

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 329**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
D06M 101/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06776057 .9**
96 Fecha de presentación: **19.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1896596**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2008**

54 Título: **MÉTODOS PARA ALTERAR LA REACTIVIDAD DE PAREDES CELULARES DE PLANTAS.**

30 Prioridad:
24.06.2005 EP 05076488
11.07.2005 US 698182 P
25.04.2006 EP 06008463

73 Titular/es:
BAYER BIOSCIENCE N.V.
TECHNOLOGIEPARK 38
9052 GENT, BE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.02.2012

72 Inventor/es:
DE BLOCK, Marc;
MEULEWAETER, Frank;
KOCH, Rainhard y
ESSIGMANN, Bernd

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.02.2012

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 373 329 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

Métodos para alterar la reactividad de paredes celulares de plantas

5 La presente invención se refiere a la modificación de la reactividad de las paredes celulares de plantas, incluyendo paredes celulares de plantas secundarias, particularmente como se pueden encontrar en fibras naturales de plantas productoras de fibras. En particular, la presente invención se refiere a métodos para obtener fibras de algodón con reactividad alterada. La reactividad modificada se podría aplicar en métodos para teñir material derivado de planta que contiene pared celular tal como fibras naturales, usando colorantes reactivos con la fibra, para mejorar, por ejemplo, la durabilidad del color, o para reducir los volúmenes de efluentes gastados usados durante el proceso de tinción. La reactividad modificada se podría aplicar también para mejorar la reactividad de las fibras naturales con agentes reaccionantes tales como retardantes de la llama, agua, aceite y repelentes de la suciedad, agentes contra los pliegues, suavizantes, agentes antiestáticos, agentes de blanqueamiento fluorescente, etc.

Antecedentes de la invención

15 Las fibras naturales, incluyendo fibras naturales que contienen celulosa procedentes de plantas, tales como algodón y lino, se han usado por la humanidad desde hace más de 5000 años. Sin embargo, las fibras que contienen celulosa natural no poseen la versatilidad química de las fibras sintéticas, debido a la naturaleza inerte relativa de la celulosa, que consiste en monómeros de glucosa enlazados β -1-4.

20 Esta naturaleza inerte relativa es, por ejemplo, manifiesta durante el proceso de tinción de fibras de algodón y tejidos. Generalmente se usan dos tipos de colorantes para teñir el algodón: los colorantes directos, y los colorantes reactivos con fibra, los cuales son ambas moléculas aniónicas. El propio algodón desarrolla una carga aniónica en agua, de modo que, sin tratamiento especial, la absorción de colorante por la fibra o el tejido es bastante elaborada.

25 Los colorantes directos crean un enlace de hidrógeno relativamente débil con el polímero de celulosa, formando una unión semipermanente. Los colorantes directos son más fáciles de usar y más baratos que los colorantes reactivos con fibra, pero no soportan bien el lavado. Los colorantes reactivos con fibra son moléculas que combinan cromóforos con un grupo reactivo que forma fuertes enlaces covalentes con la fibra por medio de la reacción con grupos hidroxilo. Los enlaces covalentes proporcionan una buena resistencia de la fibra teñida frente al lavado. La durabilidad del color se puede mejorar usando fijadores catiónicos.

30 Durante el proceso de tinción, se necesitan grandes cantidades de electrolitos para proteger los colorantes aniónicos frente a las cargas aniónicas de la fibra. Los colorantes sin reaccionar (hasta 40%) tienen que ser eliminados a través de una etapa de lavado conocida como arenado, generando grandes volúmenes de efluentes, que también contienen los electrolitos mencionados anteriormente.

Por lo tanto, la provisión de una carga eléctrica positiva a la fibra de celulosa, por ejemplo incorporando compuestos químicos cargados positivamente, podría mejorar la capacidad de coloración de las fibras de celulosa natural, así como mejorar cualquier reacción química de la fibra de celulosa modificada con compuestos químicos cargados negativamente. También haría posible el uso de colorantes ácidos.

35 Varias publicaciones han descrito la incorporación en o el revestimiento de oligómeros de quitosano en fibras de celulosa para obtener mezclas de quitosano-celulosa, hilos o tejidos. El quitosano es un polímero cargado positivamente de glucosamina, que se puede obtener mediante desacetilación de quitina, por ejemplo mediante tratamientos alcalinos. La propia quitina es un polímero de N-acetilglucosamina (GlcNac) enlazado β -1-4.

La solicitud de patente US 2003/0123120 describe el revestimiento de fibras naturales con quitosano.

40 Liu et al. (Carbohydrate Polymers 44 (2003) 233-238) describe un método para revestir fibras de algodón con quitosano, mediante oxidación del hilo de algodón con peryodato potásico a 60°C en agua, y tratamiento subsiguiente con una disolución de quitosano en ácido acético acuoso. Con el revestimiento de quitosano, la superficie de la fibra de algodón se torna fisiológica y biológicamente activa. Puesto que la reactividad química del grupo amino es mayor que la del grupo hidroxilo de monómeros de celulosa, la fibra tiene más potencial para la modificación química adicional. Además, la superficie lisa de la fibra de algodón se torna áspera, sugiriendo un mayor potencial para la absorción de fármaco y la liberación controlada del mismo.

Basándose en la función fisiológica de quitosano para inhibir, por ejemplo, dermatofitos, muchas ropas, tejidos y fibras funcionales emplean fibras con mezcla de celulosa-quitosano, conjugados de fibra de celulosa con quitosano, y tejidos revestidos con resinas que contienen quitosano.

50 El documento WO 00/09729 describe la expresión de genes de quitina sintasa y de quitina desacetilada para alterar la pared celular para usos industriales y resistencia mejorada a enfermedades. Específicamente, los usos citados son: proporcionar una única fuente vegetal de celulosa, quitina y quitosano, incrementar la resistencia a la tracción, e incrementar la ruptura frágil. Los genes de quitina sintasa sugeridos específicamente derivan de organismos

fúngicos. No se proporcionan datos experimentales sobre la producción de quitina o quitosano en las plantas, ni sobre la incorporación de los mismos en las paredes celulares de plantas.

5 La técnica anterior sigue así careciendo de la provisión de métodos para obtener plantas a partir de las cuales se pueden aislar paredes celulares de plantas, particularmente paredes celulares secundarias, tales como fibras naturales, que contengan grupos químicos cargados positivamente y/o grupos químicos que son más reactivos que los grupos hidroxilo de celulosa. Estos y otros problemas se resuelven como se describe en lo sucesivo en las diferentes realizaciones, ejemplos y reivindicaciones.

Sumario de la invención

10 Brevemente, en una realización, la invención proporciona un método para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente o polisacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente en la pared celular secundaria de una célula vegetal, que comprende introducir un gen quimérico en la célula de la planta, por medio de lo cual el gen quimérico comprende un promotor expresable por la planta ligado operablemente a una región de ADN que codifica una N-acetilglucosamina transferasa, en la que la N-acetilglucosamina transferasa es una quitina sintasa que comprende una secuencia de anclaje señal para dirigirla a las membranas del aparato de Golgi; y una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación. En una realización particular, la planta es algodón, y los oligosacáridos y polisacáridos cargados positivamente se incorporan en las paredes de la célula secundaria que constituyen la fibra de algodón.

20 En otra realización de la invención, se proporciona un método para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente o polisacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria de una célula vegetal, que comprende introducir un gen quimérico en la célula vegetal, comprendiendo el gen quimérico un promotor expresable por la planta ligado operablemente a una región de ADN que codifica una proteína de nodulación C; y una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación. Nuevamente, en una realización específica, la planta es algodón, y los oligosacáridos y polisacáridos cargados positivamente se incorporan en las paredes celulares secundarias que constituyen la fibra de algodón.

25 También se describe un método para incrementar la cantidad de oligosacáridos o polisacáridos en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria de una célula vegetal, comprendiendo el método

i. introducir un gen quimérico en la célula vegetal, comprendiendo dicho gen quimérico los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente:

1. un promotor expresable por la planta;
- 30 2. una región de ADN que codifica quitina sintasa; y
3. una terminación de la transcripción de una región de poliadenilación,

ii. aplicar a la célula vegetal transgénica una cantidad eficaz de N-acetilglucosamina, glucosamina-6-fosfato, N-acetilglucosamina-6-fosfato, N-acetilglucosamina-1-fosfato o UDP-N-acetilglucosamina.

35 Se describen además paredes celulares de planta, que comprenden una cantidad incrementada de polisacáridos u oligosacáridos, particularmente oligosacáridos cargados positivamente, tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligo-glucosaminas, preferiblemente oligómeros de N-acetilglucosamina o glucosamina con un grado de polimerización entre 3 y 10, particularmente entre 3 y 5. Tales paredes celulares de planta son obtenibles mediante los métodos de la invención. Estas paredes celulares de planta se pueden someter a modificación química adicional.

40 También se describen aquí fibras de algodón que comprenden una cantidad incrementada de oligosacáridos cargados positivamente mencionados aquí, e hilos, tejidos que comprenden tales fibras de algodón. Las fibras de algodón se pueden usar como tales, o se pueden someter a modificación química adicional, incluyendo tinción. Estas fibras de algodón se pueden identificar, por ejemplo, a través de su unión incrementada de colorantes aniónicos, incluyendo Rojo Congo, a través de su unión incrementada de aglutinina de germen de trigo o a través de su reactividad incrementada con colorantes reactivos con amina cuando se comparan con fibras de algodón obtenidas a partir de plantas de algodón de una estirpe isogénica que no contiene un gen quimérico de N-acetilglucosamina transferasa como se describe aquí. La presencia y/o la cantidad de oligosacáridos en las fibras de algodón también se pueden determinar directamente a través de, por ejemplo, cromatografía de capa fina de altas prestaciones (HPTLC).

50 En otra realización, la invención se refiere al uso de un gen quimérico que comprende una región que codifica una quitina sintasa que comprende una secuencia de anclaje señal para dirigirla al aparato de Golgi de una célula vegetal, o una proteína de nodulación C para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular de una célula vegetal, o para incrementar la reactividad de paredes celulares de planta para modificaciones químicas de tales paredes celulares de planta.

La invención también proporciona genes quiméricos que comprenden las siguientes regiones de ADN enlazadas operablemente: un promotor expresable por la planta; una región de ADN que codifica una quitina sintasa que comprende una secuencia de anclaje señal para dirigirla al aparato de Golgi de dicha célula vegetal, o una proteína de nodulación C; y una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas NODC. Los restos de aminoácidos conservados en todas las proteínas se indican en negrita. ROT_NODC_RHILP: proteína NODC de *Rhizobium leguminosarum* (biovar phaseoli); ROT_NODC_BRAJA: proteína NODC de *Bradyrhizobium japonicum* (SEC ID No.); ROT_NODC_RHIS3: proteína NODC de *Rhizobium sp.* (cepa N33); ROT_NODC_RHISN: proteína NODC de *Rhizobium sp.*; ROT_NODC_RHILV: proteína NODC de *Rhizobium leguminosarum* (biovar viciae); y ROT_NODC_AZOCA: proteína NODC de *Azorhizobium caulinodans*.

Figura 2: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas NODC. Los restos de aminoácidos conservados en todas las proteínas se indican en negrita. ROT_NODC_BRAJA: proteína NODC de *Bradyrhizobium japonicum* (SEC ID No.); ROT_NODC_RHIS3: proteína NODC de *Rhizobium sp.* (cepa N33); ROT_NODC_RHISN: proteína NODC de *Rhizobium sp.*; ROT_NODC_RHILV: proteína NODC de *Rhizobium leguminosarum* (biovar viciae) y ROT_NODC_AZOCA: proteína NODC de *Azorhizobium caulinodans*.

Figura 3: Fotografías de microscopía fluorescente realizada en células cilíadas radicales de raíces fasciculadas que contienen el gen quimérico 35S::NodC.

Panel A: corte óptico de una célula cilíada radicular teñida con Calcofluor; B: corte óptico de una célula cilíada radicular teñida inmunohistoquímicamente en busca de la presencia de N-acetilglucosamina; C: superposición de cortes ópticos del panel A y panel B.

Figura 4: Fotografías de microscopía fluorescente realizada sobre células cilíadas radicales de raíces fasciculadas que contienen el gen quimérico 35S::NODC-EGFP-

Panel A: superposición de los cortes ópticos de los paneles B, C y D. B: corte óptico de una célula cilíada radicular teñida con Calcofluor; C: corte óptico de una célula cilíada radicular teñida para visualizar el aparato de Golgi; D: corte óptico de una célula cilíada radicular que visualiza la fluorescencia mediante EGFP.

Figura 5: Fotografías de microscopía fluorescente realizada sobre células cilíadas radicales de raíces fasciculadas que contienen el gen quimérico 35S::quitina sintasa.

Panel A: corte óptico de una raíz fasciculada cultivada en presencia de 50 mM de N-acetilglucosamina, teñida en busca de la presencia de N-acetilglucosamina; Panel B: corte óptico de una raíz fasciculada cultivada en presencia de ninguna N-acetilglucosamina extra, teñida en busca de la presencia de N-acetilglucosamina en la pared celular.

Figura 6: Cromatograma de capa fina de altas prestaciones de quitooligómeros procedentes de material de pared celular aislado de raíces fasciculadas de Arabidopsis.

Las muestras de las dos estirpes exteriores (1, 12) son disoluciones patrón de N-acetilglucosamina, quitobiosa, quitotriosa, quitotetraosa y quitopentaosa. Estirpes 2 a 5: material de pared celular extraído de cultivos de raíz fasciculada iniciados mediante *Agrobacterium rhizogenes* con un gen quimérico que comprende un promotor CaMV35S ligado a una región codificante nodC; estirpes 6 a 9: material de pared celular extraído de cultivos de raíz fasciculada iniciados mediante *Agrobacterium rhizogenes* con un gen quimérico que comprende un promotor CaMV35S ligado a una región codificante nodC fusionada a eGFP; estirpes 10 y 11: material de pared celular extraído de cultivos de raíz fasciculada iniciados mediante *Agrobacterium rhizogenes* con un gen quimérico que comprende un promotor CaMV35S ligado a una región codificante de fosfinotricina acetil transferasa. La TLC se llevó a cabo en acetonitrilo (76): agua (24): 0,5% de ácido bórico (10).

Figura 7: HPTLC bidimensional sobre el material de pared celular aislado de raíces fasciculadas de Arabidopsis que se han sometido a digestión de quitinasa.

El material de pared celular de control (panel izquierdo) se extrajo de cultivos de raíz fasciculada iniciados mediante *Agrobacterium rhizogenes* con un gen quimérico que comprende un promotor CaMV35S ligado a una región que codifica fosfinotricina acetiltransferasa; el material de pared celular experimental (panel derecho) se extrajo de cultivos de raíz fasciculada mediante *Agrobacterium rhizogenes* con un gen quimérico que comprende un promotor CaMV35S ligado a una región codificante nodC fusionada a eGFP. Los sacáridos monoméricos (N-acetilglucosamina) y quitosacáridos diméricos (quitobiosa) se pueden detectar en

el material experimental, pero no en el material de control. La TLC se llevó a cabo en acetonitrilo (76): agua (24): 0,5% de ácido bórico (10).

Figura 8: HPTLC de material de pared celular aislado de plantas de Arabidopsis transgénicas.

5 Estirpe 1: disolución patrón de quitooligosacáridos; Estirpe 2: 0,1 de glucosamina; Estirpes 3 y 4: 4 μ l y 8 μ l, respectivamente, de material de pared celular aislado de raíces de Arabidopsis de control; Estirpes 5 y 6: 4 μ l y 8 μ l, respectivamente, de material de pared celular aislado de raíces transgénicas de Arabidopsis que comprenden un gen quimérico CaMV35S::nodC; Estirpes 7 y 8: 4 μ l y 8 μ l, respectivamente, de material de pared celular aislado de raíces transgénicas de Arabidopsis que comprenden un gen quimérico CaMV35S::nodC-eGFP. La estirpe discontinua indica la cantidad aumentada de quitotriosa, particularmente
10 las estirpes 5 y 6.

Figura 9: Microscopía de fluorescencia de fibras de algodón que se hacen reaccionar con aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con Alexa fluor 555.

15 Panel izquierdo: fibras de algodón de plantas de algodón transgénicas que contienen un gen CaMV35S::NodC. Panel derecho: fibras de algodón procedentes de plantas de algodón de control. Bajo luz UV, se puede observar una fluorescencia brillante en las fibras procedentes de las plantas de algodón transgénicas, indicando la presencia de quitooligómeros en estas fibras.

Descripción detallada de diferentes realizaciones de las invenciones

20 La actual invención se basa en el hallazgo de que la expresión de N-acetilglucosamina transferasa del tipo *NODC* en células vegetales conduce a la incorporación de oligómeros de N-acetilglucosamina en las paredes celulares de planta. Los oligómeros de GlcNAc se asociaron inesperadamente de forma estrecha con la pared celular, y no se disolvieron de esa pared celular por diversos tratamientos. Sorprendentemente, la síntesis de los oligómeros de GlcNAc no requirió adición externa de GlcNAc al medio de crecimiento, como se observó con otras quitina sintasas. Además, e igualmente sorprendente, la proteína *NODC* también se asoció estrechamente con las membranas del aparato de Golgi, además de la asociación con la membrana celular conforme lo esperado. Cuando la N-acetilglucosamina transferasa del tipo *NODC* se expresó en plantas de algodón, los oligómeros de GlcNAc se
25 incorporaron en las fibras de algodón, conduciendo a fibras de algodón más reactivas.

De este modo, en una primera realización de la invención, se proporciona un método para aumentar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria de una célula vegetal, en el que el método comprende la etapa de introducir un gen quimérico en la célula vegetal, y comprendiendo el gen quimérico los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente:
30

- un promotor expresable por la planta
- una región de ADN que codifica proteína de nodulación C; y
- una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación.

35 La proteína de nodulación C ("proteína *NODC*") y su gen codificante están implicados en la síntesis de las señales de lipoquitooligosacárido o quitooligómeros acetilados (factores *Nod*) que conducen a la formación de nódulos, típica de la simbiosis entre Rhizobiaceae y plantas leguminosas.

40 Los productos del gen *nod* más cruciales requeridos para la síntesis de estos lipoquitooligosacáridos son *NODA*, *NODB* y *NODC*. En ausencia de otros productos de gen *nod*, pueden formar una señal de núcleo que consiste en oligómeros de cuatro o cinco restos de N-acetilglucosamina que poseen un grupo acilo enlazado por N. La función de cada una de las tres proteínas en la síntesis de los factores de nodulación es bien conocida: *NODC* es una N-glucosaminiltransferasa que produce la cadena de quitooligosacárido; el grupo N-acetilo del resto de N-acetilglucosamina no reductor de la cadena de quitooligosacárido es eliminado por *NODB*, que actúa como una quitina oligosacárido desacetilasa; *NODA* está implicada en la unión de la cadena acílica al grupo amino libre generado por la acción de *NODB*. Otros factores *Nod*, codificados por otros genes *nod*, proporcionan cualquiera de
45 los grupos químicos decorativos que discriminan los diferentes factores de nodulación. Para los fines de la presente invención sólo son importantes las proteínas *NODC* y genes codificantes.

50 La proteína *NODC* es una proteína bien caracterizada (para un repaso, véase Kamst y Spaink, 1999, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 11, p. 187-199). Pertenece a la familia de proteínas de β -polisacárido sintasa que están implicadas en la síntesis de polisacáridos lineales que contienen restos de monosacárido ligados por β . Las enzimas que están estructuralmente muy estrechamente relacionadas con *NODC* son transferasas implicadas en la síntesis de quitina (N-acetilglucosaminas enlazadas por β -1-4); celulosa (el polímero de restos de glucosa enlazados por β -1-4); ácido hialurónico (un copolímero de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico) y oligosacáridos de quitina producidos durante el desarrollo precoz de embriones de pez cebra. Se pueden reconocer seis regiones

cortas conservadas entre estas proteínas. Para las proteínas NODC, estas secuencias cortas corresponden a:

- 1) un resto K en la posición 23 de SEC ID No 1 (NODC de *Azorhizobium caulinodans*)
- 2) la secuencia DDG en la posición 86-88 de SEC ID No 1
- 3) la secuencia VSDT en la posición 137-141 de SEC ID No 1
- 5 4) la secuencia GPCAMYR en la posición 207-213 de SEC ID No 1
- 5) la secuencia GEDRHL en la posición 237-242 de SEC ID No 1; y
- 6) la secuencia QQLRW en la posición 274-278 de SEC ID No 1.

Sin embargo, es importante notar que pueden existir algunas proteínas NODC, o sus variantes, en las que una o más de las secuencias de consenso mencionadas anteriormente no están absolutamente conservadas.

- 10 las proteínas NODC también están frecuentemente caracterizadas por tramos hidrófobos de restos de aminoácidos que representan dominios transmembranarios (Barney et al. 1996, *Molecular Microbiology* 19, p. 443-453). El dominio hidrófobo N-terminal atraviesa la membrana bacteriana en una orientación $N_{out}-N_{in}$, estando expuesto el dominio hidrófilo grande adyacente hacia citoplasma bacteriano. Parece que esta orientación es independiente de la presencia de la región o regiones hidrófobas próximas al término C, que contienen potencialmente tres cruces de la
- 15 membrana, de manera que el término C de NODC está situado normalmente en el periplasma bacteriano.

