AGGCTGGGAG AGGTGAAAT GGAGTTGAGG AGGGTCGCAC CACCCTCCTG	250
GAGGGCAGAA GTTGGTGGCC GTGACAACAA TGGCGCCCGG GAGGCACCAC	300
TGCGGGTGGT TCACGCACCG GAGCTCAAAG CACGCGCCGC AGCTCAGCCC	350
ATTGTTGAAC AATGCAGTGC TCAGTGCAGC TGIGTTTGIG CCGTACCCTT	400
GGCTGTATAG ATTCCCATAA CCACACGCCC CCCCCAT	437

(2) INFORMACION DE SEQ. ID. NO:6

- 20 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 488 pares de bases
 (B) TIPO Acido Nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: Doble
 (D) TOPOLOGIA: Lineal

25 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 (A) ORGANISMO: Eucalyptus grandis

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para transformar árboles que modifica las características de la fibra en los árboles, comprendiendo el método incorporar establemente en el genoma del árbol un gen quimérico que comprende a un promotor y una secuencia que codifica el ácido nucleico que codifica un gen de expansina capaz de modificar la altura del árbol y/o la longitud de entrenudo, siendo dicha secuencia de ácidos nucleicos una o varias de SEQ. ID. Nos. 1-6 de la presente o la secuencia de expansina de pepino conocida en este documento como Ex29 de pepino (Nº de entrada del GenBank U30382.1), o una secuencia que tiene una homología suficiente para formar híbridos con ésta en condiciones de severidad media (2 x SSC a 65°C) y que tiene la misma función, y regenerar una planta, en la que dicho ácido nucleico está dispuesto en una orientación sentido y en la que se consigue una disminución en la longitud de entrenudo y/o en la altura de la planta comparado con el control.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácidos nucleicos es de eucalipto o pepino.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia cDNA o un ADN genómico.
- 15 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho árbol es un eucalipto, álamo temblón, pino o alerce.
- 20 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho promotor es uno de dicho grupo que consiste en el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV19S), el promotor de nopalina sintasa, el *roIC*, los promotores de patatina o *petE*, o el promotor AlcR/AlcS.

Fig.1a.

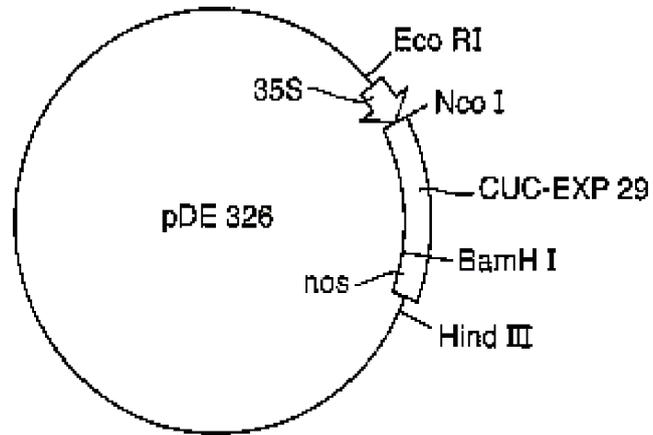


Fig.1b.

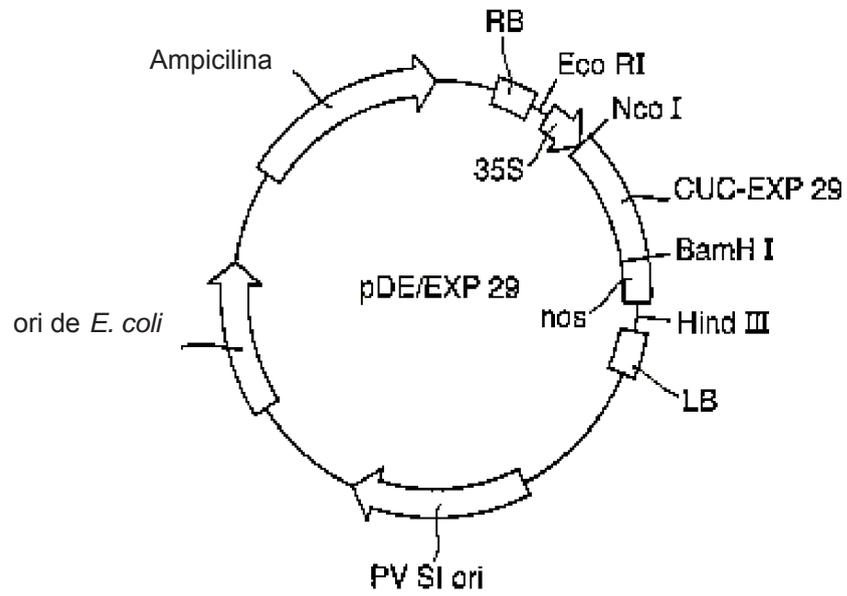


Fig.1c.

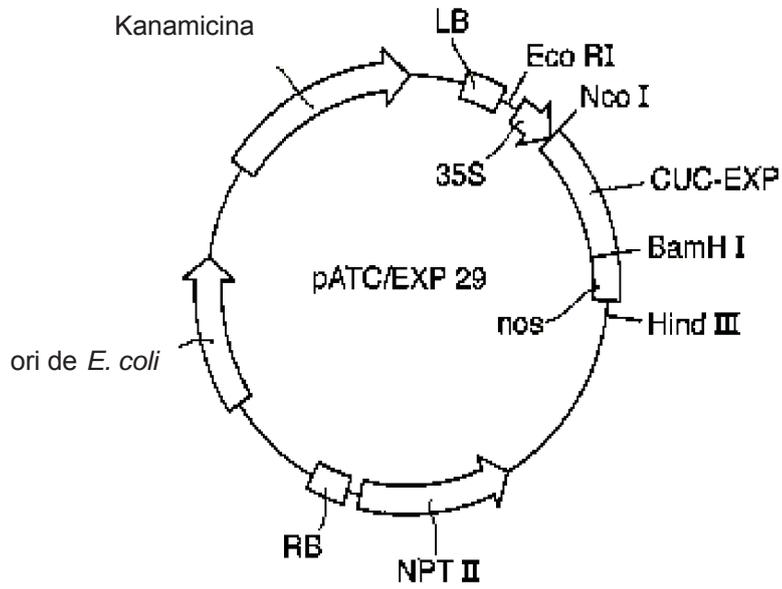


Fig.2.