El gran bucle hidrófilo de NODC también tiene otra similitud estructural con regiones similares en las otras β -glucosil transferasas. Se ha propuesto que esta región está formada por un dominio A (que se extiende desde alrededor del resto 45 a 140 en la secuencia de SEC ID No 4), que consiste en láminas β y hélices α alternas, y un dominio B (que corresponde a los restos 215-280 de SEC ID No 4), considerado el responsable de la procesabilidad de NODC. En

20 el dominio A, se conservan dos restos de aspartato (restos 88 y 139 de SEC ID No 4); en el dominio B, también se conserva un resto de aspartato y el motivo QXXRW (resto 240 y 279-280 de SEC ID No 4), considerados cruciales para la actividad catalítica.

Cuando las diferentes proteínas NODC se comparan entre ellas, se revelan las secuencias de aminoácidos que están más conservadas. La Figura 1 representa un alineamiento de diferentes proteínas NODC de SEC ID No 1, 2, 8, 4, 7, 5, e indica un número de restos conservados entre las diferentes proteínas NODC, incluyendo (por orden):

25

- la secuencia PXVDVIXPXXNE
- la secuencia VDDGSXN
- la secuencia GDXXLDVSDTXXXXDV
- la secuencia GXXMGQ
- 30 - la secuencia DMEYWLACNEERXXQXRFGXVMXCXGXCMYR
- la secuencia FRTXYXPAXAXTXVP
- la secuencia YLXQQLRWARSTXRXTXL
- la secuencia QNXGXXLL
- la secuencia RFXFXXHXXXNXXLXPLKXYALXT

35 La Figura 2 representa un alineamiento de un subconjunto de diferentes proteínas NODC, que muestra restos incluso más conservados, tales como:

- la secuencia WLTRLIDMEYWLACNEERXXQXRFGXVMCCCGPCAMYRRS
- la secuencia LLXXYEXQXFXGXPSXFGEDRHLTILMLXAGFRTXYVPAXAXTXVP
- la secuencia YLRQQLRWARSTXRDTXLA

40 La longitud de la cadena principal de oligosacárido en los oligosacáridos de lipoquitina producidos por diferentes *Rhizobiaceae* varía entre dos y seis restos. Se ha demostrado que la proteína de nodulación NODC es un determinante importante de la longitud de la cadena del oligosacárido de quitina en la síntesis de la cadena de quitoooligosacárido (Kamst et al., 1997, *Journal of Bacteriology* 179, p 2103-2108).

Las regiones codificantes que codifican una N-acetilglucosamina transferasa del tipo NODC pueden ser obtenidas

directamente de bacterias que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* o *Sinorhizobium*. Sin embargo, estará claro inmediatamente que tales regiones codificantes también se pueden obtener sintéticamente, incluso con un uso de codón adaptado a la planta, particularmente la planta productora de fibra en la que se introduce el gen quimérico que sobreexpresa la proteína de tipo NODC.

A partir de bases de datos, hay disponibles diferentes secuencias para proteínas NODC tales como las secuencias proteicas identificadas mediante los siguientes números de acceso: CAA67139, CAA608779, CAA51774, CAA51773, CAA25811, CAA25810, CAA25814, CAA68619, CAA2350, CAD31533, CAC05896, CAH04369, CAB56055, NP_629203, P26024, P17862, BAB524500, AAX30050, AAX30049, E38180, JQ0396, ZZZRC4, ZZZRCL, A95321, C23766, C26813, NP_659761, NP_443883, NP_106714, NP_768667, NP_435719, BAC47292, AAU11365, AAU11364, AAU11363, AAU11362, AAU11361, AAU11360, AAU11359, AAU11358, AAU11357, AAU11356, AAU11355, AAU11354, AAU11353, AAU11352, AAU11351, AAU11350, AAU114349, AAU11348, AAU11347, AAU11346, AAU11345, AAU11344, AAU11343, AAU11342, AAU11341, AAU11340, AAU11339, AAU11338, AAK65131, AAS91748, P04679_2, P04679_1, P04679, P72334, Q53513, P50357, P04678, P50536, P53417, Q07755, P04341, P04340, P24151, P04677, CAD90588, CAD90587, CAD90586, CAD90585, CAD90584, CAD90583, CAD90257, CAD43933, AAM54775, AAN62903, S34305, S09522, S07304, AAL88670, CAD29957, CAD29956, CAD29955, CAD29954, CAD29953, CAD29952, CAD29951, CAD29950, CAD29949, CAC42489, AAK53549, AAK53548, AAK50872, AAK39967, AAK39966, AAK39965, AAK39964, AAK39963, AAK39962, AAK39961, AAK39960, AAK39959, AAK39958, AAK39957, AAK39956, AAG44125, AAK00157, AAG60998, AAB71694, AAB16897, AAV80567, AAB95329, BAA24092, BAA06089, BAA06086, BAA06085, BAA06083, BAA06090, BAA06082, BAA06087, BAA06088, BAA06084, AAB91695, AAB51164, AAB47353, AAB34509, AAB24745, 1615305E, 1615305D, 165305C, CAA26311, CAA26310, CAA3731, AAA63602 o 26226.

en la Tabla 1 se resumen otras entradas en las bases de datos UNIPROT que se refieren a proteínas NODC de longitud completa.

Tabla 1: Proteínas NODC de longitud completa

UniProt/UniParc ID	Accesos UniProt	Nombre de la Especie	Longitud
NODC_BRAJA	P26024	<i>Bradyrhizobium-japonicum</i>	485
NODC_AZOCA	Q07755	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	395
Q6PTX8_9RHIZ	Q6PTX8	<i>Rhizobium sp.</i> SIN-1	408
Q70YC2_9BURK	Q70YC2	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	450
Q6EX51_SINSB	Q6EX51	<i>Sinorhizobium sp.</i>	452
NODC_RHIS3	P72334	<i>Rhizobium sp.</i>	450
NODC_RHILP	P24151	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	428
Q8GNH5_RHIME	Q8GNH5	<i>Rhizobium meliloti</i>	421
Q53254_RHITR	Q53254	<i>Rhizobium tropici</i>	452
Q9AQ23_BRASW	Q9AQ23	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	452
NODC_RHISN	P50357	<i>Rhizobium sp.</i>	413
Q8KLG3_RHIET	Q8KLG3	<i>Rhizobium etli</i>	443
Q9RAN5_MESS7	Q9RAN5	<i>Mesorhizobium sp.</i>	416
Q9Z316_BRASS	Q9Z316	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	481
NODC_RHILO	P17862	<i>Rhizobium loti</i>	424
Q8KJI5_RHILO	Q8KJI5	<i>Rhizobium loti</i>	424
NODC_RHIGA	P50356	<i>Rhizobium galegae</i>	433
NODC_RHIME	P04341	<i>Rhizobium meliloti</i>	426

Q9R614_RHIME	Q9R614	<i>Rhizobium meliloti</i>	424
052478_RHIME	052478	<i>Rhizobium meliloti</i>	402
Q52971-RHIME	Q52971	<i>Rhizobium meliloti</i>	402
NODC_RHILV	P04340	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	424

Sin embargo, estará claro que también se pueden usar para el mismo efecto en los métodos según la invención variantes de proteínas NODC, en las que uno o más restos de aminoácidos se han suprimido, sustituido o insertado, que se pueden deducir de las secuencia de aminoácidos mencionadas anteriormente, con la condición de que la actividad enzimática no cambie. Estas proteínas NODC variantes pueden tener alrededor de 95% de identidad de secuencia con una cualquiera de las proteínas NODC mencionadas aquí. Un método para determinar la actividad enzimática de proteínas NODC in vitro se ha descrito, por ejemplo, por Kamst et al., 1997 Journal of Bacteriology, 179, p. 2103-2108.

De este modo, como se usa aquí, una "N-acetilglucosamina transferasa que es del tipo NODC" es una N-acetilglucosamina transferasa que cataliza la transferencia del resto GlcNAc de UDP-GlcNAc hasta un oligosacárido de quitina naciente. Preferiblemente, la proteína contiene las regiones conservadas que se pueden encontrar comparando las diferentes proteínas NODC.

Particularmente adecuadas para los métodos de la invención son las proteínas enumeradas en SEC ID No 1 a SEC ID No 9, particularmente la proteína enumerada en SEC ID No 1, y los fragmentos de ADN que codifican tal proteína.

Se ha observado (véase la sección experimental) que las proteínas NODC, cuando se expresan en células vegetales, están colocalizadas con las membranas del aparato de Golgi, además de la colocalización con el plasmalema. Para llegar a la incorporación de quitooligosacáridos en la pared celular de planta, no se requiere ninguna alimentación con GlcNAc. Sin embargo, cuando se usan quitina sintasas de origen fúngico, estas proteínas no están colocalizadas con las membranas del aparato de Golgi, y es necesaria la alimentación con GlcNAc para llegar a la incorporación significativa de quitooligosacáridos en las paredes celulares. Sin pretender limitar la invención a un modo particular de acción, se piensa que los dominios de transposición de transmembrana de las proteínas NODC pueden ser más apropiados para la inserción en las membranas del aparato de Golgi que aquellos del plasmalema, y que la localización de estas proteínas soslaya la necesidad de alimentación externa con GlcNAc. La modificación de estas proteínas quitina sintasa, tales como una quitina sintasa de origen fúngico, por ejemplo una quitina sintasa de *Neurospora crassa*, para relocalizar las quitina sintasas en las membranas del aparato de Golgi, es suficiente para eliminar la necesidad de alimentación externa con GlcNAc. Tal relocalización se ha logrado ligando la proteína quitina sintasa a un péptido de anclaje señal que dirige la proteína ligada hacia membranas del aparato de Golgi.

De este modo, en otra realización de la invención, se proporciona un método para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria de una célula vegetal, que comprende la etapa de introducir un gen quimérico en la célula vegetal, comprendiendo dicho gen quimérico

- un promotor expresable por la planta
- una región de ADN que codifica una quitina sintasa que comprende una secuencia de anclaje señal para dirigirla hacia las membranas del aparato de Golgi; y
- una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación.

Como se usa aquí, la N-acetilglucosamina transferasa no está limitada a las proteínas de tipo NODC, sino también incluye quitina sintasas (quitina UDP-acetil-glucosaminil transferasas), tales como las quitina sintasas de origen fúngico. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de tales quitina sintasas se pueden encontrar en las diferentes bases de datos, incluyendo secuencias de aminoácidos con los siguientes identificadores (números de acceso): CHS1_AJECA (P30576) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) de *Ajellomyces capsulata* (*Histoplasma capsulatum*); CHS1_AJEDE (P30579) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) de *Ajellomyces dermatitidis* (*Blastomyces dermatitidis*); CHS1_ASPNG (P30581) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) de *Aspergillus niger*; CHS1_BOTCI (P49603) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) procedente de *Botrytis cinerea* (hongo de la podredumbre noble) (*Botryotinia fuckeliana*); CHS1_CANAL (P23316) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) procedente de *Candida albicans* (levadura); CHS1_CRYNV

(013356) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase IV). {GEN: Nombre = CHS1} - *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (*Filobasidiella neoformans* var. *grubii*); CHS1_EMENI (P30583) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) (fragmento). {GEN: Nombre = chs1} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*);

5 CHS1_EXODE (P30600) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase II). {GEN: Nombre = CHS1} - *Exophiala dermatitidis* (*Wangiella dermatitidis*); CHS1_EXOJE (P30585) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Exophiala jeanselmei*; CHS1_NEUCR (P29070) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 3 de Clase III). {GEN: Nombre = chs-1; Nombres de ORF = B11H24.170, NCU03611.1} - *Neurospora crassa* ; CHS1_PHAEX (P30590); quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Phaeococcomyces exophialae*; CHS1_PHYBL (P87073) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase II). {GEN: Nombre = chs1} - *Phycomyces blakesleeanus*; CHS1_RHIAT (P30592) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase I) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Rhinoclaadiella atrovirens*; CHS1_RHIOL (P30594) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1). {GEN: Nombre = CHS1} - *Rhizopus oligosporus*; CHS1_RHIRA (Q12632) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (quitina sintasa 1 de Clase II). {GEN: Nombre = CHS1} - *Rhizomucor racemosus* (*Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*); CHS1_SCHCO (P30596); quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Schizophyllum commune* (Bracket fungus); CHS1_SCHPO (P30597) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1). {GEN: Nombre = chs1; Nombres de ORF = SPAC13G6.12c, SPAC24B11.01c} - *Schizosaccharomyces pombe* (Levadura de Fisión); CHS1_TUBUN (P55003) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Tuber uncinatum* (trufa de Borgoña); CHS1_USTMA (P30598) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Ustilago maydis* (Smut fungus); CHS1_XYLBA (P30603) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS1} - *Xylohypha bantiana*; CHS1_YEAST (P08004) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1). {GEN: Nombre = CHS1; *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); CHS2_AJECA (P30577) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (de Clase III quitina sintasa 2) *Ajellomyces capsulata* (*Histoplasma capsulatum*); CHS2_AJEDE (P30580) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (quitina sintasa 2 de Clase II) {GEN: Nombre = CHS2} - *Ajellomyces dermatitidis* (*Blastomyces dermatitidis*) CHS2_ASPNG (P30582); quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (quitina sintasa 2 de Clase II) (Fragmento). {GEN: Nombre = chs2} - *Aspergillus niger*; CHS2_CANAL (P30572) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2). {GEN: Nombre = CHS2} - *Candida albicans* (Levadura); CHS2_EXODE (P30601) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (quitina sintasa 2 de Clase I). {GEN: Nombre = CHS2} - *Exophiala dermatitidis* (*Wangiella dermatitidis*); CHS2_EXOJE (P30586) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS2} - *Exophiala jeanselmei*; CHS2_NEUCR (P30589); quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2). {GEN: Nombre = chs-2; Nombres de ORF = NCU05239.1} - *Neurospora crassa* ; CHS2_PARBR (Q92444) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (quitina sintasa 2 de Clase II). {GEN: Nombre = CHS2} - *Paracoccidioides brasiliensis*; CHS2_PHAEX (P30591); quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (quitina sintasa 2 de Clase II) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS2} - *Phaeococco- myces exophialae*; CHS2_RHIAT (P30593) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (quitina sintasa 2 de Clase III) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS2} - *Rhinoclaadiella atrovirens*; CHS2_RHIOL (P30595) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2). {GEN: Nombre = CHS2} - *Rhizopus oligosporus*; CHS2_SCHPO (074756) quitina sintasa como protefina 2. {GEN: Nombre = chs2; Nombres de ORF = SPBC1709.01, SPBC1734.17} - *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de fisión); CHS2_USTMA (P30599) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS2} - *Ustilago maydis* (Smut fungus); CHS2_XYLBA (P30604) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2) (de Clase II quitina sintasa 2) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS2} - *Xylohypha bantiana* ; CHS2_YEAST (P14180); quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2). {GEN: Nombre = CHS2; OrderedLocusNames=YBR038W; Nombres de ORF = YBR0407} - *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); CHS3_AJECA (P30578) quitina sintasa 3 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 3) (quitina sintasa 3 de Clase II) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS3} - *Ajellomyces capsulata* (*Histoplasma capsulatum*); CHS3_CANAL (P30573) quitina sintasa 3 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 3) (de Clase IV quitina sintasa 3). {GEN: Nombre = CHS3} - *Candida albicans* (Levadura); CHS3_EXODE (P30602) quitina sintasa 3 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 3) (quitina sintasa 3 de Clase III). {GEN: Nombre = CHS3} - *Exophiala dermatitidis* (*Wangiella dermatitidis*); CHS3_EXOJE (P30587); quitina sintasa 3 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 3) (de Clase III quitina sintasa 3) (Fragmento). {GEN: Nombre = CHS3} - *Exophiala jeanselmei*; CHS3_NEUCR (P30588) quitina sintasa 3 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil- glucosaminil transferasa 3). {GEN: Nombre = chs-3; Nombres de ORF = G65A3.040} - *Neurospora crassa*; CHS3_YEAST (P29465) quitina sintasa 3 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 3) (quitina sintasa 3 de Clase IV). {GEN: Nombre = CHS3; Synonyms=CAL1, CSD2, DIT101, KIT2; Ordered Locus Names=YBR023C; ORF-

Names=YBR0305} - *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast); CHS4_MAGGR (013353); quitina sintasa 4 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 4) (quitina sintasa 4 de Clase IV). {GEN: Nombre = CHS4} - Mag- naporthes grisea (Rice blast fungus) (*Pyricularia grisea*); CHS4_NEUCR (Q01285) quitina sintasa 4 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 4) (quitina sintasa 4 de Clase IV). {GEN: Nombre = chs-4; Nombres de ORF = NCU09324.1} - *Neurospora crassa*; CHS5_USTMA (013394) quitina sintasa 5 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 5) (quitina sintasa 5 de Clase IV). {GEN: Nombre = CHS5} - *Ustilago maydis* (*Smut fungus*); CHS6_USTMA (O13395) quitina sintasa 6 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 6) (quitina sintasa 6 de Clase V). {GEN: Nombre = CHS6} - *Ustilago maydis* (*Smut fungus*); CHSA_AMPQU (Q12564); quitina sintasa A (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa A) (quitina sintasa A de Clase I). {GEN: Nombre = CHSA} - *Ampelomyces quisqualis*; CHSA_EMENI (P30584) quitina sintasa A (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa A) (quitina sintasa A de Clase II). {GEN: Nombre = chsA; Sinónimos = chs2} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHSB_EMENI (Q00757) quitina sintasa B (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa B) (quitina sintasa B de Clase III). {GEN: Nombre = chsB} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHSC_ASPFU (Q92197) quitina sintasa C (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa C) (quitina sintasa C de Clase III). {GEN: Nombre = chsC} - *Aspergillus fumigatus* (*Sartorya fumigata*); CHSD_ASPFU (P78746) quitina sintasa D (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa D) (quitina sintasa D de Clase VI). {GEN: Nombre = chsD} - *Aspergillus fumigatus* (*Sartorya fumigata*); CHSD_EMENI (P78611) quitina sintasa D (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa D) (quitina sintasa D de Clase V). {GEN: Nombre = chsD; Sinónimos = chsE} - *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); CHSG_ASPFU (P54267); quitina sintasa G (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa G) (quitina sintasa G de Clase III). {GEN: Nombre = chsG} - *Aspergillus fumigatus* (*Sartorya fumigata*); CHSX_USTMA (Q99126) quitina sintasa 1 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 1). {GEN: Nombre = CHS1} - *Ustilago maydis* (*Smut fungus*); CHSY_USTMA (Q99127) quitina sintasa 2 (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa 2). {GEN: Nombre = CHS2} - *Ustilago maydis* (*Smut fungus*) or CHS_SAPMO (P48017) quitina sintasa (EC 2.4.1.16) (quitina-UDP acetil-glucosaminil transferasa). {GEN: Nombre = CHS} - *Saprolegnia monoica*.

Las quitina sintasas están equipadas con secuencias de anclaje señal (heterólogas) que dirigen la quitina sintasa hacia las membranas del aparato de Golgi. Tales secuencias son conocidas en la técnica, incluyendo las secuencias en y adyacentes al segmento transmembránico de α -2,6-sialil transferasa (particularmente los primeros 44 ó 52 aminoácidos de las mismas; Munro et al. 1991, EMBO Journal, 10: 3577-3588); la secuencia de anclaje señal procedente de galactosil transferasa humana (particularmente los primeros 60 aminoácidos de la misma) o la secuencia de anclaje señal procedente del homólogo de *Arabidopsis* del receptor de levadura HDEL receptor (AtERD2) (Saint-Jore et al., 2002, The Plant Journal, 29: 661-678), la secuencia de anclaje señal procedente de la proteína β 1,2-xilosil transferasa (particularmente los primeros 36 aminoácidos de la misma; Pagny et al., 2003, The Plant Journal 33: 189-203) o las secuencias de anclaje señal de N-acetil-glucosaminil transferasa I (particularmente los primeros 77 aminoácidos de las mismas; Essl et al. 1999, FEBS Lett. 453:169-173). Otras señales dirigidas al aparato de Golgi, a emplear mediante fusión en el término C de la N-acetilglucosamina transferasa, incluyen la secuencia de aminoácidos "YYHDL", como se puede encontrar en la proteína DAGAT1 de *Arabidopsis*, o "LKLEI" como se puede encontrar en DAGAT2 de *Arabidopsis*. La fusión de tales secuencias de anclaje señal a quitina sintasas, enlazando fragmentos de ADN que codifican los polipéptidos respectivos, se puede lograr usando técnicas de ADN recombinante estándar. Las N-acetilglucosamina transferasas del tipo NODC también se pueden enlazar operablemente a secuencias de anclaje señal dirigidas al aparato de Golgi.

También se describe aquí un método proporcionado para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria de una célula vegetal, que comprende la etapa de introducir un gen quimérico en la célula vegetal, en el que el gen quimérico comprende los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente

- un promotor expresable por la planta;
- una región de ADN que codifica quitina sintasa (quitina UDP-acetilglucosamina transferasa), particularmente de origen fúngico; y
- una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación

y que comprende además la etapa de aplicar una cantidad efectiva de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina-1-fosfato o N-acetilglucosamina-6-fosfato o glucosamina-6-fosfato a la célula vegetal o a la planta.

Los genes quiméricos según la invención comprenden un promotor expresable por la planta. Como se usa aquí, el término "promotor" representa cualquier ADN que es reconocido y está unido (directa o indirectamente) mediante una ARN polimerasa dependiente de ADN durante el inicio de la transcripción. Un promotor incluye el sitio de iniciación de la transcripción, y sitios de unión para factores de iniciación de la transcripción y ARN polimerasa, y puede comprender otros diversos sitios (por ejemplo, potenciadores), en los cuales se pueden unir proteínas

reguladoras de la expresión génica.

Como se usa aquí, la expresión "promotor expresable por la planta" significa una secuencia de ADN que es capaz de controlar (iniciar) la transcripción en una célula vegetal. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal, es decir, ciertos promotores de origen vírico o bacteriano, tales como el CaMV35S, el promotor del virus del clavo subterráneo No 4 o No 7, o promotores del gen T-DNA, y similares.

Un promotor expresable por la planta que controla el inicio y el mantenimiento de la transcripción, preferiblemente en células de fibras, es un promotor que conduce la transcripción de la región de ADN enlazada operablemente a un nivel en las células de fibras y las células de la epidermis subyacentes mayor que en otras células o tejidos de la planta. Tales promotores incluyen el promotor de algodón de un gen de β -tubulina específico de fibra (como se describe en el documento WO 0210377), el promotor de algodón de un gen de actina específico de fibra (como se describe en el documento WO 0210413), el promotor de un gen de proteína de transferencia de lípido específico de fibras procedente de algodón (como se describe en el documento US 5792933), un promotor de un gen de expansina procedente de algodón (documento WO 9830698), o un promotor de un gen de quitinasa en algodón (documento US 2003106097), o los promotores de los genes específicos de fibras descritos en los documentos US 6259003 o US 6166294.

Se describen aquí paredes celulares de planta, que comprenden fibras que incluyen tales paredes celulares obtenidas a partir de células vegetales usando los métodos según la invención. Tales paredes celulares de planta comprenden oligo- o polisacáridos cargados positivamente, tales como oligómeros de N-acetilglucosamina o quitina, embebidos en la celulosa. Estas paredes celulares de planta pueden ser modificadas adicionalmente, por ejemplo parcial o completamente desacetiladas, de manera que se obtengan oligómeros que comprendan restos de glucosamina. El grupo amino de las glucosaminas resultantes es químicamente más reactivo que el grupo aminoacetilo de N-acetilglucosamina o el grupo hidroxilo de celulosa.

La pared celular de planta obtenida según los métodos de la invención, particularmente aquellas que se han sometido a una etapa de desacetilación, se puede modificar químicamente de forma adicional. Los productos que contienen tales paredes celulares de planta, tales como fibras, hilos o tejidos, tienen calidades que se asemejan a aquellas de las mezclas de celulosa-quitosano descritas en la técnica, incluyendo una capacidad mejorada para ser teñidos, una inhibición mejorada de, por ejemplo, dermatofitos, una liberación controlada de fármaco, etc.

Se describen además fibras de algodón obtenidas a partir de, o que se pueden obtener de, plantas de algodón según los métodos de la invención. En otras palabras, se describen fibras de algodón procedentes de plantas de algodón que comprenden en el genoma, tal como el genoma nuclear, de sus células un gen quimérico que comprende un promotor expresable por la planta enlazado operablemente a una región de ADN que codifica una quitina sintasa que comprende una secuencia de anclaje señal para dirigirla a las membranas del aparato de Golgi, o se describen fibras de algodón procedentes de plantas de algodón que comprenden en el genoma, tal como el genoma nuclear, de sus células un gen quimérico que comprende un promotor expresable por la planta ligado operablemente a una región de ADN que codifica la proteína de nodulación C. Además, se describen fibras de algodón procedentes de plantas de algodón que comprenden en el genoma, tal como el genoma nuclear, de sus células un gen quimérico que comprende un promotor expresable por la planta ligado operablemente a una región de ADN que codifica una quitina sintasa. Particularmente en este último caso, puede ser ventajoso aplicar a las células vegetales o a las plantas una cantidad efectiva de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina-1-fosfato o N-acetilglucosamina-6-fosfato o glucosamina-6-fosfato. Las realizaciones particulares de regiones codificantes de ADN o promotores comprendidos en los genes quiméricos transferidos en plantas de algodón son como se describen en cualquier otro lugar en este documento.

Las fibras de algodón descritas aquí se pueden distinguir de las fibras de algodón de origen natural, es decir, fibras de algodón obtenidas de una estirpe isogénica que no comprende un gen quimérico según la invención, a través de la capacidad de tales fibras para aumentar la tinción con colorantes aniónicos (incluyendo, por ejemplo, Rojo Congo), a través de la capacidad de tales fibras para aumentar la tinción con colorantes reactivos con amina (incluyendo, por ejemplo, éster de tetrafluorofenilo). Las fibras de algodón según la invención también tienen la capacidad de unirse a aglutinina de germen de trigo que se une a quitooligómeros. Las fibras de algodón también se pueden distinguir de las fibras de algodón de origen natural mediante detección directa de oligómeros de N-acetilglucosamina y GlcNAc, tales como quitobiosa, preferiblemente después del tratamiento del material de la pared celular de la fibra con quitinasa. Las fibras de algodón también se pueden distinguir por su mayor contenido de nitrógeno.

Las fibras de algodón descritas aquí también se pueden distinguir de las fibras revestidas por quitosano o de los hilos mezclados con quitosano/celulosa por cuanto los oligómeros cargados positivamente están distribuidos más o menos uniformemente en las paredes celulares secundarias de la planta que constituyen las fibras. En consecuencia, en cortes microscópicos de fibras de algodón, teñidas por ejemplo con WGA o con Rojo Congo o con tetrafluorofenilo, como se describe posteriormente, los colorantes se distribuirán de forma más o menos uniforme a

lo largo de las paredes celulares que constituyen las fibras de algodón, mientras que, en las fibras revestidas con quitosano, la tinción se concentrará en el revestimiento de quitosano localizado como una lámina en la superficie de las fibras tratadas.

5 Las fibras de algodón descritas aquí también se pueden distinguir de otras fibras de algodón mediante la detección de la N-acetilglucosamina transferasa que comprende genes quiméricos en ácidos nucleicos que quedan en el material vegetal asociado con las fibras de algodón.

10 El aumento de tinción del material de pared celular de planta descrito aquí, mediante colorantes aniónicos tales como Rojo Congo, se puede cuantificar, por ejemplo, tiñendo una cantidad uniforme de material en condiciones estándar, extendiendo el material sobre un área estandarizada (tal como un pocillo en una placa de múltiples pocillos), digitalizando una foto del área para la escala de grises de la capa coloreada del material. Cuanto menos gris, más teñido está el material de pared celular de planta. De esta manera, estas fibras de algodón y el material de pared celular mostraron un incremento de al menos alrededor de 5% en la tinción mediante Rojo Congo en comparación con el material de pared celular o fibras de control procedentes de estirpes vegetales isogénicas sin un gen que codifica N-acetilglucosamina transferasa.

15 La capacidad de las nuevas fibras de algodón para unirse específicamente a aglutinina de germen de trigo (detectable mediante el grupo fluoróforo acoplado) es una clara característica distintiva de las nuevas fibras de algodón proporcionadas con respecto a las fibras de algodón de origen natural. Excepto por una fluorescencia de fondo muy baja, las fibras de algodón de origen natural no se tiñen/fluorescen cuando se tratan con WGA-alexa fluor 488 ó 555. La fluorescencia de las fibras de algodón aumenta al menos 5 veces cuando están presentes
20 quitoooligómeros. En consecuencia, se describen aquí fibras de algodón que son capaces de unirse específicamente a aglutinina de germen de trigo, o WGA acoplada a un fluoróforo, tal como WGA Alexa 488 o WGA Alexa 555, o que, cuando se tratan con WGA Alexa 488 o WGA Alexa 555, proporcionan una fluorescencia brillante bajo luz UV. Esta fluorescencia no está restringida a la superficie de la fibra de algodón, sino que está distribuida a lo largo de la pared celular de las células de las fibras.

25 El material de pared celular de planta descrito aquí, que incluye fibras de algodón, posee típicamente quitoooligosacáridos en una concentración de al menos 0,1 µg/mg de material de pared celular, preferiblemente al menos 1 µg/mg de material de pared celular, preferiblemente al menos 5 µg/mg de material de pared celular.

La invención también proporciona los genes quiméricos como se describen aquí, y células vegetales o plantas que contienen tales genes quiméricos.

30 Allí donde los métodos de la invención se dirijan a la introducción de un gen quimérico en una célula vegetal, estará claro que tales métodos también se pueden aplicar en casos en los que la célula vegetal se incorpora en una planta madura. Por ejemplo, las células transgénicas se pueden regenerar en plantas transgénicas según métodos establecidos.

35 Los métodos para transformar células vegetales y plantas son bien conocidos en la técnica. Los métodos para transformar plantas de algodón son también bien conocidos en la técnica. La transformación de algodón mediada por *Agrobacterium* ha sido descrita, por ejemplo, en la patente US 5.004.863 o en la patente US 6.483.013, y la transformación del algodón mediante bombardeo con partículas se da a conocer, por ejemplo, en el documento WO 92/15675.

40 Los genes quiméricos se pueden introducir mediante transformación en plantas de algodón a partir de las cuales se pueden derivar callos embriogénicos, tales como Coker 312, Coker310, Coker 5Acala SJ-5, GSC25110, FiberMax 819, Siokra 1-3, T25, GSA75, Acala SJ2, Acala SJ4, Acala SJ5, Acala SJ-C1, Acala B1644, Acala B1654-26, Acala B1654-43, Acala B3991, Acala GC356, Acala GC510, Acala GAM1, Acala C1, Acala Royale, Acala Maxxa, Acala Prema, Acala B638, Acala B1810, Acala B2724, Acala B4894, Acala B5002, non Acala "picker" Siokra, "stripper" variety FC2017, Coker 315, STONEVILLE 506, STONEVILLE 825, DP50, DP61, DP90, DP77, DES119, McN235,
45 HBX87, HBX191, HBX107, FC 3027, CHEMBRED A1, CHEMBRED A2, CHEMBRED A3, CHEMBRED A4, CHEMBRED B1, CHEMBRED B2, CHEMBRED B3, CHEMBRED C1, CHEMBRED C2, CHEMBRED C3, CHEMBRED C4, PAYMASTER 145, HS26, HS46, SICALA, PIMA S6 y ORO BLANCO PIMA, Fibermax[®] FM5013, FM5015, FM5017, FM989, FM832, FM966 y FM958, FM989, FM958, FM832, FM991, FM819, FM800, FM960, FM966, FM981, FM5035, FM5044, FM5045, FM5013, FM5015, FM5017 o FM5024 y plantas con genotipos
50 derivados de ellas.

"Algodón", como se usa aquí, incluye *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* y *Gossypium herbaceum*, o la progenie de cruces entre tales especies.

55 Los métodos y medios de la actual invención también se pueden aplicar para otras especies vegetales, tales como cañamo, yute, lino, y plantas madereras, incluyendo, pero sin limitarse a, *Pinus spp.*, *Populus spp.*, *Picea spp.*, *Eucalyptus spp.* etc.

La planta transformada obtenida se puede usar en un esquema de reproducción convencional para producir plantas más transformadas con las mismas características, o para introducir el gen quimérico según la invención en otras variedades de la misma especie vegetal o una especie vegetal relacionada, o en plantas híbridas. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas contienen los genes quiméricos de la invención como un inserto genómico estable, y también están englobadas por la invención.

Como se usa aquí, "que comprende" se ha de interpretar que especifica la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes señalados según se refieren, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o sus grupos. De este modo, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados actualmente, es decir, pueden estar embebidos en un ácido o proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una región de ADN, que está definido funcional o estructuralmente, puede comprender regiones de ADN adicionales, etc.

Los siguientes Ejemplos describen los métodos para alterar las paredes celulares de planta. Excepto que se señale de otro modo en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como se describe en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular en plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) de R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK.

A lo largo de la descripción y los Ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias representadas en el listado de secuencias:

SEC ID nº 1: Proteína C de nodulación de *Azorhizobium caulinodans*

SEC ID nº 2: Proteína C de nodulación de *Bradyrhizobium japonicum*

SEC ID nº 3: Proteína C de nodulación de *Rhizobium galegae*

SEC ID nº 4: Proteína C de nodulación de *Rhizobium leguminosarum* (biovar *viciae*)

SEC ID nº 5: Proteína C de nodulación de *Rhizobium meliloti*

SEC ID nº 6: Proteína C de nodulación de *Rhizobium tropici*

SEC ID nº 7: Proteína C de nodulación de *Rhizobium leguminosarum* (biovar *phaseoli*)

SEC ID nº 8: Proteína de nodulación de *Rhizobium* sp. Cepa N33

SEC ID nº 9: Proteína de nodulación de *Rhizobium loti*

SEC ID nº 10: ADN-T de pTGK42

SEC ID nº 11: ADN-T de pTGK44

SEC ID nº 12: ADN-T de pTDB15

SEC ID nº 13: ADN-T de pTDBI37

SEC ID nº 14: ADN-T de pTDBI50

SEC ID nº 15: Quitina sintasa sintética enlazada a señal directora al aparato de Golgi.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de genes quiméricos expresables por la planta que codifican una proteína N-acetilglucosamina transferasa.

Usando técnicas de ADN recombinante estándar, se construyó un gen quimérico de NODC expresable por la planta, que contiene los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente:

- una región de promotor 35S de CaMV
- un fragmento de ADN que codifica una secuencia líder no traducida (5'Cab22L)
- un fragmento de ADN que codifica NODC de *Azorhizobium caulinodans*

- un fragmento de ADN que codifica EGFP (proteína fluorescente verde aumentada) clonado en marco con el ORF que codifica NODC, de manera que se obtiene una proteína de fusión que comprende NODC y EGFP
- una terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación del transcrito 35S de CaMV (3' 35S)

5 El gen quimérico se introdujo entre los bordes de T-DNA de un vector de T-DNA junto con un gen *bar* quimérico que proporciona resistencia a fosfotricina. El vector de T-DNA resultante se denominó pTGK44. La secuencia del T-DNA de este vector se proporciona en SEC ID No 11. Este vector de T-DNA permitió un análisis histoquímico de la localización de la proteína de fusión NODC-EGFP.

Se construyó otro gen quimérico que contiene los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente:

- una región de promotor 35S de CaMV
- 10 • un fragmento de ADN que codifica una secuencia líder no traducida (5'Cab22L)
- un fragmento de ADN que codific NODC de *Azorhizobium caulinodans*
- una terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación del transcrito 35S de CaMV (3' 35S)

15 El gen quimérico se introdujo entre los bordes de T-DNA de un vector de T-DNA junto con un gen *bar* quimérico que proporciona resistencia a fosfotricina. El vector de T-DNA resultante se denominó pTGK42. La secuencia del T-DNA de este vector se proporciona en SEC ID No 10. Este vector de T-DNA permitió expresar NODC en células vegetales, para analizar si se produjeron quitooligosacáridos asociados con la pared celular de tales células vegetales.

También se construyó un gen quimérico de control que codifica una N-acetilglucosamina transferasa, que es diferente de la proteína del tipo NODC, que contiene los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente

- 20 • una región de promotor 35S de CaMV
- un fragmento de ADN que codifica una secuencia líder no traducida (5'Cab22L)
- un fragmento de ADN que codifica quitina sintasa de *Neurospora crassa*
- una terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación del transcrito 35S de CaMV (3' 35S)

25 El gen quimérico se introdujo entre los bordes de T-DNA de un vector de T-DNA junto con un gen *bar* quimérico que proporciona resistencia a fosfotricina. El vector de T-DNA resultante se denominó pTGK43. La secuencia del T-DNA de este vector se proporciona en SEC ID No 12. Este vector de T-DNA permitió expresar quitina sintasa en células vegetales, para analizar si se produjeron quitooligosacáridos asociados con la pared celular de tales células vegetales.

30 Los vectores de T-DNA se introdujeron en C58C1Rif(pEHA101) de *Agrobacterium tumefaciens*. Para experimentos de control, se introdujo un vector de T-DNA que contiene sólo un gen *bar* quimérico en la misma cepa de *Agrobacterium*.

Las cepas de *A. tumefaciens* se usaron subsiguientemente para generar cultivos de raíz fasciculada de *Arabidopsis thaliana* mediante cotransformación de discos foliares con ATCC15834 de *Agrobacterium rhizogenes* y las cepas de *A. tumefaciens* que poseen los diferentes vectores de T-DNA según el siguiente protocolo.

35 Se usaron los siguientes medios:

Medio de germinación: sales MS/2, vitaminas B5, 1,5% de sacarosa, pH 5,8, 0,7% de agar (Difco)

Medio estándar: medio MS, 0,5 g/l de MES, 2% de glucosa, pH 5,8, 0,7% de agar (Difco)

Medio de inducción de callo: medio MS, 0,5 g/l de MES, 2% de glucosa, pH 5,8, 0,7% de agar (Difco), 0,2 mg/l de 2,4D y 0,2 mg/l de cinetina

40 Medio de alargamiento de raíz fasciculada: medio MS, 2% de sacarosa, pH 6,2, 0,7% de agar (Difco)

Medio de cultivo de raíz: medio B5, 3% de sacarosa, pH 5,5.

Se cultivaron in vitro brotes de *Arabidopsis* a partir de semillas esterilizadas, de la siguiente manera.

Las semillas se trataron durante 2 minutos con EtOH al 70%, seguido de un blanqueo durante 10 minutos con 6% de cloro activo + 0,05% de Tween 20, y 5 lavados con agua corriente estéril. Las semillas se pregerminaron en la luz

(30-50 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante 24 horas a 24°C en agua corriente estéril (alrededor de 10-12 ml de agua corriente en placa de Petri Falcon Optilux de 9 cm, n° 1005).

5 Las semillas pregerminadas se pusieron en medio de germinación y se les permitió crecer con el siguiente régimen de luz: 12 horas de luz/12 horas de oscuridad o 16 horas de luz/8 horas de oscuridad (30-50 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 23-24°C durante alrededor de 2-3 semanas. Las cepas de *A. rhizogenes* se hicieron crecer en placas de agar con medio YEB, mientras que las cepas de *A. tumefaciens* se hicieron crecer en placas de agar con medio minA suplementado con antibióticos apropiados para seleccionar el mantenimiento del vector de T-DNA.

10 Para la transformación, las hojas se cortaron en dos mitades y se colocaron en medio inductor de callo. Las bacterias de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* se resuspendieron en medio estándar para obtener una OD600 de alrededor de 0,2-0,3, se mezclaron en una relación 1:1 y se usaron para la incubación de los trozos de hoja durante alrededor de 5 minutos. Después, se eliminó la suspensión bacteriana, y los trozos de hoja infectados se colocaron en medio estándar y se incubaron durante alrededor de 3 días (23-24°C; 30 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 12 horas de luz/12 horas de oscuridad o 16 horas de luz/8 horas de oscuridad).

15 Después, los explantes de hoja se lavaron 3 veces con “medio estándar” que contiene 500 mg/l de tricarcilina (Duchefa) y se transfirieron a (20-30 mg/l de glufosinato) “medio estándar” que contiene (20-30 mg/ml de glufosinato y 500 mg/l de tricarcilina, y se cultivaron adicionalmente a 23-24°C, 30 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 12 horas de luz/12 horas de oscuridad o 16 horas de luz/8 horas de oscuridad). Los explantes de hoja se transfirieron cada semana a medio reciente. Después de 3-4 semanas, las raíces que salen se cortaron y se transfirieron a “medio de alargamiento de raíz fasciculada”. Cuando las raíces tuvieron unos pocos centímetros, se comenzó un cultivo de la raíz fasciculada en Erlenmeyers de 250 ml que contiene 50 ml de “medio de cultivo de raíz” + 250 mg/l de tricarcilina. Los cultivos se agitaron (110 rpm) en la oscuridad a 23-24°C, y se subcultivaron cada semana. La concentración de tricarcilina se redujo gradualmente. Cuando las raíces estuvieron creciendo bien, las raíces se dividieron en trozos de alrededor de 1,5 cm, y los explantes se distribuyeron sobre varios Erlenmeyers.

20

25 Los cultivos de raíz fasciculada también se pudieron cultivar en medio sólido, con lo cual los cultivos se transfirieron cada dos semanas en “medio de alargamiento de raíz fasciculada” reciente.

Para generar cultivos de raíz fasciculada de algodón, se puede usar el mismo protocolo.

Ejemplo 2: Análisis histoquímico de los cultivos de raíz fasciculada

30 Las raíces fasciculadas de los diferentes cultivos de raíz fasciculada obtenidos mediante coinfección entre *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* que poseen los diferentes vectores de T-DNA descritos en el Ejemplo 1 se tiñeron histoquímicamente para visualizar diferentes compuestos de las células, y se analizaron microscópicamente.

35 La localización de la proteína de fusión se puede visualizar usando la fluorescencia verde de la parte GFP. La N-acetilglucosamina se puede detectar tras reacción inmunológica con anticuerpos monoclonales IgM frente a N-acetilglucosamina (BIODESIGN), o usando aglutinina de germen de trigo con Alexa Fluor 488. El retículo endoplásmico se tiñó usando el colorante ER-Tracker Blue White DPX. El aparato de Golgi se visualizó usando BODIPY-TR. Las paredes celulares se tiñeron usando Calcofluor White (Abrillantador Fluorescente 28). Los núcleos se tiñeron usando Hoechst 33342.

Las células cilíadas radiculares teñidas histoquímicamente se examinaron por medio de microscopía de fluorescencia, usando un microscopio Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) equipado con Apotome (Zeiss), para permitir cortes ópticos. Para el procesamiento de las imágenes, se usó Axio Vision 4.2 (Zeiss).

40 SE usaron los siguientes protocolos para los diferentes métodos histoquímicos:

A. Tinción de las paredes celulares con Calcofluor.

Calcofluor White (o Abrillantador Fluorescente 28) es un compuesto orgánico incoloro que fluoresce en un color azulado claro bajo radiación ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$).

45 La muestra a teñir se sumerge durante 15 a 30 minutos en medio de cultivo o PBS (disolución tampón) que comprende Abrillantador Fluorescente 28 a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. La muestra se lava entonces con medio o con tampón, y las muestras se examinan usando un microscopio equipado para la microscopía de fluorescencia usando un filtro Zeiss de ajuste 18. Las paredes celulares fluorescen en un color azulado claro.

B. Tinción histoquímica del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico en células vivas

50 Para teñir el complejo de Golgi, se usaron raíces cultivadas durante alrededor de 5 días en medio de cultivo líquido de raíz. Estas raíces se enjuagaron con medio de cultivo de raíz reciente, y se incubaron durante alrededor de 30 minutos a 4°C con 1 μM de BODIPY TR C5-ceramida (Molecular probes, n° de Catálogo B-34400). Las raíces se

enjuagaron unas pocas veces con medio de cultivo de raíz y se incubaron en medio de cultivo de raíz reciente a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. Las raíces se enjuagaron entonces con medio de cultivo de raíz reciente, y se examinaron con un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) usando un Filterset 00 (excitación: BP530/585; emisión: LP615).

- 5 Para teñir el ER, se usaron raíces cultivadas durante alrededor de 5 días en medio de cultivo líquido de raíz. Estas raíces se enjuagaron con medio de cultivo de raíz reciente y se incubaron con ER-Tracker Blue-White DPX (100 nM) disuelto en medio de cultivo de raíz durante alrededor de 2 horas con agitación suave. Las raíces se aclararon unas pocas veces con medio de cultivo de raíz y se examinaron con un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) usando un Filterset 02 (excitación: G365; emisión: LP420).

10 *C. Detección inmunohistoquímica del montaje completo de N-acetilglucosamina incorporada en la pared celular de raíces (cilios radiculares)*

Raíces de los diferentes cultivos de raíz fasciculada se hicieron crecer en cultivo líquido durante 6 días, suplementado con 50 mM de GlcNAc, o sin ningún suplemento. Las raíces se fijaron y se deshidrataron, se volvieron a hidratar, y la pared celular se permeabilizó de la siguiente manera.

- 15 Cuando la muestra se hubo incubado con N-acetilglucosamina, la N-acetilglucosamina en exceso se eliminó por lavado incubando 4 veces 10 min. con disolución de PBS.

Las muestras se fijaron mediante incubación e infiltración a vacío de disolución de AA (incubación: cuatro veces 1 h, cada vez seguido de 5 min. de infiltración de vacío). La disolución de AA contiene 50% de EtOH y 5% de ácido acético.

- 20 En la siguiente etapa, las muestras se deshidratan aclarando con 50% de EtOH y lavando 2 x 30 min. con 50% de EtOH, seguido de una incubación durante 60 min. en 70% de EtOH. Las muestras se pueden almacenar en esta etapa a -20°C.

Subsiguientemente, las muestras se sometieron a permeabilización de la pared celular, lavando 5 min. con 50% de EtOH, lavando 2 x 5 min. con PBT (PBS con 0,1% de Tween 20), lavando 2 x 5 min. con PBT + 0,3% de Triton X100, y finalmente lavando 2 x 5 min. con PBS (150 mM de NaCl; 10 mM de tampón de fosfato de Na; pH 7,4).

- 25

Las raíces permeabilizadas se transfirieron a una placa de Petri que contiene agua MQ, y se montaron en un portaobjetos de microscopio "tratado con Vectabond". Los portaobjetos se cocieron en un calentador de placas de TLC durante 45 min. a 55°C. Se llevó a cabo una etapa de bloqueo incubando los portaobjetos durante una hora con disolución de bloqueo (1% de BSA en PBT). Después, la disolución de bloqueo al 1% se sustituyó por alrededor de 400 µl de anticuerpo monoclonal IgM contra N-acetilglucosamina (1 µg/ml en disolución de bloqueo; BIODSIGN, nº de Catálogo H67108M), y se incubó durante una hora. Los portaobjetos se lavaron subsiguientemente 3 veces, 5 a 10 minutos con disolución de bloqueo. La disolución de bloqueo se sustituyó entonces por alrededor de 400 µl de anticuerpo anti-IgM de ratón de cabra, marcado con Alexa Fluor 488 (3 µg/ml en disolución de bloqueo; Molecular Probes, nº de Catálogo A-21042), y se incubó durante una hora. Después, los portaobjetos se lavaron 5 a 10 minutos con disolución de bloqueo, 2 veces 5 a 10 minutos con PBT, y unas pocas veces con PBS, para eliminar Tween 20. Los resultados se evalúan por medio de microscopía de fluorescencia con un microscopio Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) usando Filterset 38 (excitación: BP470/40; emisión: BP525/50).

- 30

- 35

D. Detección de N-acetilglucosamina mediada por aglutinina de germen de trigo

- 40 Se hicieron crecer raíces de los diferentes cultivos de raíz fasciculada en medio líquido durante 6 días, suplementado con 50 mM de GlcNAc, o sin ningún suplemento. Las raíces se fijaron y se deshidrataron, se volvieron a hidratar, y la pared celular se permeabilizó como se describe en la sección C anterior.

La aglutinina de germen de trigo se une selectivamente a restos de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilneuramínico. El ácido N-acetilneuramínico no existe en plantas. Por lo tanto, en plantas, la aglutinina de germen de trigo se puede usar para detectar específicamente restos de N-acetilglucosamina.

- 45 Las raíces permeabilizadas se colocaron en placas de Petri de 9 cm que contienen PBT. Las raíces se transfirieron después a los pocillos de placas de cultivo de 6 pocillos que contienen alrededor de 1,7 µg/ml de aglutinina de germen de trigo marcada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, nº de Catálogo W-11261) en PBT, y se incubaron durante una hora. Las muestras se lavaron subsiguientemente durante 3 x 10 minutos con PBT, y dos veces durante 5 minutos con PBS (para eliminar Tween 20). Las muestras se colocaron en un portaobjetos de microscopio tratado con "Vectabond" o "Tissue Tack" en una gota de PBS. Tras eliminar la mayor parte del PBS, se montó el cubreobjetos. Los resultados se evaluaron por medio de microscopía de fluorescencia usando un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) usando Filterset 38 (excitación: BP470/40; emisión: BP525/50).
- 50

E. Análisis de GFP

La fluorescencia de EGFP se evaluó por medio de microscopía de fluorescencia con un microscopio Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) usando Filterset 38 (excitación: BP470/40; emisión: BP525/50).

Resultados

5 1. Localización de N-acetilglucosamina en la pared celular

Las células cilíadas radiculares que comprenden el gen quimérico NODC se tiñeron inmunohistoquímicamente en busca de la presencia de N-acetilglucosamina, y posteriormente se tiñeron con Calcofluor para visualizar las paredes celulares. La Figura 3 muestra un conjunto representativo de fotografías de cortes ópticos usando un microscopio de fluorescencia, por medio de lo cual el panel A muestra la fluorescencia (azul) que visualiza la pared celular, y el panel B muestra la fluorescencia (verde) que visualiza N-acetilglucosamina. Como se puede observar de la superposición de ambos cortes ópticos en el panel C, la presencia de N-acetilglucosamina se detecta exclusivamente en las paredes celulares de células cilíadas radiculares.

2. Colocalización de proteínas NODC y el aparato de Golgi

Las células cilíadas radiculares que comprenden el gen quimérico que expresa la proteína de fusión NODC-EGFP se tiñeron para visualizar el aparato de Golgi, y después se tiñeron con Calcofluor para visualizar las paredes celulares. La Figura 4 muestra un conjunto representativo de fotografías de cortes ópticos usando un microscopio de fluorescencia, por medio del cual el panel B muestra la fluorescencia (azul) que visualiza la pared celular, el panel C muestra la fluorescencia (roja) asociada con el aparato de Golgi, y el panel D muestra la fluorescencia (verde) que visualiza la proteína de fusión NODC-EGFP. Como se puede observar de la superposición de los cortes ópticos en el panel A, la localización de la proteína de fusión NODC-EGFP coincide con la localización del aparato de Golgi en las células cilíadas radiculares.

3. La expresión de quitina sintasa en células vegetales requiere la alimentación externa con GlcNAc para detectar N-acetilglucosamina en las paredes celulares

Las raíces que expresan una quitina sintasa quimérica de *Neurospora* se cultivaron como se describe anteriormente, en presencia o ausencia de N-acetilglucosamina añadida externamente. Después de un lavado cuidadoso, las raíces se tiñeron histoquímicamente para detectar N-acetilglucosamina. En la Figura 5, panel A (raíces fasciculadas con alimentación externa de GlcNAc, se pueden detectar numerosos puntos fluorescentes verdes, mientras que en el panel B (raíces fasciculadas sin alimentación externa de GlcNAc) se pudieron detectar muy pocos puntos fluorescentes verdes.

30 **Ejemplo 3: Demostración bioquímica de oligómeros semejantes a quitina en la pared celular de raíces fasciculadas p35S::NODC de Arabidopsis**

Raíces fasciculadas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0), transgénicas para p35S:NODC-p35S:bar, obtenidas usando un vector de T-DNA pTGK42, y raíces fasciculadas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) de control, transgénicas para p35S:bar, obtenidas usando pTCO192 (control), se analizaron en busca de la presencia de N-acetilglucosamina usando el ensayo de Morgan-Elson.

Para este fin, se cosecharon alrededor de 100 mg de raíces fasciculadas en alrededor de 20 µl de tampón (25 mM de tampón de fosfato de potasio pH 6,0) y se molieron con arena de mar, se precipitaron, y se determinó el contenido proteico del extracto (con fines de estandarización). Los sobrenadantes se eliminaron, y las raíces se resuspendieron en 100 µl de tampón. Se añadió 1 unidad de celulasa (celulasa "Onozuka R-10" de *Trichoderma viride* (Serva, nº de Catálogo 16419): 10 U/ml en tampón) o 1 unidad de quitinasa (quitinasa de *Serratia marcescens* (Sigma, nº de Catálogo C1650): 10 U/ml en tampón), o ambas, a diferentes muestras, y se incubaron durante toda la noche a 25°C.

A la mañana siguiente, se llevó a cabo sobre las muestras un ensayo de Morgan-Elson para medir la N-acetilglucosamina. En el método colorimétrico empleado, que se basa en la reacción de Morgan-Elson, el extremo reductor de la N-acetil-glucosamina se transforma sucesivamente en los cromógenos I y II en condiciones alcalinas a 100°C. El tratamiento subsiguiente con una mezcla de HCl concentrado y ácido sulfúrico concentrado da como resultado la eliminación de agua, produciendo el cromógeno III de la reacción de Morgan-Elson. En la etapa final de la reacción, se deja que el cromógeno III reaccione con DMAB, p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich), para formar un producto de color rojo cuya concentración se puede determinar midiendo la absorción a 585 nm.

La UDP N-acetilglucosamina y la N-acetilglucosamina-1-fosfato fracasan en el ensayo excepto que se hidrolizan previamente con ácido. Los nucleótidos se pueden hidrolizar calentando a 100° en 0,01 N de ácido durante 15 min., pero el fosfato de azúcar requiere condiciones más rigurosas, por ejemplo 5 minutos a 100° en 0,1 N de HCl.

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de OD585 después del ensayo de Morgan-Elson

Cultivo de raíz fasciculada	Tampón	Celulasa	Quitinasa	Celulasa Quitinasa
Control	0,070	0,100	0,117	0,157
p35S:NODC	0,056	0,096	0,100	0,252

De estos resultados se puede concluir que los polímeros similares a quitina están embebidos en la pared celular.

5 Ejemplo 4: Análisis de quitooligo y monosacáridos en material de pared celular de planta usando HPTLC

Las paredes celulares de las raíces fasciculadas de Arabidopsis del Ejemplo 1 (35S::NODC; 35S::NODC_EGFP) y raíces fasciculadas de control 35S::bar se prepararon según el siguiente protocolo.

Preparación de las paredes celulares

- Cosechar raíces fasciculadas;
- 10 - Eliminar la mayor parte del medio con un tejido
- Lavar el tejido con tampón de PBS
- Poner alrededor de 1 g de tejido en un tubo
- Congelar con nitrógeno líquido
- Moler el tejido en un mortero
- 15 - Transferir el tejido molido a un embudo con estopilla
- Lavar con unos pocos litros de agua desmineralizada
- Cerrar la estopilla y transferir a una botella de 500 ml que contiene 500 ml de etanol
- Lavar 15 minutos con 500 ml de etanol, volver a echar etanol reciente, y lavar durante otros 15 minutos
- Sustituir el etanol por 250 ml de éter, y lavar 15 minutos.
- 20 El material que queda es el "material de pared celular". Séquese y pésese el material de pared celular, y transfírase a un tubo.

Extracción de quitooligos a partir del material de pared celular

- Añádanse 300 µl de agua MQ a 10 mg de material de pared celular (úsese un tubo de 25 ó 50 ml), póngase a hervir durante 3 minutos e incúbese durante 2 horas a 80°C (agítese). El material de pared celular se puede digerir con una mezcla enzimática de quitinasa y β-N-acetilglucosaminidasa: 0,5 U de quitinasa en 50 µl de 125 mM de fosfato de sodio - 2 mM de CaCl₂ - pH 2 (Chitinase C7809 o C6137 → digiéranse los (quitooligo)sacáridos muy rápidamente hasta N-acetilglucosamina. Chitinase BioLabs P5206S → digiérase penta-N-acetilquitosa (lentamente) hasta di- y tri-quitooligos)
- 25 - Añádanse 100 µl de mezcla enzimática a alrededor de 5 mg de material de pared celular
- 30 - Incúbese toda la noche a 25°C
- El tampón se puede separar del material de pared celular mediante centrifugación

Tras la extracción, el tampón que contiene los quitooligos se aplica como puntos sobre placas de HPTLC (placas de HPTLC NH2 (sin indicador fluorescente) 10 x 20 cm (Merck, Art. 12572)) junto con una mezcla de disolución patrón de quitooligosacárido en H₂O. La disolución patrón comprende N-acetilglucosamina, quitobiosa, quitotriosa, quitotetraosa y quitopentaosa.

35

Se pueden usar los siguientes disolventes desarrolladores:

- n-butanol (70):ácido acético (20):H₂O (10) (Tampón D)
- acetonitrilo (76):H₂O (24):disolución acuosa al 0,5% de ácido bórico (10) (Tampón A)
- acetonitrilo (10):isopropanol (67):50 mM de KCl (23) (Tampón B)
- n-butanol (50):etanol (30):H₂O (20) (Tampón C)

5 Cromatografía

- Límpiense las placas desarrollando con metanol
 - Aplíquese 1(-2) µl de disoluciones estándar (15 mm desde el fondo) y 1 a 5 µl de muestras en bandas de alrededor de 6 mm de longitud
 - Desarrollense las placas en una cámara de fosas gemelas CAMAG: distancia de migración 7 a 7,5 cm
- 10
- Cámara de fosas gemelas para: placas de 10 x 10 cm → 10 ml de disolución desarrolladora; placas de 20 x 10 cm → 20 ml de disolución desarrolladora
 - Séquense las placas con un ventilador
 - Caliéntense las placas a alrededor de 150°C durante 20 minutos (calentador de placas de TLC)
 - Visualícense los azúcares con UV (366 nm)

15 Cromatografía bidimensional

- Límpiense las placas desarrollando con metanol
 - Aplíquese 1 a 5 µl de muestras en banda de 3 mm: ángulo recto de la placa (15 mm desde el fondo y 15 mm desde el sitio)
- 20
- Desarrollense las placas en la primera dirección en la cámara de fosas gemelas de CAMAG: distancia de migración 7 a 7,5 cm
 - Cámara de fosas gemelas para: placas de 10 x 10 cm → 10 ml de disolución desarrolladora
 - Séquense las placas con un ventilador
 - Desarrollense las placas en otra dirección
 - Séquense las placas con un ventilador
- 25
- Caliéntense las placas hasta alrededor de 150°C durante 20 minutos (calentador de placas de TLC)
 - Visualícense los azúcares con UV (366 nm)

La Figura 6 muestra los resultados de HPTLC unidimensional, por medio de la cual el material de pared celular se extrajo pero no se digirió posteriormente con quitinasa. La Figura 7 muestra los resultados de una HPTLC bidimensional tras la digestión con quitinasa. No se pueden detectar quitooligómeros en las plantas de control, pero existen cantidades significativas de quitooligómeros en plantas que comprenden un gen de N-acetilglucosamina transferasa.

También se generaron plantas transgénicas de Arabidopsis usando los genes quiméricos descritos en el Ejemplo 1. Este material es más uniforme que los cultivos de raíz fasciculada descritos anteriormente. Se preparó material de pared celular, se extrajeron los quitooligosacáridos como se describió, y se llevó a cabo la HPTLC en Tampón A como se describe aquí. Los resultados se muestran en la Figura 8.

El material de pared celular procedente de brotes transgénicos de Arabidopsis 35S::NodC mostró una cantidad elevada de quitotriosa, que se estimó que era, mediante comparación con las disoluciones patrón, alrededor de 5 µg/mg de material de pared celular o 0,01% del material de hoja reciente.

Ejemplo 5: Tinción de material de pared celular de planta procedente de cultivos de raíz fasciculada de Arabidopsis

Se generaron cultivos de raíz fasciculada de Arabidopsis como en el Ejemplo 1, su material de pared celular se preparó como se describe en el Ejemplo 5 y se almacenó a -20°C. El material de pared celular se tiñó con un

colorante aniónico (Rojo Congo) o un colorante reactivo con amina (Alexa Fluor 488, éster tetrafluorofenílico).

A. Tinción con Rojo Congo

- El material de pared celular almacenado a -20°C procedente de raíces fasciculadas NODC o de plantas de control se rehidrató en tampón de acetato pH 5 (50 mg de material de pared celular/tubo)
- 5 - El material se tiñó con Rojo Congo al 0,03% disuelto en tampón de acetato pH 5
- El material de pared celular se lavó con tampón de acetato pH 5 y con tampón de PBS durante unas pocas veces
- Todo el material de pared celular se transfirió a los pocillos de una placa de 48 pocillos
- 10 - En condiciones de iluminación estándar, se obtuvieron imágenes digitales de los pocillos individuales, y se determinó el valor de gris medio de la imagen digital

Resultados:

Muestra 1

	Media	Mínimo	Máximo	IntDen	Mediana
NodC	89,390	76	126	3460186	89
Control	97,761	83	136	3784246,000	97

Muestra 2

	Media	Mínimo	Máximo	IntDen	Mediana
NodC	101,548	86	130	3479355	101
Control	108,109	90	139	3704154	108

Muestra 3

	Media	Mínimo	Máximo	IntDen	Mediana
NodC	97,866	81	120	3650012	98
Control	104,634	85	134	3902418	104

El material de pared celular procedente de raíces fasciculadas que contienen un gen quimérico NodC se tiñó reproduciblemente más intenso que el material de pared celular procedente de plantas de control. Los valores de gris del material de pared celular fueron alrededor de 5-10% menores que los de las plantas de control.

15 B. Tinción con éster tetrafluorofenílico de Alexa Fluor 488

- El material de pared celular almacenado a -20°C procedente de raíces fasciculadas de NODC o de plantas de control se rehidrataron en tampón de PBS pH 5 (50 mg de material de pared celular/tubo), y se trató con proteinasa K (100 µg/ml) toda la noche a 56°C.
- 20 - El material se lavó intensamente con tampón de PBS, y se marcó con éster tetrafluorofenílico de Alexa Fluor 488. El éster TFP de Alexa Fluor 488 está disponible como un kit (kit de marcaje de anticuerpo monoclonal Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A-20181))
- El material teñido se puede examinar usando microscopía de fluorescencia, por ejemplo con un filtro Zeiss 38.

El material de pared celular procedente de raíces fasciculadas que contienen un gen quimérico de NodC se tiñó reproduciblemente más intenso que el material de pared celular procedente de las plantas de control.

25 **Ejemplo 6: Plantas de algodón transgénicas**

Las plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen NODC quimérico como se describe en el Ejemplo 1, o un gen quimérico NODC bajo el control del promotor selectivo para la fibra F285 (como se describe en el documento US 2003/106097), se generaron usando el método como se describe en el documento US 6483013.

Las fibras procedentes de estas plantas de algodón transgénicas se aíslan y se usan para producir hilos y tejidos

con reactividad mejorada, tal como capacidad de tinción mejorada.

Ejemplo 7: Fibras de algodón con reactividad incrementada

5 Las fibras de algodón transgénicas que comprenden una región codificante de NodC quimérica ligada operablemente a un promotor CaMV35S se generaron como se describe en el Ejemplo 6. Las fibras de algodón maduras se cosecharon a partir de estas plantas y se tiñeron con Rojo Congo, o se hicieron reaccionar con WGA-Alexa fluor 555.

A. Tinción con Rojo Congo

10 Las fibras de algodón maduras se cosecharon de plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen quimérico NodC, así como de plantas de control que no comprenden un gen quimérico NodC. Se eliminaron los lípidos de las fibras lavando con etanol y agua. Las fibras de algodón se secaron.

Veinticinco mg de fibras se rehidrataron en tampón de acetato pH 5, y se tiñeron con Rojo Congo al 0,03% disuelto en tampón de acetato pH 5. El material de pared celular se lavó con tampón de acetato pH 5 y con tampón de PBS durante unas pocas veces.

15 Las fibras teñidas se analizaron mediante microscopía de campo brillante y mediante microscopía de fluorescencia (filtro Zeiss 18). Las imágenes digitales de las fibras teñidas en una placa de 48 pocillos también se analizaron como se describe en el Ejemplo 5A.

Bajo microscopía de campo brillante, las fibras de algodón cosechadas de las plantas de algodón transgénicas NodC aparecen de un color rojo más intenso que las fibras de algodón procedentes de las plantas no transgénicas. Esta diferencia fue incluso más pronunciada cuando se analizan las fibras bajo microscopía de fluorescencia.

20 Los valores medios de gris obtenidos para las fibras de algodón teñidas con Rojo Congo procedentes de las plantas transgénicas NodC también fueron significativamente menores que para las fibras de algodón procedentes de plantas no transgénicas, confirmando la tinción más intensa por colorantes aniónicos de las fibras de las plantas de algodón transgénicas.

	Área	Media	Mínimo	Máximo	IntDen	Mediana
ModC	38958	81,388	72	179	3170716	80
control	38958	86,558	79	160	3372108	85

25 La diferencia en la tinción se mantuvo e incluso se intensificó cuando las fibras se trataron durante al menos una hora con NaOH caliente (60% a 80°C). Este tratamiento elimina proteínas, sustancias pécticas y ceras, y es capaz de desacetilar los quitooligómeros.

Además, la tinción con Rojo Congo intensificada se distribuyó uniformemente en la pared celular, como se puede observar cuando se realizaron cortes microscópicos virtuales de células de fibras individuales.

B. Tinción con WGA-Alexa 555

30 La detección de oligómeros de N-acetilglucosamina en fibras de algodón procedentes de plantas transgénicas NodC se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. No es necesario deshidratar o permeabilizar las fibras de algodón. En su lugar, los lípidos y ceras se eliminaron tratando 3 veces las fibras durante 10 minutos en una mezcla de cloroformo:metanol (1:1), seguido de un tratamiento de dos veces de 10 minutos en acetona y dos veces de 5 minutos en éter. Las fibras se dejaron secar al aire.

35 Las fibras se tiñeron con WGA-Alexa555, WGA-Alexa488 o WGA-tetrametilrodamina.

40 Las fibras se colocaron en disolución de bloqueo (150 mM de NaCl, 10 mM de tampón de fosfato de sodio pH 7,4; 0,1% de Tween 20 y 1% de seroalbúmina bovina), y se incubó durante una hora. Después, el tampón se substituyó por el mismo tampón que contiene WGA-fluorocromo, y se incubó durante 4 h. La disolución de WGA-fluorocromo se substituyó por disolución de bloqueo, se lavó 10 minutos, seguido de 3 veces de 10 minutos lavando con disolución de bloqueo sin BSA, y 2 veces de 5 minutos lavando con disolución de bloqueo sin BSA y sin Tween. Las fibras teñidas se montaron en un portaobjetos de microscopio y se evaluaron por medio de microscopía de fluorescencia (Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) usando Filterset 38 (excitación: BP470/40; emisión: BP525/50) para el conjugado de Alexa fluor 488, o Filterset 20 (excitación: BP546/12; emisión: BP575-640) para conjugado de Alexa fluor 555 o tetrametilrodamina.

45 Mientras que no se pudo detectar fluorescencia específica en las fibras de algodón procedentes de plantas no transgénicas, se pudo detectar una fluorescencia brillante en fibras de algodón procedentes de plantas de algodón

que comprenden el gen quimérico NodC (véase la Figura 9). Los cortes microscópicos virtuales de las fibras de algodón indicaron que el WGA-fluor555 está uniformemente distribuido a lo largo de la pared celular secundaria de las células de fibras de algodón.

5 **Ejemplo 9: Reactividad de paredes celulares de raíces fasciculadas de *Arabidopsis* que comprenden una quitina sintasa de *Neurospora crassa* con señal dirigida al aparato de Golgi**

Usando técnicas de ADN recombinante estándar, se construyó una N-acetilglucosamina transferasa expresable por planta que comprende una secuencia señal heteróloga dirigida al aparato de Golgi, que contiene los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente:

- una región de promotor 35S de CaMV
- 10 • un fragmento de ADN que codifica una secuencia líder no traducida (5' Cab22L)
- un fragmento de ADN que codifica los 35 aminoácidos N-terminales de β -1,2-xilosiltransferasa de *Arabidopsis thaliana*
- un fragmento de ADN que codifica CHS2 (quitina sintasa) de *Neurospora crassa* clonado en el marco con el fragmento de ADN previo
- 15 • una terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación del transcrito 35S de CaMV (3' 35S)

El gen quimérico se introdujo entre los bordes de T-DNA de un vector de T-DNA junto con un gen *bar* quimérico que proporciona resistencia a fosfotricina. El vector de T-DNA resultante se denominó pTDBI37. La secuencia del T-DNA de este vector se proporciona en SEC ID No 13.

20 Los vectores de T-DNA se introdujeron en *A. tumefaciens*, y se usaron para generar cultivos de raíz fasciculada como se describe en el Ejemplo 1.

Los oligómeros de N-acetilglucosamina se pudieron detectar en la pared celular de los cultivos de raíz fasciculada tras la incubación con el dominio de unión a quitina conjugado con fluoresceína, mediante microscopía de fluorescencia.

25 Los oligómeros de N-acetilglucosamina también se pudieron detectar en la pared celular de los cultivos de raíz fasciculada usando WGA-Alexa555 como se describe en el Ejemplo 2. Además, también se pudo observar fluorescencia asociada con glóbulos en el citoplasma, que corresponden al aparato de Golgi.

Ejemplo 9: Determinación del contenido de nitrógeno de las fibras de algodón

30 Se cosecharon bolas de algodón maduras procedentes de las plantas de algodón transgénicas del Ejemplo 7. Para cada bola, se ensayaron 20 mg de fibras limpias. Para este fin, se eliminaron los lípidos y las ceras de las fibras lavando 3 veces durante 20 minutos en una mezcla de cloroformo:metanol (1:1); 2 veces durante 20 minutos en acetona; 2 veces durante 5 minutos en éter; y se dejó secar al aire.

El nitrógeno total en la superficie de las fibras se midió usando un kit de análisis de "nitrógeno total" y un C214 Multiparameter Bench Photometer de HANNA Instruments (Rhode Island, USA).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Tipo salvaje	Transgénica
Media	56 mg/l de N	85 mg/l de N
Número de bolas de algodón	9	10
Error estándar	2,6 mg/l de N	5,1 mg/l de N
Prueba de la t ($\alpha = 0,05$)		
P de dos colas	$2,2 \times 10^{-4}$	

35 Las fibras procedentes de las bolas de algodón de las estirpes transgénicas contenían una cantidad

estadísticamente significativa de nitrógeno en la superficie mayor que las fibras procedentes de bolas de algodón de tipo salvaje.

Ejemplo 10: Expresión específica de las fibras de una quitina sintasa en algodón

5 Usando técnicas de ADN recombinante estándar, se construyó una N-acetilglucosamina transferasa expresable por planta que comprende una secuencia señal heteróloga dirigida al aparato de Golgi, que contiene los siguientes fragmentos de ADN enlazados operablemente:

- una región de promotor específica de la fibra del algodón
- un fragmento de ADN que codifica una secuencia líder no traducida (5' Cab22L)
- 10 • un fragmento de ADN que codifica los 35 aminoácidos N-terminales de β -1,2-xilosiltransferasa de *Arabidopsis thaliana*
- un fragmento de ADN que codifica CHS2 (quitina sintasa) de *Neurospora crassa* clonado en el marco con el fragmento de ADN previo
- una terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación del transcrito 35S de CaMV (3' 35S)

15 El gen quimérico se introdujo entre los bordes de T-DNA de un vector de T-DNA junto con un gen quimérico *bar* que proporciona resistencia a fosfotricina. El vector de T-DNA resultante se denominó pTDBI50. La secuencia del T-DNA de este vector se proporciona en SEC ID No 14.

Los vectores de T-DNA se introducen en *A. tumefaciens*, y se usan para generar algodón transgénico. Las fibras aisladas de las bolas de algodón de plantas transgénicas tienen una mayor cantidad de oligómeros de N-acetilglucosamina, distribuidos más o menos uniformemente a lo largo de la pared celular.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Bioscience N.V. De Block, Marc Meulewaeter, Frank Koch, Rainhard Essigmann, Bernd
 <120> Métodos para alterar la reactividad de las paredes celulares de las plantas
 <130> BCS 05-2016-WO1
 <150> EP 05076488.5
 5 <151> 24/06/2005
 <150> US 60/698182
 <151> 11/07/2005
 <150> EP 06008463.9
 <151> 25/04/2006
 10 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 395
 <212> PRT
 15 <213> *Azorhizobium caulinodans*
 <400> 1

```

Met Ser Val Val Asp Val Ile Gly Leu Leu Ala Thr Ala Ala Tyr Val
 1                               5                               10          15

Thr Leu Ala Ser Ala Tyr Lys Val Val Gln Phe Ile Asn Val Ser Ser
                20                               25          30

Val Thr Asp Val Ala Gly Leu Glu Ser Asp Ala Leu Pro Leu Thr Pro
          35                               40          45

Arg Val Asp Val Ile Val Pro Thr Phe Asn Glu Asn Ser Ser Thr Leu
 50                               55          60

Leu Glu Cys Val Ala Ser Ile Cys Ala Gln Asp Tyr Arg Gly Pro Ile
 65                               70          75          80

Thr Ile Val Val Val Asp Asp Gly Ser Thr Asn Lys Thr Ser Phe His
          85                               90          95

Ala Val Cys Asp Lys Tyr Ala Ser Asp Glu Arg Phe Ile Phe Val Glu
          100                            105          110
    
```


ES 2 373 329 T3

Leu Asp Gln Asn Lys Gly Thr Ala Ala Gln Met Glu Ala Ile Arg Arg
 115 120 125
 Thr Asp Gly Asp Leu Ile Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Lys Asp Val Val Thr Lys Leu Ala Ser Ser Met Arg Ala Pro Asn Val
 145 150 155 160
 Gly Gly Val Met Gly Gln Leu Val Ala Lys Asn Arg Glu Arg Ser Trp
 165 170 175
 Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn Glu Glu
 180 185 190
 Arg Ile Ala Gln Ser Arg Phe Gly Ser Val Met Cys Cys Cys Gly Pro
 195 200 205
 Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Ile Thr Pro Leu Leu Ala Glu Tyr
 210 215 220
 Glu His Gln Thr Phe Leu Gly Arg Pro Ser Asn Phe Gly Glu Asp Arg
 225 230 235 240
 His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Gly Tyr Val
 245 250 255
 Pro Ser Ala Val Ala Arg Thr Leu Val Pro Asp Gly Ser Pro Tyr Leu
 260 265 270
 Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Tyr Arg Asp Thr Ala Leu
 275 280 285
 Ala Leu Arg Ile Lys Lys Asn Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Phe Glu Ile
 290 295 300
 Cys Ala Gln Asn Leu Gly Thr Ala Leu Leu Leu Val Met Thr Met Ile
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gln Thr Pro Val Ile Ile Leu
 325 330 335
 Gly Val Val Val Gly Met Ser Ile Ile Arg Cys Cys Ser Val Ala Leu
 340 345 350

ES 2 373 329 T3

Ile Ala Lys Asp Phe Arg Phe Leu Tyr Phe Ile Val His Ser Ala Leu
 355 360 365

Asn Val Leu Ile Leu Thr Pro Leu Lys Leu Tyr Ala Leu Leu Thr Ile
 370 375 380

Arg Asp Ser Arg Trp Leu Ser Arg Glu Ser Ser
 385 390 395

<210> 2

<211> 485

<212> PRT

5 <213> *Bradyrhizobium japonicum*

<400> 2

Met Asp Leu Leu Ala Thr Thr Ser Ala Ala Ala Val Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr Ile Tyr Lys Ser Val Gln Ala Leu Tyr Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Ile Asn Ser Ser Leu Asp Asn Leu Gly Gln Ala Glu Val Val Val
 35 40 45

Pro Ala Val Asp Val Ile Val Pro Cys Phe Asn Glu Asn Pro Asn Thr
 50 55 60

Leu Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Ala Ser Gln Asp Tyr Ala Gly Lys
 65 70 75 80

Met Gln Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Ala Asn Arg Asp Val Val
 85 90 95

Ala Pro Val His Arg Ile Tyr Ala Ser Asp Pro Arg Phe Ser Phe Ile
 100 105 110

Leu Leu Ala Asn Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile
 115 120 125

Arg Ser Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile
 130 135 140

Leu Ala Ala Asp Val Val Thr Lys Leu Val Leu Lys Met His Asp Pro
 145 150 155 160

ES 2 373 329 T3

Gly Ile Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Ile Ala Ser Asn Arg Asn Gln
165 170 175

Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn
180 185 190

Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys
195 200 205

Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Ala Leu Leu Leu Asp
210 215 220

Gln Tyr Glu Ala Gln Phe Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu
225 230 235 240

Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu
245 250 255

Tyr Val Pro Asp Ala Ile Ala Ala Thr Val Val Pro His Ser Leu Arg
260 265 270

Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp
275 280 285

Thr Phe Leu Ala Trp Arg Leu Leu Pro Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Thr
290 295 300

Leu Asp Val Ile Gly Gln Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Ala Ile Ser
305 310 315 320

Ser Leu Ala Ala Leu Ala Gln Leu Leu Ile Asp Gly Ser Ile Pro Trp
325 330 335

Trp Thr Gly Leu Thr Ile Ala Ala Met Thr Thr Val Arg Cys Cys Val
340 345 350

Ala Ala Leu Arg Ala Arg Glu Leu Arg Phe Ile Gly Phe Ser Leu His
355 360 365

Thr Pro Ile Asn Ile Cys Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu
370 375 380

Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Lys Val Thr Asp Met

ES 2 373 329 T3

Trp Thr Ile Ile Ile Ile Ala Ser Met Thr Met Val Arg Cys Ser Val
 340 345 350

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Gln Ile Arg Phe Leu Ala Phe Ser Leu His
 355 360 365

Thr Leu Ile Asn Leu Phe Met Leu Ile Pro Leu Lys Gly Phe Ala Leu
 370 375 380

Leu Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Gly Ser Thr Thr Asp
 385 390 395 400

Gly Pro Ala Ile Ala Glu Ser Asn Ala Ala Ser Asn Glu Ala Glu Ile
 405 410 415

Val Ala Ser Ala Ser Pro Phe Gly Gly Gly Thr Ser Trp Arg Phe Arg
 420 425 430

Arg

<210> 4

<211> 424

<212> PRT

5 <213> *Rhizobium leguminosarum*

<400> 4

Met Thr Leu Leu Ala Thr Thr Ser Ile Ala Ala Ile Ser Leu Tyr Ala
 1 5 10 15

Met Leu Ser Thr Val Tyr Lys Ser Ala Gln Val Phe His Ala Arg Arg
 20 25 30

Thr Thr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Asp Ile Glu Thr Asn Pro Val
 35 40 45

Pro Ser Val Asp Val Ile Val Pro Cys Phe Asn Glu Asp Pro Ile Val
 50 55 60

Leu Ser Glu Cys Leu Ala Ser Leu Ala Glu Gln Asp Tyr Ala Gly Lys
 65 70 75 80

Leu Arg Ile Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Lys Asn Arg Asp Ala Val
 85 90 95

ES 2 373 329 T3

Val Ala Gln Arg Ala Ala Tyr Ala Asp Asp Glu Arg Phe Asn Phe Thr
 100 105 110

Ile Leu Pro Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Ile Ala Ala Ile Thr
 115 120 125

Gln Ser Ser Gly Asp Leu Ile Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Thr Ile
 130 135 140

Ala Pro Asp Val Val Ser Lys Leu Ala His Lys Met Arg Asp Pro Ala
 145 150 155 160

Val Gly Ala Ala Met Gly Gln Met Lys Ala Ser Asn Gln Ala Asp Thr
 165 170 175

Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn Glu
 180 185 190

Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys Gly
 195 200 205

Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Met Leu Ser Leu Leu Asp Gln
 210 215 220

Tyr Glu Thr Gln Leu Tyr Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu Asp
 225 230 235 240

Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Ser Ala Gly Phe Arg Thr Glu Tyr
 245 250 255

Val Pro Ser Ala Ile Ala Ala Thr Val Val Pro Asp Thr Met Gly Val
 260 265 270

Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp Thr
 275 280 285

Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu Pro Gly Leu Asp Arg Tyr Leu Thr Leu
 290 295 300

Asp Ala Ile Gly Gln Asn Val Gly Leu Leu Leu Ala Leu Ser Val
 305 310 315 320

Leu Thr Gly Ile Gly Gln Phe Ala Leu Thr Ala Thr Leu Pro Trp Trp
 325 330 335

ES 2 373 329 T3

Thr Ile Leu Val Ile Gly Ser Met Thr Leu Val Arg Cys Ser Val Ala
 340 345 350

Ala Tyr Arg Ala Arg Glu Leu Arg Phe Leu Gly Phe Ala Leu His Thr
 355 360 365

Leu Val Asn Ile Phe Leu Leu Ile Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu Cys
 370 375 380

Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Gly Ser Val Ala Ile Ala
 385 390 395 400

Pro Thr Val Gly Gln Gln Gly Ala Thr Lys Met Pro Gly Arg Ala Thr
 405 410 415

Ser Glu Ile Ala Tyr Ser Gly Glu
 420

<210> 5

<211> 426

<212> PRT

5 <213> *Rhizobium meliloti*

<400> 5

Met Tyr Leu Leu Asp Thr Thr Ser Thr Ala Ala Ile Ser Ile Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Ala Tyr Arg Ser Met Gln Val Leu Tyr Ala Arg Pro
 20 25 30

Ile Asp Gly Pro Ala Val Ala Ala Glu Pro Val Glu Thr Arg Pro Leu
 35 40 45

Pro Ala Val Asp Val Ile Val Pro Ser Phe Asn Glu Asp Pro Gly Ile
 50 55 60

Leu Ser Ala Cys Leu Ala Ser Ile Ala Asp Gln Asp Tyr Pro Gly Glu
 65 70 75 80

Leu Arg Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Arg Asn Arg Glu Ala Ile
 85 90 95

Val Arg Val Arg Ala Phe Tyr Ser Arg Asp Pro Arg Phe Ser Phe Ile
 100 105 110

ES 2 373 329 T3

Leu Leu Pro Glu Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile
 115 120 125
 Gly Gln Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Ser Thr
 130 135 140
 Ile Ala Phe Asp Val Val Ser Lys Leu Ala Ser Lys Met Arg Asp Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Gly Ala Val Met Gly Gln Leu Thr Ala Ser Asn Ser Gly Asp
 165 170 175
 Thr Trp Leu Thr Lys Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn
 180 185 190
 Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ser Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys
 195 200 205
 Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Ala Ser Leu Leu Asp
 210 215 220
 Gln Tyr Glu Thr Gln Leu Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu
 225 230 235 240
 Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu
 245 250 255
 Tyr Val Pro Asp Ala Ile Val Ala Thr Val Val Pro Asp Thr Leu Lys
 260 265 270
 Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp
 275 280 285
 Thr Phe Leu Ala Leu Pro Leu Leu Arg Gly Leu Ser Pro Phe Leu Ala
 290 295 300
 Phe Asp Ala Val Gly Gln Asn Ile Gly Gln Leu Leu Leu Ala Leu Ser
 305 310 315 320
 Val Val Thr Gly Leu Ala His Leu Ile Met Thr Ala Thr Val Pro Trp
 325 330 335
 Trp Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys Met Thr Ile Ile Arg Cys Ser Val
 340 345 350

ES 2 373 329 T3

Val Ala Leu His Ala Arg Gln Leu Arg Phe Leu Gly Phe Val Leu His
 355 360 365

Thr Pro Ile Asn Leu Phe Leu Ile Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu
 370 375 380

Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Tyr Ser Ala Pro Glu
 385 390 395 400

Val Pro Val Ser Gly Gly Lys Gln Thr Pro Ile Gln Thr Ser Gly Arg
 405 410 415

Val Thr Pro Asp Cys Thr Cys Ser Gly Glu
 420 425

<210>6

<211>452

<212> PRT

5 <213> *Rhizobium tropici*

<400> 6

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

Met Leu Ser Thr Ala Tyr Lys Ser Met Gln Val Val Tyr Ala Arg Pro
 20 25 30

Ile Glu Glu Pro Ser Thr Ser Ala Glu Pro Ile Ala Ser Ala Gln Trp
 35 40 45

Pro Ser Val Asp Val Ile Ile Pro Ser Phe Asn Glu Asp Pro Gly Thr
 50 55 60

Leu Trp Asp Cys Leu Glu Ser Ile Ala His Glu Glu Tyr Ala Gly Asp
 65 70 75 80

Leu Asn Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Ser Asn Arg Asp Ala Ile
 85 90 95

Thr Pro Val His Thr Ala Phe Ala Arg Asp Pro Arg Phe Thr Phe Ile
 100 105 110

Leu Leu Arg Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile
 115 120 125

ES 2 373 329 T3

Arg Arg Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile
 130 135 140

Leu Ala Pro Asp Val Val Val Lys Leu Ala Leu Lys Met Gln Asp Pro
 145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Ala Ala Ser Asn Arg His Glu
 165 170 175

Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn
 180 185 190

Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys
 195 200 205

Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Thr Ala Leu Thr Met Leu Leu Asp
 210 215 220

Gln Tyr Glu Thr Gln Met Phe Arg Gly Lys Arg Ser Asp Phe Gly Glu
 225 230 235 240

Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu
 245 250 255

Tyr Val Pro Thr Ala Ile Ala Ala Thr Val Val Pro Asn Lys Leu Arg
 260 265 270

Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp
 275 280 285

Thr Leu Leu Ala Met Asn Leu Leu Pro Gly Leu Asp Arg Phe Leu Thr
 290 295 300

Leu Asp Val Ile Gly Gln Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Gly Leu Ala Gln Phe Ala Leu Thr Gly Thr Val Pro Trp
 325 330 335

Trp Thr Cys Leu Met Ile Ala Ser Met Thr Met Ile Arg Cys Ser Val
 340 345 350

Ala Ala Val Arg Ala Arg Gln Phe Arg Phe Ile Gly Phe Ser Leu His

ES 2 373 329 T3

355 360 365

Thr Phe Ile Asn Ile Phe Phe Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu
370 375 380

Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Gly Ser Ala Ala Lys
385 390 395 400

Ala Thr Gly Lys Gly Gly Lys Leu Asp Ala Ile Gln Asp Pro Val Ala
405 410 415

Ala Ser Ser Pro Arg Glu Ser Gln Glu Asn Glu Ala Pro Leu Arg Arg
420 425 430

His Asn Leu Ala Arg Asp Ala Thr Arg Ser Met Ala Tyr Asp Gly Ile
435 440 445

Cys Thr Asp Gln
450

<210>7

<211>428

<212> PRT

5 <213> *Rhizobium leguminosarum*

<400> 7

Met Thr Met Leu Asp Thr Thr Ser Thr Val Ala Val Ser Leu Tyr Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr Ala Tyr Lys Ser Met Gln Ala Val Tyr Ser Leu Pro
20 25 30

Thr Asp Val Ser Leu Ala Ser His Gly Leu Gly Gly Phe Asp Glu Leu
35 40 45

Pro Ser Val Asp Val Ile Val Pro Ser Phe Asn Glu Asp Pro Arg Thr
50 55 60

Leu Ser Glu Cys Leu Ala Ser Ile Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Arg
65 70 75 80

Leu Gln Val Tyr Leu Val Asp Asp Gly Ser Glu Asn Arg Glu Ala Leu
85 90 95

Arg Leu Val His Glu Ala Phe Ala Arg Asp Pro Arg Phe Asn Ile Leu

ES 2 373 329 T3

Val Ala Met Thr Ile Asp Arg Cys Ser Val Val Ala Leu Arg Ala Arg
 340 345 350

Gln Leu Arg Phe Leu Gly Phe Ser Leu His Thr Phe Ile Asn Ile Phe
 355 360 365

Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu Cys Thr Leu Ser Asn Ile
 370 375 380

Ala Trp Leu Ser Ser Leu Leu Cys Trp Gln Leu Glu Ser Thr Ser Thr
 385 390 395 400

Ala Asp Ala Arg Thr Thr Glu Cys Ser Asp Met Arg Thr Ala Ser Lys
 405 410 415

Leu Ser Pro Pro Pro Ser Cys Gln Ala Asn Asp Val
 420 425

<210>8

<211>450

<212> PRT

5 <213> *Rhizobium* sp.

<400> 8

Met Asp Leu Leu Thr Thr Thr Ser Thr Val Ala Val Ala Cys Tyr Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr Val Tyr Lys Gly Met Gln Ala Val Tyr Ser Leu Pro
 20 25 30

Pro Thr Val Ala Pro Ala Ser Glu Asp Leu Val Gly Ser Asp Leu Trp
 35 40 45

Pro Ser Val Asp Val Ile Ile Pro Cys Tyr Asn Glu Gly Pro Leu Thr
 50 55 60

Leu Ser Ala Cys Leu Asp Ser Ile Ala Asn Gln Glu Tyr Ala Gly Lys
 65 70 75 80

Leu Arg Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Gly Asn Arg Asp Ala Val
 85 90 95

Ile Pro Ile His Asp Asn Tyr Ala Gly Asp Pro Arg Phe Asp Phe Ile
 100 105 110

ES 2 373 329 T3

Leu Leu Pro Glu Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile
 115 120 125
 Arg Arg Ser Ser Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Thr
 130 135 140
 Leu Ala Ser Asp Val Ile Arg Lys Leu Ala Arg Lys Met Gln Asp Pro
 145 150 155 160
 Ala Ile Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Thr Ala Ser Asn Arg Ser Asp
 165 170 175
 Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn
 180 185 190
 Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys
 195 200 205
 Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ser Leu Leu Ser Leu Leu Asp
 210 215 220
 Gln Tyr Glu Thr Gln Met Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu
 225 230 235 240
 Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Glu Ala Gly Phe Arg Thr Glu
 245 250 255
 Tyr Val Pro Asp Ala Ile Ala Val Thr Val Val Pro Asp Arg Leu Gly
 260 265 270
 Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp
 275 280 285
 Thr Leu Leu Ala Leu Arg Leu Leu Pro Gly Leu Asp Arg Tyr Leu Thr
 290 295 300
 Leu Asp Val Val Gly Gln Asn Leu Gly Pro Leu Leu Leu Ala Leu Ser
 305 310 315 320
 Val Ile Ala Gly Ile Ala Gln Phe Ala Leu Thr Ala Thr Leu Pro Trp
 325 330 335
 Pro Thr Ile Leu Val Ile Ala Ala Met Thr Ile Ile Arg Cys Thr Val
 340 345 350

ES 2 373 329 T3

Thr Ala Cys Arg Ala Arg Gln Ala Arg Phe Ile Gly Phe Ser Leu His
 355 360 365

Thr Phe Ile Asn Ile Phe Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu
 370 375 380

Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Lys Thr Ala Thr Leu
 385 390 395 400

Pro Asn Ala Asp Lys Lys Gln Ile Ile Val Ala Asn Pro Ile Ala Gly
 405 410 415

Val Gly Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ala Glu Ala Ile Arg Arg Thr Asp
 420 425 430

Leu Pro Arg Asp Ser Ser Lys Leu Val Asn Ala Asp Ser Val Cys Ser
 435 440 445

Ala Glu
 450

<210>9

<211>424

<212> PRT

5 <213> *Rhizobium loti*

<400> 9

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

Leu Leu Ser Thr Val Tyr Lys Thr Ala Gln Val Phe Tyr Thr Leu Pro
 20 25 30

Thr Asn Val Pro Pro Thr Ser Gly Asp Pro Pro Ser Gly Glu Pro Trp
 35 40 45

Pro Ser Val Asp Val Ile Ile Pro Cys Tyr Asn Glu Ala Pro Arg Thr
 50 55 60

Leu Ser Asp Cys Leu Ala Ser Ile Ala Ser Gln Asp Tyr Ala Gly Lys
 65 70 75 80

Leu Gln Val Tyr Val Val Asp Asp Gly Ser Ala Asn Arg Asp Ala Leu
 85 90 95

ES 2 373 329 T3

Val Gly Val His Glu Glu Tyr Ala Gly Asp Pro Arg Phe Asn Phe Val
 100 105 110

Ala Leu Pro Lys Asn Val Gly Lys Arg Lys Ala Gln Ile Ala Ala Ile
 115 120 125

Arg Arg Ser Cys Gly Asp Leu Val Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr Ile
 130 135 140

Leu Ala Pro Asp Val Ile Thr Arg Leu Ala Leu Lys Met Gln Asp Gln
 145 150 155 160

Ala Val Gly Ala Ala Met Gly Gln Leu Ala Ala Ser Asn Arg Ser Glu
 165 170 175

Thr Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys Asn
 180 185 190

Glu Glu Arg Ala Ala Gln Ala Arg Phe Gly Ala Val Met Cys Cys Cys
 195 200 205

Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asp
 210 215 220

Gln Tyr Glu Thr Gln Arg Phe Arg Gly Lys Pro Ser Asp Phe Gly Glu
 225 230 235 240

Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr Glu
 245 250 255

Tyr Val Pro Glu Ala Val Ala Ala Thr Val Val Pro Asn Ser Met Gly
 260 265 270

Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Phe Arg Asp
 275 280 285

Thr Leu Leu Ala Phe Gln Leu Leu Arg Gly Leu Asn Ile Tyr Leu Thr
 290 295 300

Leu Asp Val Ile Gly Gln Asn Ile Gly Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ser
 305 310 315 320

Ile Leu Ala Gly Leu Ala Gln Phe Val Thr Thr Gly Thr Val Pro Trp
 325 330 335

ES 2 373 329 T3

Thr Ala Cys Leu Met Ile Ala Ala Met Thr Ile Val Arg Cys Ser Val
 340 345 350

Ala Ala Phe Arg Ala Arg Gln Leu Arg Phe Leu Gly Phe Ser Leu His
 355 360 365

Thr Leu Ile Asn Ile Phe Leu Leu Leu Pro Leu Lys Ala Tyr Ala Leu
 370 375 380

Cys Thr Leu Ser Asn Ser Asp Trp Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Asn
 385 390 395 400

Val Gln Asp Thr Gly Asp Ala Leu Pro Lys Pro Asn Leu Val Gly Ser
 405 410 415

Asp Ala Ala Tyr Ser Glu Gln Gln
 420

<210> 10

<211> 3900

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> T-DNA de pTGK42

<220>

<221> características diversas

10 <222> (1)..(25)

<223> borde izquierdo de T-DNA (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (56)..(316)

15 <223> 3' UTR del gen de nopalina sintasa de T-DNA pTIT37 (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (336)..(887)

<223> CDS de fosfinotricina acetil transferasa de Streptomyces hygrosopicus (complemento)

20 <220>

<221> características diversas

<222> (888)..(1720)

<223> región de promotor del gen CamV 35S (complemento)

- <220>
<221> características diversas
<222> (1172)..(2297)
<223> región de promotor P35S2 del gen CaMV 35S
- 5 <220>
<221> características diversas
<222> (2303)..(2359)
<223> secuencia líder 5' Cab22L
- <220>
- 10 <221> características diversas
<222> (2369)..(3562)
<223> región codificante de NodC procedente de A. caulinodans
- <220>
- <221> características diversas
- 15 <222> (3575)..(3795)
<223> terminador 3' 35S
- <220>
- <221> características diversas
<222> (3879)..(3855)
- 20 <223> borde derecho de T-DNA (sintético) (complemento)
- <400> 10

ES 2 373 329 T3

cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc 60
 tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atattttggt 120
 ttctatcggg tattaaatgt ataattgceg gactctaate ataaaaacce atctcataaa 180
 taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 240
 gataatcacc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatggt 300
 tgaacgatct gcttcggatc ctagaacggc tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc 360
 ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacgctc atgccagttc 420
 ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc 480
 atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt 540
 gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccgt ccgctgggtg 600
 cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcggttgcg tgccttcag 660
 gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720
 cgctcccgca gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgceg ctcggtacgg 780
 aagttgaccg tgcttgcttc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840
 gcctcgggtg cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900
 gagatagatt tatagagaga gactgggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac 960
 ttccttatat agaggaaggg tcttgccaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt 1020
 cagtgagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttgaacg tcttcttttt 1080

ES 2 373 329 T3

ccacgatgct cctcgtgggt ggggggccat ctttgggacc actgtcggca gaggcacatctt 1140
 gaatgatagc ctttccttta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccttttcta 1200
 ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa 1260
 ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggctctc tgagactgta tctttgacat 1320
 ttttgagta gaccagagtg tcgtgctcca ccattgtgac gaagattttc ttcttgcgat 1380
 tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cggcagctct cacggcgagt tctgttagat 1440
 cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta 1500
 gagactccaa tctctattac ttgccttggc ttatgaagca agccttgaat cgtccatact 1560
 ggaatagtac ttctgatctt gagaaatatg tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc 1620
 ctgaatcttt tgactgcac ttaaccttc ttgggaaggt atttgatctc ctggagattg 1680
 ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg 1740
 cccgggcata tggcgcgcca tatgcaccat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc 1800
 taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 1860
 acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata 1920
 tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaaca agggtaatat 1980
 cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaa aggacagtag 2040
 aaaaggaagg tggcacctac aatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag 2100
 atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 2160
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg 2220
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacce ttcctctata taaggaagtt 2280
 catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaagaac 2340
 tctttctctt tcttattaaa ccaaaacctt gagtgtcgta gatgtgatcg gtttgcttgc 2400
 gactgcagcc tacgtgacgt tggcgagcgc atacaagggtg gtccagttca ttaacgtgtc 2460
 gagcgtaacg gatgtcgtctg gtctcgaag tgatgctttg ccgctcactc caaggggtga 2520
 cgttatcgtg ccgacattca atgagaactc cagcacattg ctcgagtgcg tcgcttctat 2580
 atgcgcacaa gactaccgcg gaccaataac gattgtcgtg gtagacgatg ggtcgcacaa 2640
 caaacatca tttcacgcag tatgcgacaa gtacgcgagc gacgaaaggc tcatatttgt 2700
 cgaacttgat caaaacaagg ggaagcgcgc cgcgcaaattg gaggccatca ggagaacaga 2760
 cggagacctg atactaaacg tagactcggc cacgggtata gataaggatg ttgttacaaa 2820
 gcttgcgtcg tccatgagag ccccgaatgt cgggtggtgtc atggggcagc tcgttgcaaa 2880

ES 2 373 329 T3

gaatcgagaa agatcttggc ttaccagatt aatcgatatg gagtactggc ttgcgtgtaa 2940
 cgaggagcgc attgcgcagt cgaggtttgg ctccgtgatg tgttgttgtg ggccgtgcgc 3000
 catgtataga agatctgcaa ttacgccact attggcagaa tatgagcacc agacattcct 3060
 agggcgctccg agcaactttg gtgaggatcg ccatctcaca atcctgatgc tgaaggcggg 3120
 atttcggacc gggtagctcc caggtgccgt agcgaggacg ttggttccgg atgggctggc 3180
 gccgtacctg cgccagcaac tccgctgggc ccgcagcact tatcgcgaca ccgccctcgc 3240
 cttacgtata aagaaaaatc taagcaaata tatcaccttt gagatatgcg cacagaattt 3300
 gggtagcggc ctottacttg tgatgaccat gatttccgct tcgctgacta catcagggtc 3360
 gcaaacgccc gttatcattc tgggtgtcgt tgtggggatg tctataataa gatggtgttc 3420
 tgtcgccctt atagcgaaaag attttcggtt tctatacttc atcgttcact cagcgttgaa 3480
 tgttctaatt ttaacgccgt taaaactcta tgccctgtta accattcggg atagtcgggtg 3540
 gctatcacgc gagagttcct aagctagcaa gcttggacac gctgaaatca ccagtctctc 3600
 tctacaaaac tatctctctc tattttctcc ataataatgt gtgagtagtt ccagataag 3660
 ggaattaggg ttccctatagg gtttcgctca tgtggtgagc atataagaaa cccttagtat 3720
 gtatttgtat ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa accaaaatcc 3780
 agtactaaaa tccagatcat gcatggtaca ggggcccaatt gcccaattccg gggtaaccgt 3840
 cgacggccga gtactggcag gatataatc gttgtaatth gtcgcgtgtg aataagtcgc 3900

<210> 11

<211>4680

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> T-DNA de pTGK44

<220>

<221> misc feature

10 <222> (1)..(25)

<223> Borde izquierdo de T-DNA (sintético) (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (56) .. (316)

15 <223> 3' UTR del gen de nopalina sintasa de T-DNA pTIT37 (complemento)

<220>

<221> características diversas

ES 2 373 329 T3

- <222> (336)..(887)
<223> CDS de fosfotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (complemento)
<220>
<221> características diversas
- 5 <222> (888)..(1720)
<223> Región de promotor P35S3 de CaMV (complemento)
<220>
<221> características diversas
- <222> (1172)..(2297)
10 <223> Región de promotor P35S2 de CaMV
<220>
<221> características diversas
<222> (2303)..(2359)
<223> secuencia líder de 5' cab22L
- 15 <220>
<221> características diversas
<222> (2369)..(3558)
<223> región codificante de nodo de *A.caulinodans*
<220>
- 20 <221> características diversas
<222> (3560)..(4279)
<223> EGFP ORF que codifica proteína fluorescente verde potenciada
<220>
<221> características diversas
- 25 <222> (4304)..(4524)
<223> terminador 3' 35S
<220>
<221> características diversas
<222> (44008)..(4584)
- 30 <223> borde derecho de T-DNA (sintético)
<400> 11

ES 2 373 329 T3

cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc	60
tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atatcttgtt	120
ttctatcgcg tattaatgt ataattgcgg gactcctaate ataaaaaccc atctcataaa	180
taacgcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat	240
gataatcacc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatggt	300
tgaacgatct gcttcggatc ctagaacggc tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc	360
ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtec agctgccaga aaccacgctc atgccagtcc	420
ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc	480
atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt	540
gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccgt ccgctggtgg	600
cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag	660

ES 2 373 329 T3

gggccccgct aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720
 cgctcccgca gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgceg ctcggtacgg 780
 aagttgaccg tgcttgtctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840
 gcctcggtagg cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900
 gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac 960
 ttccttatat agaggaaggg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt 1020
 cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaacg tcttcttttt 1080
 ccacgatgct cctcgtgggt ggggggccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattct 1140
 gaatgatagc ctttccctta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccctttcta 1200
 ctgtcccttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa 1260
 ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat 1320
 ttttgagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatggtgac gaagatttcc tcttctgcat 1380
 tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgccagtctt cacggcgagt tctgtagat 1440
 cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta 1500
 gagactcaa tctctattac ttgccttggg ttatgaagca agccttgaat cgtccatact 1560
 ggaatagtac ttctgatctt gagaaatag tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc 1620
 ctgaatcttt tgactgcatc tttaaccttc ttgggaaggt atttgatctc ctggagattg 1680
 ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg 1740
 cccgggcata tggcgcgcca tatgcacat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc 1800
 taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 1860
 acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata 1920
 tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacia agggtaatat 1980
 cgggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca cttcatcaa aggacagtag 2040
 aaaaggaagg tggcacctac aatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag 2100
 atgcctctgc cgacagtggg cccaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 2160
 aagaagacgt tocaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg 2220
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata taaggaagtt 2280
 catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaagaac 2340
 tcttttctct tcttattaaa ccaaaacctat gagtgcgta gatgtgatcg gtttgcttgc 2400

ES 2 373 329 T3

gactgcagcc tacgtgacgt tggcgagcgc atacaaggtg gtccagttca ttaacgtgtc 2460
gagcgtaacg gatgtcgctg gtctcgaaag tgatgctttg ccgctcactc caagggttga 2520
cgttatcgtg ccgacattca atgagaacte cagcacattg ctcgagtgcg tcgcttctat 2580
atgcccacaa gactaccgcg gaccaataac gattgtcgctg gtagacgatg ggtcgaccaa 2640
caaaacatca ttccacgcag tatgcgacaa gtacgcgagc gacgaaaggt tcatatttgt 2700
cgaacttgat caaaacaagg ggaagcgcgc cgcgcaaagtg gaggccatca ggagaacaga 2760
cggagacctg atactaaacg tagactcggg caccggttata gataaggatg ttgttacaaa 2820
gcttgcgctg tccatgagag ccccgaatgt cgggtggtgtc atggggcagc tcggttcaaa 2880
gaatcgagaa agatcttggc ttaccagatt aatcgatatg gagtactggc ttgctgttaa 2940
cgaggagcgc attgcgacgt cgaggtttgg ctccgtgatg tgttgttggtg ggccgtgcgc 3000
catgtataga agatctgcaa ttaccgcaact attggcagaa tatgagcacc agacattcct 3060
agggcgtccg agcaactttg gtgaggatcg ccatctcaca atcctgatgc tgaaggcggg 3120
atctcggacc gggtagctcc cagggtgccgt agcaggagcgt ttggttccgg atgggctggc 3180
gccgtacctg cgccagcaac tccgctgggc cgcgagcact tatcgcgaca ccgccctcgc 3240
cttacgtata aagaaaaatc taagcaaata taccacctt gagatatgcg cacagaattt 3300
gggtacggct ctcttacttg tgatgaccat gatttcgctt tcgctgacta catcagggtc 3360
gcaaacgccc gttatcattc tgggtgtcgt tgtggggatg tctataataa gatgttgttc 3420
tgtcgcctt atagcgaaag attttcgggt tctatacttc atcgttcact cagcgttgaa 3480
tgttctaatt ttaacgccgt taaaactcta tgccctgtta accattcggg atagtcgggtg 3540
gctatcacgc gagagtcca tgggtgagcaa gggcgaggag ctgttcaccg ggggtggtgcc 3600
catcctggte gagctggacg gcgacgtaaa cggccacaag ttcagcgtgt ccggcgaggg 3660
cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc atctgcacca ccggcaagct 3720
gcccggtccc tggcccacc tcgtgaccac cctgacctac ggcgtgcagt gcttcagccg 3780
ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgcccg aaggctacgt 3840
ccaggagcgc accatcttct tcaaggacga cggcaactac aagaccgcg ccgaggtgaa 3900
gttcgagggc gacaccctgg tgaaccgcat cgagctgaag ggcacgcact tcaaggagga 3960
cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat 4020
ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgccaca acatcgagga 4080
cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt 4140
gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga 4200

ES 2 373 329 T3

gaagcgcgat cacatgggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat 4260
 ggacgagctg tacaagtaaa gcggccgcga ctctagcaag cttggacacg ctgaaatcac 4320
 cagtctctct ctacaaatct atctctctct attttctcca taataatgtg tgagtagttc 4380
 ccagataagg gaattagggg tcctataggg ttctgctcat gtggtgagca tataagaaac 4440
 ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa 4500
 ccaaaatcca gtactaaaat ccagatcatg catggtacag cggccaattg ccaattccgg 4560
 ggtaccgggc gacggccgag tactggcagg atatataccg ttgtaatttg tcgcgtgtga 4620
 ataagtcgct gtgtatgttt gtttgattgt ttctggtgga gtgcagccca tttcaccgga 4680

<210> 12

<211> 5490

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> T-DNA de pTDBI5

<220>

<221> misc feature

10 <222> (1)..(25)

<223> Borde izquierdo de T-DNA (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (56)..(316)

15 <223> 3' nos: 3'UTR del gen de nopalina sintasa de T-DNA pTiT37 (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (887)..(336)

20 <223> bar: secuencia codificante de fosfotricina acetil transferasa de Streptomyces hygroscopicus (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (888)..(1720)

<223> P35S3: Región de promotor del gen CaMV35S (complemento)

25 <220>

<221> características diversas

<222> (1796)..(2303)

<223> P35S2: Región de promotor del gen CaMV35S

- <220>
<221> características diversas
<222> (2304)..(2368)
<223> 5'cab22L: secuencia líder no traducida del gen cab22L de Petunia
- 5 <220>
<221> características diversas
<222> (2369)..(3992)
<223> chs2exon1: exón 1 del gen de quitina sintasa 2 de Neurospora crassa
- <220>
- 10 <221> características diversas
<222> (3993)..(5203)
<223> chs2exon2: exón 2 del gen de quitina sintasa 2 de Neurospora crassa
- <220>
- <221> características diversas
- 15 <222> (5205)..(5453)
<223> 3'35S: región no traducida de 3' del gen CaMV35S
- <220>
- <221> características diversas
<222> (5488)..(5512)
- 20 <223> RB: borde derecho de T-DNA (sintético) (complemento)
- <400> 12

ES 2 373 329 T3

cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc 60
 tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atatTTTTgtt 120
 ttctatcgcg tattaaatgt ataattgceg gactctaate ataaaaaccc atctcataaa 180
 taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 240
 gataatcacc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatggt 300
 tgaacgatct gcttcggatc ctagaacgcg tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc 360
 ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aacccacgtc atgccagttc 420
 ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc 480
 atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt 540
 gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccgt ccgctggtgg 600
 cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag 660
 gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720
 cgctcccga gacggaecgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgceg ctcggtacgg 780
 aagtgaccg tgcttgctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840
 gcctcgggtg caccggcgat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900
 gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac 960
 ttccttatat agaggaaggg tcttgccaag gatagtggga ttgtgcgtca tccttacgt 1020
 cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaaac tcttcttttt 1080

ES 2 373 329 T3

ccacgatgct cctcgtgggt ggggggccat ctttgggacc actgtcggca gaggcacctt 1140
 gaatgatagc ctttccttta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccttttcta 1200
 ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg ttcccgaaa 1260
 ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttgggtcttc tgagactgta tctttgacat 1320
 ttttgagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatggtgac gaagattttc ttcttgtcat 1380
 tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgccagtctt cacggcgagt tctgttagat 1440
 cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta 1500
 gagactccaa tctctattac ttgccttgggt ttatgaagca agccttgaat cgtccatact 1560
 ggaatagtac ttctgatctt gagaaatatg tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc 1620
 ctgaatcttt tgactgcate tttaaccttc ttgggaaggt atttgatctc ctggagattg 1680
 ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg 1740
 cccgggcata tggcgcgcca tatgcaccat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc 1800
 taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 1860
 acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata 1920
 tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaaca agggtaatat 1980
 cgggaaacct cctcggatte cattgccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag 2040
 aaaaggaagg tggcacctac aatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag 2100
 atgcctctgc cgacagtgggt cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 2160
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg 2220
 taagggatga cgcaacaatc cactatcctt cgcaagacct ttctctata taaggaagtt 2280
 catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaagaac 2340
 tcttttctct tcttattaaa ccaaaacctt ggagtcgaga atcagcaacc ggttatcgag 2400
 ttccgccaca aggacggtac gagccttcag aaatcgatgt catgccaggc cagggacacc 2460
 gggatcgagt tacggaaatg cgaggcgacc gcttccctcg gcaccagcgc ctttactacta 2520
 caatagccca agtcgogcag cgagtcatta tccacggtac catggagggt atgcggacga 2580
 cgtgacagtt agcatgggac cggacgacga tcgtacagat atctttggcc ccgaaaccga 2640
 tctcagcgaa acgcgccacc tcaacgacgc atacgggttt cggtcatccc agatcacctt 2700
 cagcgaagat ccccacggca cccacgcgcg ttcccggtag gacgacgaag acgatgtgag 2760
 caccacttat tctccaaca cgggcaccag cgcttcaggt gtcgacaagt tcgagcatta 2820

ES 2 373 329 T3

cgggccatt cgggaggaag gcaagcacga ggggcccggc gtgcccacc cacagatgct 2880
 gaggaaggaa gtccagctca tcaacggcga actcgttctc gaggcaaga ttccgactat 2940
 attgtattcg tttttgccc ggagagacga agtggagttt acgcacatgc ggtacacagc 3000
 cgtcacttgt gaccctgatg actttgttgc caggggttac aagttgcgcc agaatatcgg 3060
 tcgtaccgcc agggagacgg agctgttcat ctgctgacc atgtacaacg aggacgagtt 3120
 cggattcaca cggactatgc acgcagtcat gaagaacatt tcgcattttt gttcccgaaa 3180
 caagagtagg acgtggggag cggatgggtg gcagaagatt gtggtctgtg tggtttcgga 3240
 tggacgagag atcattcacc cccggacctt ggacgccctc gcagccatgg gcgtttacca 3300
 gcacggtatc gccagaact ttgtcaacca gaaggcggtg caggcccacg tttacgagta 3360
 cacgacaaa gtgtctctgg acagcgacct caagttcaag ggcgccgaga agggcatcgt 3420
 gccctgccag atgatttttt gcttgaagga gaagaaccaa aagaaactca actcgcatag 3480
 atggttcttc aacgcctttg gcaaagcctt gaaccgcaat gtgtgtatcc tcttagacgt 3540
 cggcaccgcg cccggcggca caagtctcta ccatctctgg aaagccttcg acacggattc 3600
 caacgtggcg ggggcctgcg gggaaatcaa agcagatgaag gggcggtttg gcgggaattt 3660
 gctcaaccct ctggtggcta gtcagaactt tgagtacaag atgagcaata ttctggaaa 3720
 accgttgagg tcggtgtttg ggtacatcac ggtgttgccg ggcgccttgt cggcgtatcg 3780
 gtaccatgcg ctgcagaacg atgagacggg ccatgggccc ttgagtcagt atttcaaggg 3840
 cgagacgctc catgggcagc acgcggatgt gtttacggcg aacatgtact tggccgagga 3900
 ccgaattctg tgttgggagt ttgtggccaa gagggggtgag aggtgggtgt tgaagtatgt 3960
 gaaggggtgt acgggtgaga cggatgtgcc tgacaccgct ccggaattcg tctcgcaacg 4020
 tcgtcgttgg ctcaacggtg ccttctctgc cgcctctac tcctcgtcc actttcgaca 4080
 aatctggaaa accgaccaca cttttatgcg caaagcctt ctccacgctg aattcctcta 4140
 ccacctctg caactcctct tcacctactt ctccctggcc aacttctacc tcgccttcta 4200
 ctttatcgcc ggcggctctg ccgatcccca cgtcgaccct tttaactcgg acggccacgt 4260
 cgcgcgcatc atcttcaaca tcctccgcta cgtctgcgct ctgctgatct gcacacaatt 4320
 catcttctcc ctgggcaacc gtcgcagggg tgccaaaaga atgtatctcg catccatgat 4380
 catctacgcc gtcatcatgg tgtacaccac cttcgccacc atcttcatcg tcgtgcgaca 4440
 aatccaaccc tctcaaaaat ccgacgaaa gcccgacctc gaactcggca acaacgtctt 4500
 caccaacctg atcgtctccg tggttagtac cctcgggctc tacttcgtea tgcctttct 4560
 ctatctcgac ccctggcaca tgttcacctc ggccatccag tactttgtcc tgctgccttc 4620

ES 2 373 329 T3

```

ctacatctgc acgctccaga tctacgcctt ttgcaacacc cacgacgtca catggggcac 4680
caaaggcgac aacgtgatgc gcaccgatct cggaggcgcc attggcaagg gaagcaccgt 4740
cgaactggaa atgccttcgg accaactcga catcgactcg ggatacgacg aatgtctacg 4800
taatctccgc gatcgcgtca tgggccctgc cgttcccgtg tccgaggacc agctgcagca 4860
ggattactac aagtcggtgc gcacgtacat ggtggtgctg tggatggtgg ccaacgcgac 4920
gctggccatg gcggtctcgg aagcgtatgg cgattcggaa attggggata atttttactt 4980
gcggtttatc ctgtgggagg tggcggccct ggcgctgttt agagcgttgg ggtcgacgac 5040
gtttgcggcg attaatctgg tgagtgtctc cgtggagggc agggtcagge tgaggttgaa 5100
tatgaaaggg tttaggtgga ttaaggagaa gtgggggggat gcggatgtga agggcaagtt 5160
tgaggggttg ggggatcggg cgagggggtt ggcgagggcg tgagctagca agcttggaca 5220
cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctct ctattttctc cataataatg 5280
tgtgagtagt tcccagataa ggaattagg gttcctatag ggtttcgctc atgtgttgag 5340
catataagaa acccttagta tgtatttgta tttgtaaaat acttctatca ataaaatttc 5400
taattcctaa aaccaaatac cagtactaaa atccagatca tgcattgtac agcggccaat 5460
tccggggtac ggtcgacggc cgagtactgg 5490

```

<210> 13

<211> 5606

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> T-DNA de ppTDBI37

<220>

<221> características diversas

10 <222> (1)..(25)

<223> Borde izquierdo de T-DNA (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (56)..(316)

15 <223> 3' nos: 3' UTR del gen de nopalina sintasa de T-DNA pTiT37 (complemento)

<220>

<221> características diversas

<222> (336)..(887)

<223> bar: CDS de fosfinotricina de acetil transferasa de Streptomyces hygroscopicus (complemento)

<220>
<221> características diversas
<222> (888)..(1720)
<223> P35S3: región de promotor del transcrito CaMV 35S (complemento)
5 <220>
<221> características diversas
<222> (1769)..(2303)
<223> P35S2: región de promotor del transcrito CaMV 35S
<220>
10 <221> características diversas
<222> (2304)..(2368)
<223> 5'cab22L: secuencia líder del gen cab22L de Petunia
<220>
<221> características diversas
15 <222> (2373)..(2477)
<223> XylT: señal marcadora de Golgi de la proteína beta 1,2-xilosiltransferasa
<220>
<221> características diversas
<222> (2487)..(5321)
20 <223> CHS2: región codificante de quitina sintasa 2 de Neurospora crassa (exón 1 y exón 2).
<220>
<221> características diversas
<222> (5323)..(5571)
<223> 3'35S: fragmento 3' UTR del transcrito CaMV 35S
25 <220>
<221> características diversas
<222> (5630)..(5606)
<223> RB: borde derecho de T-DNA (sintético) (complemento)
<400> 13

ES 2 373 329 T3

cggcaggata	tattcaattg	taaattggctc	catggcgatc	gctctagagg	atctgcgac	60
tagtaacata	gatgacaccg	cgcgcgataa	tttatcctag	tttgcgcgct	atattttggt	120
ttctatcgcg	tattaaatgt	ataattgcgg	gactctaatac	ataaaaaccc	atctcataaa	180
taacgtcatg	cattacatgt	taattattac	atgcttaacg	taattcaaca	gaaattatat	240
gataatcacc	gcaagaccgg	caacaggatt	caatcttaag	aaactttatt	gccaaatggt	300
tgaacgatct	gcttcggatc	ctagaacgcg	tgatctcaga	tctcggtgac	gggcaggacc	360
ggacggggcg	gtaccggcag	gctgaagtcc	agctgccaga	aaccacgctc	atgccagttc	420
ccgtgcttga	agccggccgc	ccgcagcatg	ccgcgggggg	catatccgag	cgctcgtgc	480
atgocacgc	tcgggtcgtt	gggcagcccg	atgacagcga	ccacgctctt	gaagccctgt	540
gcctccaggg	acttcagcag	gtgggtgtag	agcgtggagc	ccagtcccgt	ccgctggtgg	600
cggggggaga	cgtacacggt	cgactcggcc	gtccagtcgt	aggcgttgcg	tgcttccag	660

ES 2 373 329 T3

gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720
 cgctccccga gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgcbg ctcbggtacgg 780
 aagttgaccg tgcttgctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840
 gcctcgggtg cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900
 gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaatgaac 960
 ttccttatat agaggaaggg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt 1020
 cagtggagat gtcacatcaa tccacttget ttgaagacgt ggttggaaacg tcttcttttt 1080
 ccacgatgct cctcgtgggt gggggccat ctttgggacc actgtcggca gaggcatctt 1140
 gaatgatagc ctttcttta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccctttcta 1200
 ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa 1260
 ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat 1320
 ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccattgtgac gaagattttc ttcttgtcat 1380
 tgagtcgtaa aagactctgt atgaactgtt cgcagctctt cacggcagat tctgttagat 1440
 cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta 1500
 gagactccaa tctctattac ttgccttggg ttatgaagca agccttgaat cgtccatact 1560
 ggaatagtac ttctgatctt gagaaatag tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc 1620
 ctgaatcttt tgactgcate tttaaccttc ttgggaaggg atttgatctc ctggagattg 1680
 ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg 1740
 cccgggcata tggcgcgcca tatgcacat acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc 1800
 taacagaact cgcctggaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 1860
 acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata 1920
 tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaaaa aggtaatat 1980
 cgggaaacct cctcggatcc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag 2040
 aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag 2100
 atgcctctgc cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 2160
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg 2220
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata taaggaagtt 2280
 catttcattt ggagaggact cgagctcatt tctctattac ttcagccata acaaaaagaac 2340
 tctttctctc tcttattaaa ccaaaacctt ggatgagtaa acggaatccg aagattctga 2400
 agatttttct gtatatgtta cttctcaact ctctctttct catcatctac ttcgtttttc 2460

ES 2 373 329 T3

actcatcgtc gttttcagcc aaaaccatgg agtccagaat cagcaaccgg ttategagtt 2520
 ccgccacaag gacggtacga gccttcagaa atcgatgtca tgccaggcca gggacaccgg 2580
 gatcgagtta cggaaatgcg aggcgaccgc ttcctcggc accagegcct ttacactaca 2640
 atagcccaag tcgcgacgag agtcattatc cacggtagca tggaggttat gcggacgacg 2700
 tgacagttag catgggaccg gacgacgatc gtacagatat ctttggtccc gaaaccgatc 2760
 tcagcgaaac gcgccacctc aacgacgcat acgggtttcg gtcaccccag atcacectca 2820
 gcgaagatcc ccacggcacc cacgcgcgtt cccggtaega cgacgaagac gatgtgagca 2880
 ccacttattc ctccaacacg ggcaccagcg cttcaggtgt cgacaagttc gagcattacg 2940
 gtcccattcc ggaggaaggc aagcacgagc ggcgcggcgt gcgaccacca cagatgtcga 3000
 ggaaggaagt ccagctcacc aacggcgaac tcgttctcga gtgcaagatt ccgactatat 3060
 tgtattcggt tttgccagc agagacgaag tggagtttac gcacatgagg tacacagccg 3120
 tcaactgtga ccctgatgac tttgttgcca ggggttacia gtgcgccag aatatcggtc 3180
 gtaccgccag ggagacggag ctgttcatct gcgtgacct gtacaacgag gacgagttcg 3240
 gattcacacg gactatgcac gcagtcatga agaacatttc gcatttttgt tcccgaaca 3300
 agagtaggac gtggggagcg gatgggtggc agaagattgt ggtctgtgtg gtttcggatg 3360
 gacgagagat cattcaccct cggaccttg acgccctcgc agccatgggc gtttaccagc 3420
 acggtatcgc caagaacttt gtcaaccaga aggcggtgca ggcccacggt tacgagtaca 3480
 cgacacaagt gtctctggac agcgacctca agttcaaggc cgccgagaag ggcacgtgac 3540
 cctgccagat gattttttgc ttgaaggaga agaaccacaaa gaaactcaac tcgcatagat 3600
 ggttcttcaa cgcctttggc aaagccttga acccgaatgt gtgtatctc ctagacgtcg 3660
 gcacccgccc cggcggcaca agtetctacc atctctggaa agccttcgac acggattcca 3720
 acgtggcggg ggcctgcggg gaaatcaaag cgatgaaggc gcggtttggc gggaaattgc 3780
 tcaaccctct ggtggctagt cagaactttg agtacaagat gagcaatatt ctggacaaac 3840
 cgttggagtc ggtgtttggg tacatcacgg tgttgccggc cgccttgctg gcgtatcggc 3900
 accatgcgct gcagaacgat gagacgggac atgggcccgt gagtcagtat ttcaagggag 3960
 agacgctcca tgggcagcac gcggatgtgt ttacggcgaa catgtacttg gccgaggacc 4020
 gaattctgtg ttgggagttg gtggccaaga ggggtgagag gtgggtgttg aagtatgtga 4080
 aggggtgtac gggtgagacg gatgtgcctg acaccgtccc ggaattcgtc tcgcaacgac 4140
 gtcggtggct caacggtgcc ttcttcgccc cgcgtctact cctcgtccac ttctgacaaa 4200

ES 2 373 329 T3

tctggaaaac cgaccacacc tttatgcgca aagcccttct ccacgtcgaa ttcctctacc 4260
 acctcctgca actcctcttc acctacttct ccctggccaa cttctacctc gccttctact 4320
 ttatcgccgg cgggtctcgcc gatccccacg tcgacccttt taactcggac ggccacgtcg 4380
 cgcgcatcat cttcaacatc ctccgctacg tctgcgctct gctgatctgc acacaattca 4440
 tcttgtccct cggcaaccgt ccgcaggggtg ccaaaaagaat gtatctcgca tccatgatca 4500
 tctacgccgt catcatgggtg tacaccacct tcgccacct cttcatcgtc gtgcgacaaa 4560
 tccaaccctc tcaaaaatcc gacgacaagc ccgacctga actcggcaac aacgtcttca 4620
 ccaacctgat cgtctccgtg gctagtacc cggggtctta cttegtcatg tcctttctct 4680
 atctcgacct ctggcacatg ttcacctcgg ccattccagta ctttgtcctg ctgccttctt 4740
 acatctgcac gctccagatc tacgcctttt gcaacaccca cgacgtcaca tggggcacca 4800
 aaggcgacaa cgtgatgcgc accgatctcg gaggcgccat tggcaagga agcaccgtcg 4860
 aactggaaat gccttcggac caactcgaca tcgactcggg atacgacgaa tgtctacgta 4920
 atctccgca tcgctcatg gtcctcgcg ttcctcgtgc cgaggaccag ctgcagcagg 4980
 attactaaa gtcgggtgcgc acgtacatgg tgggtgctcg gatggtggcc aacgcgacgc 5040
 tggccatggc ggtctcggaa gcgtatggcg attcggaaat tggggataat ttttacttgc 5100
 ggtttatcct gtgggcgggtg gcggccctgg cgctgtttag agcgttgggg tcgacgacgt 5160
 ttgcggcgat taatctgggtg agtgctctcg tggagggcag ggtcaggctg aggttgaata 5220
 tgaaaggggt taggtggatt aaggagaagt ggggggatgc ggatgtgaag ggcaagtttg 5280
 aggggttggg ggatcgggcg aggggggttg cgaggcgggt agctagcaag cttggacacg 5340
 ctgaaatcac cagtctctct ctacaaatct atctctctct attttctcca taataatgtg 5400
 tgagtagttc ccagataagg gaattagggg tcctataggg tttcgtcat gtggtgagca 5460
 tataagaaac ccttagtatg tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta 5520
 attcctaaa ccaaaatcca gtaactaaaat ccagatcatg catggtacag cggccaattc 5580
 cggggtacgg tcgacggccg agtact 5606

<210> 14

<211> 6464

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> T-DNA de pTDBI50

<220>

<221> características diversas

10 <222> (1)..(25)

- <223> LB: Borde izquierdo de T-DNA (sintético) (complemento)
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (56)..(316)
- 5 <223> 3'nos: 3'UTR del gen de nopalina sintasa de T-DNA pTiT37 (complemento)
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (336)..(887)
- <223> bar: CDS de fosfotricina acetil transferasa de Streptomyces hygrosopicus (complemento)
 10 <220>
 <221> características diversas
 <222> (888)..(1720)
 <223> P35S3: región de promotor del transcrito CaMV 35S (complemento).
 <220>
- 15 <221> características diversas
 <222> (1766)..(3173)
 <223> F286: región de promotor específica de la fibra
 <220>
 <221> características diversas
- 20 <222> (3189)..(3250)
 <223> 5' cab22L: secuencia líder del gen cab22L de Petunia
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (3255)..(3359)
- 25 <223> XylT: señal señalizadora de Golgi de la proteína beta 1,2 xilosiltransferasa
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (3369)..(6203)
- <223> CHS2: región codificante de quitina sintasa de Neurospora crassa
 30 <220>
 <221> características diversas
 <222> (3369)..(6203)
 <223> 3' 35S: fragmento 3' YTR del transcrito CaMV 35S.
 <220>
- 35 <221> características diversas

ES 2 373 329 T3

<222> (6488)..(6464)

<223> RB: borde derecho de T-DNA (sintético) (complemento)

<400> 14

```
cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc    60
tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atatcttggtt    120
ttctatcgcg tattaatgt ataattgcgg gactctaate ataaaaaccc atctcataaa    180
```

ES 2 373 329 T3

taacgtcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 240
 gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatggt 300
 tgaacgatct gcttcggatc ctagaacgcg tgatctcaga tctcggtgac gggcaggacc 360
 ggacggggcg gtaccggcag gctgaagtcc agctgccaga aaccacgtc atgccagttc 420
 ccgtgcttga agccggccgc ccgcagcatg ccgcgggggg catatccgag cgcctcgtgc 480
 atgcgcacgc tcgggtcgtt gggcagcccg atgacagcga ccacgctctt gaagccctgt 540
 gcctccaggg acttcagcag gtgggtgtag agcgtggagc ccagtcccgt ccgctggtgg 600
 cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcg tgccttcag 660
 gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctcg ccgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720
 cgctcccga gacggacgag gtcgtccgtc cactcctgcg gttcctgcgg ctccggtacgg 780
 aagttgaccg tgcttgcttc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840
 gcctcggtag cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900
 gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaaatgaac 960
 ttccttatat agaggaaggg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt 1020
 cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaacg tcttcttttt 1080
 ccacgatgct cctcgtgggt gggggtccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattctt 1140
 gaatgatagc ctttccttta tcgcaatgat ggcatttgta ggagccacct tccctttcta 1200
 ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa 1260
 ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggctctc tgagactgta tctttgacat 1320
 ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccattgtgac gaagattttc ttcttgatcat 1380
 tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgcagctctt cacggcgagt tctgttagat 1440
 cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac taccttttta 1500
 gagactccaa tctctattac ttgccttggt ttatgaagca agccttgaat cgtccatact 1560
 ggaatagtac ttctgatctt gagaaatag tctttctctg tgttcttgat gcaattagtc 1620
 ctgaatcttt tgactgcatc ttaaccttc ttgggaagggt atttgatctc ctggagattg 1680
 ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgcgtagg aacgcggccg ctgtacaggg 1740
 cccgggcata tggcgcgccg gtacccaacc tctcagactg ccatattggg tttttcacta 1800
 cccacctctt cattaaatgt atcttcaacc tctcaactcc tttcaccacc agacgaatct 1860
 tctttagcaa aatcaaatg accttatgaa aatttagcac gtccacctcc agattcaaag 1920
 gctgtgaatc cccaacttcg gaaattgctt atctccacat tcaagaataa tgagttcctc 1980

ES 2 373 329 T3

aatttgtttt aactgattag cggatattaa gcgagttaga ctccatggaa ataaaatcac 2040
cctaataaat agcaacgctt ttgaacgtct ctaggttcca agcgtgctaa ggagcgccag 2100
taacttcaat ccaagttgtg cgaaaacgta tgaaatggaa ctgagaccag cgttcaacat 2160
cgatgaaaat ttgttttaac aatgagaact gcaaactctc catagtcttc taacatttca 2220
acattcgaaa tctcgaaaag aaattggctt gatatgattt atttaggggtg ttaattttat 2280
gtattataat aatgcacaaa ttgatatttt atgcatcaca tttaatattt ttaaagtata 2340
taatatcaaa tcattttatg aaaataaaaa taccaaataa tacataaatt gatagttcaa 2400
gtatttcatt aaaaattttc aaaatataaa tatcatattg aaacatttta taaaagaata 2460
gataccaaat atgacatcat cccctgttga gagtaaccaa aactgtttt catccagccc 2520
atgagaagta tttggcccaa aagcaaaagt ttcagtacaa tgaattatga atcccaaaaa 2580
aaccccaagt ggtccaggtc caagccagtc tagggctgag gaaagaaatg gaaaaattga 2640
aaagtaattc cagggctctga ttcaatttta ttaaatttag tttgattttg gtttcggttc 2700
ataaatttaa aaataatttt aaaatgttat ataaaactgt ttttaaaaa taaattaatc 2760
aataatctaa aacgataaaa atggcgattt gaattaagct catattttga aaaaaaata 2820
aaaattatct catccagaac tgattaaaac cgaaccgatg aatcctagaa gccaaagcaa 2880
gtgtgcagag taagaataga acatcaacat tttgctttaa gcttttcggt gcttgcactc 2940
taagaagcat aaaacgcaag caaaacttga cactagtgtg agtgtgagtg cccatcattc 3000
atcaaccctg aaaatcgccc tccccctaat cagttctaac ctactttct aacactttca 3060
ctgcagcact caaaaacatt cgccgaatct ttactataaa ctcccagtgt tggtttctcc 3120
actccaaacc caaaccacga ccaccacatt ttgcttcgta tctttgatat ctagatctcc 3180
cgggagctca tttctctatt acttcagcca taacaaaaga actcttttct cttottatta 3240
aaccaaaacc atggatgagt aaacggaatc cgaagattct gaagattttt ctgtatatgt 3300
tactttctaa ctctctcttt ctcatcatct acttcgtttt tcactcatcg tegttttcag 3360
ccaaaacat ggagtcacaga atcagcaacc ggttatcgag ttccgccaca aggacggtac 3420
gagcctcag aaatcgatgt catgccaggc cagggacacc gggatcgagt tacggaaatg 3480
cgaggcgacc gcttcctcgc gcaccagcgc ctttactacta caatagccca agtcgcgcag 3540
cgagtcatta tccacggtac catggagggt atgcggacga cgtgacagtt agcatgggac 3600
cggacgacga tcgtacagat atctttggcc ccgaaaccga tctcagcga acgcgccacc 3660
tcaacgacgc atacgggttt cggtcatccc agatcacctc cagcgaagat cccacggca 3720

ES 2 373 329 T3

cccacgcgcg ttcccggtag gacgacgaag acgatgtgag caccacttat tcctccaaca 3780
 cgggcaccag cgcttcaggt gtcgacaagt tgcgacatta cgggtcccatt ccggaggaag 3840
 gcaagcacga gcggcgcggc gtgcgaccac cacagatgtc gaggaaggaa gtccagctca 3900
 tcaacggcga actcgttctc gagtgcaaga ttccgactat attgtattcg tttttgcca 3960
 ggagagacga agtggagttt acgcacatgc ggtacacagc cgtcacttgt gaccctgatg 4020
 actttgttgc caggggttac aagttgcgcc agaatatcgg tcgtaccgcc agggagacgg 4080
 agctgttcat ctgctgacc atgtacaacg aggacgagtt cggattcaca cggactatgc 4140
 acgcagtcac gaagaacatt tcgcattttt gttcccgaac caagagtagg acgtggggag 4200
 cggatgggtg gcagaagatt gtggtctgtg tggtttcgga tggacgagag atcattcacc 4260
 cccggacctt ggacgcctc gcagccatgg gcgtttacca gcacgggtatc gccaaagaact 4320
 ttgtcaacca gaaggcgggtg caggcccacg tttacgagta cacgacacaa gtgtctctgg 4380
 acagcgacct caagttcaag ggcgccgaga agggcatcgt gccctgccag atgatttttt 4440
 gcttgaagga gaagaaccaa aagaaactca actcgcatag atggttcttc aacgcctttg 4500
 gcaaagcctt gaacccgaat gtgtgtatcc tcctagacgt cggcaccgc cccggcgcca 4560
 caagtcteta ccatctctgg aaagccttcg acacggatc caacgtggcg ggggcctgcy 4620
 gggaaatcaa agcgatgaag gggcggtttg gcgggaattt gctcaacct ctggtggcta 4680
 gtcagaactt tgagtacaag atgagcaata ttctggacaa accggtggag tcggtggttg 4740
 ggtacatcac ggtgttgccg ggcgccttgt cggcgtatcg gtaccatgcy ctgcagaacg 4800
 atgagacggg ccatgggccc ttgagtcagt atttcaaggg cgagacgctc catgggcagc 4860
 acgcggatgt gtttacggcg aacatgtact tggccgagga ccgaattctg tgttgggagt 4920
 tgggtggccaa gaggggtgag aggtgggtgt tgaagtatgt gaaggggtgt acgggtgaga 4980
 cggatgtgcc tgacaccgtc ccggaattcg tctcgcaacg tcgtcgttgg ctcaacggtg 5040
 cttctctgcy cgcctctac tcctctgccc actttcgaca aatctggaaa accgaccaca 5100
 ctttatgcy caaagcctt ctccacgctg aattccteta ccaectcctg caactcctct 5160
 tcacctactt ctccctggcc aacttctacc tcgcctteta ctttatgccc ggcggctctcy 5220
 ccgatcccca cgtcgacctt tttaactcgg acggccacgt cgcgcgcate atcttcaaca 5280
 tcctccgcta cgtctgcgcy ctgctgatct gcacacaatt catcttgtcc ctoggcaacc 5340
 gtccgcaggg tgccaaaaga atgtatctcy catccatgat catctacgccc gtcatcatgg 5400
 tgtacaccac ctctgccacc atcttcatcy tcgtgcyaca aatccaaccc tctcaaaaat 5460
 ccgacgacaa gcccgacctc gaactcggca acaacgtctt caccaacctg atcgtctccg 5520

ES 2 373 329 T3

tggctagtac cctcgggctc tacttcgtca tgcctttct ctatctcgac ccttggcaca 5580
 tgttcacctc ggccatccag tactttgtcc tgctgccttc ctacatctgc acgctccaga 5640
 tctacgcctt ttgcaacacc cacgacgtca catggggcac caaaggcgac aacgtgatgc 5700
 gcaccgatct cggaggcgcc attggcaagg gaagcaccgt cgaactggaa atgccttcgg 5760
 accaactcga catcgactcg ggatacgacg aatgtctacg taatctccgc gatcgcgtca 5820
 tggtccttcg cgttcccgtg tccgaggacc agctgcagca ggattactac aagtcggctg 5880
 gcacgtacat ggtggtgtcg tggatggtgg ccaacgcgac gctggccatg gcggtctcgg 5940
 aagcgtatgg cgattcggaa attggggata atttttactt gcggtttata ctgtgggcgg 6000
 tggcggccct ggcgctgttt agagcgttgg ggtcgacgac gtttgccggcg attaactctgg 6060
 tgagtgtctc cgtggagggc agggtcaggc tgaggttgaa tatgaaaggg ttaggtgga 6120
 ttaaggagaa gtggggggat gcggatgtga agggcaagtt tgagggggtg ggggatcggg 6180
 cgaggggggtt ggcgaggcgg tgagctagca agcttgaca cgctgaaatc accagtctct 6240
 ctctacaaat ctatctctct ctatctctct cataataatg tgtgagtagt tcccagataa 6300
 gggaattagg gttcctatag ggtttcgctc atgtgttgag catataagaa acccttagta 6360
 tgtatttgta tttgtaaaat acttctatca ataaaatttc taattcctaa aacccaaatc 6420
 cagtactaaa atccagatca tgcatggtac agcggcccgcg ttct 6464

<210> 15

<211> 982

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Quitina sintasa enlazad operablemente a señal de señalización XylT de Golgi

<400> 15

Met	Ser	Lys	Arg	Asn	Pro	Lys	Ile	Leu	Lys	Ile	Phe	Leu	Tyr	Met	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Leu	Ile	Ile	Tyr	Phe	Val	Phe	His	Ser	Ser
			20					25					30		
Ser	Phe	Ser	Ala	Lys	Thr	Met	Glu	Ser	Arg	Ile	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser
		35					40					45			
Ser	Ser	Ala	Thr	Arg	Thr	Val	Arg	Ala	Phe	Arg	Asn	Arg	Cys	His	Ala
		50				55					60				

ES 2 373 329 T3

Arg Pro Gly Thr Pro Gly Ser Ser Tyr Gly Asn Ala Arg Arg Pro Leu
 65 70 75 80

Pro Ser Ala Pro Ala Pro Leu His Tyr Asn Ser Pro Ser Arg Ala Ala
 85 90 95

Ser His Tyr Pro Arg Tyr His Gly Gly Tyr Ala Asp Asp Val Thr Val
 100 105 110

Ser Met Gly Pro Asp Asp Asp Arg Thr Asp Ile Phe Gly Pro Glu Thr
 115 120 125

Asp Leu Ser Glu Thr Arg His Leu Asn Asp Ala Tyr Gly Phe Arg Ser
 130 135 140

Ser Gln Ile Thr Leu Ser Glu Asp Pro His Gly Thr His Ala Arg Ser
 145 150 155 160

Arg Tyr Asp Asp Glu Asp Asp Val Ser Thr Thr Tyr Ser Ser Asn Thr
 165 170 175

Gly Thr Ser Ala Ser Gly Val Asp Lys Phe Glu His Tyr Gly Pro Ile
 180 185 190

Pro Glu Glu Gly Lys His Glu Arg Arg Gly Val Arg Pro Pro Gln Met
 195 200 205

Ser Arg Lys Glu Val Gln Leu Ile Asn Gly Glu Leu Val Leu Glu Cys
 210 215 220

Lys Ile Pro Thr Ile Leu Tyr Ser Phe Leu Pro Arg Arg Asp Glu Val
 225 230 235 240

Glu Phe Thr His Met Arg Tyr Thr Ala Val Thr Cys Asp Pro Asp Asp
 245 250 255

Phe Val Ala Arg Gly Tyr Lys Leu Arg Gln Asn Ile Gly Arg Thr Ala
 260 265 270

Arg Glu Thr Glu Leu Phe Ile Cys Val Thr Met Tyr Asn Glu Asp Glu
 275 280 285

Phe Gly Phe Thr Arg Thr Met His Ala Val Met Lys Asn Ile Ser His
 290 295 300

ES 2 373 329 T3

Phe Cys Ser Arg Asn Lys Ser Arg Thr Trp Gly Ala Asp Gly Trp Gln
 305 310 315 320
 Lys Ile Val Val Cys Val Val Ser Asp Gly Arg Glu Ile Ile His Pro
 325 330 335
 Arg Thr Leu Asp Ala Leu Ala Ala Met Gly Val Tyr Gln His Gly Ile
 340 345 350
 Ala Lys Asn Phe Val Asn Gln Lys Ala Val Gln Ala His Val Tyr Glu
 355 360 365
 Tyr Thr Thr Gln Val Ser Leu Asp Ser Asp Leu Lys Phe Lys Gly Ala
 370 375 380
 Glu Lys Gly Ile Val Pro Cys Gln Met Ile Phe Cys Leu Lys Glu Lys
 385 390 395 400
 Asn Gln Lys Lys Leu Asn Ser His Arg Trp Phe Phe Asn Ala Phe Gly
 405 410 415
 Lys Ala Leu Asn Pro Asn Val Cys Ile Leu Leu Asp Val Gly Thr Arg
 420 425 430
 Pro Gly Gly Thr Ser Leu Tyr His Leu Trp Lys Ala Phe Asp Thr Asp
 435 440 445
 Ser Asn Val Ala Gly Ala Cys Gly Glu Ile Lys Ala Met Lys Gly Arg
 450 455 460
 Phe Gly Gly Asn Leu Leu Asn Pro Leu Val Ala Ser Gln Asn Phe Glu
 465 470 475 480
 Tyr Lys Met Ser Asn Ile Leu Asp Lys Pro Leu Glu Ser Val Phe Gly
 485 490 495
 Tyr Ile Thr Val Leu Pro Gly Ala Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr His Ala
 500 505 510
 Leu Gln Asn Asp Glu Thr Gly His Gly Pro Leu Ser Gln Tyr Phe Lys
 515 520 525
 Gly Glu Thr Leu His Gly Gln His Ala Asp Val Phe Thr Ala Asn Met

ES 2 373 329 T3

530						535										540
Tyr	Leu	Ala	Glu	Asp	Arg	Ile	Leu	Cys	Trp	Glu	Leu	Val	Ala	Lys	Arg	
545					550					555					560	
Gly	Glu	Arg	Trp	Val	Leu	Lys	Tyr	Val	Lys	Gly	Cys	Thr	Gly	Glu	Thr	
				565					570					575		
Asp	Val	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Glu	Phe	Val	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg	Trp	
			580					585					590			
Leu	Asn	Gly	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	Val	Tyr	Ser	Leu	Val	His	Phe	Arg	
		595					600					605				
Gln	Ile	Trp	Lys	Thr	Asp	His	Thr	Phe	Met	Arg	Lys	Ala	Leu	Leu	His	
	610					615					620					
Val	Glu	Phe	Leu	Tyr	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Phe	Thr	Tyr	Phe	Ser	
625					630						635				640	
Leu	Ala	Asn	Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Tyr	Phe	Ile	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	
				645					650					655		
Asp	Pro	His	Val	Asp	Pro	Phe	Asn	Ser	Asp	Gly	His	Val	Ala	Arg	Ile	
			660					665					670			
Ile	Phe	Asn	Ile	Leu	Arg	Tyr	Val	Cys	Val	Leu	Leu	Ile	Cys	Thr	Gln	
		675					680						685			
Phe	Ile	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg	Pro	Gln	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Tyr	
	690					695					700					
Leu	Ala	Ser	Met	Ile	Ile	Tyr	Ala	Val	Ile	Met	Val	Tyr	Thr	Thr	Phe	
705					710					715					720	
Ala	Thr	Ile	Phe	Ile	Val	Val	Arg	Gln	Ile	Gln	Pro	Ser	Gln	Lys	Ser	
				725					730					735		
Asp	Asp	Lys	Pro	Asp	Leu	Glu	Leu	Gly	Asn	Asn	Val	Phe	Thr	Asn	Leu	
			740					745					750			
Ile	Val	Ser	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Gly	Leu	Tyr	Phe	Val	Met	Ser	Phe	
	755						760					765				

ES 2 373 329 T3

Leu Tyr Leu Asp Pro Trp His Met Phe Thr Ser Ala Ile Gln Tyr Phe
770 775 780

Val Leu Leu Pro Ser Tyr Ile Cys Thr Leu Gln Ile Tyr Ala Phe Cys
785 790 795 800

Asn Thr His Asp Val Thr Trp Gly Thr Lys Gly Asp Asn Val Met Arg
805 810 815

Thr Asp Leu Gly Gly Ala Ile Gly Lys Gly Ser Thr Val Glu Leu Glu
820 825 830

Met Pro Ser Asp Gln Leu Asp Ile Asp Ser Gly Tyr Asp Glu Cys Leu
835 840 845

Arg Asn Leu Arg Asp Arg Val Met Val Pro Ala Val Pro Val Ser Glu
850 855 860

Asp Gln Leu Gln Gln Asp Tyr Tyr Lys Ser Val Arg Thr Tyr Met Val
865 870 875 880

Val Ser Trp Met Val Ala Asn Ala Thr Leu Ala Met Ala Val Ser Glu
885 890 895

Ala Tyr Gly Asp Ser Glu Ile Gly Asp Asn Phe Tyr Leu Arg Phe Ile
900 905 910

Leu Trp Ala Val Ala Ala Leu Ala Leu Phe Arg Ala Leu Gly Ser Thr
915 920 925

Thr Phe Ala Ala Ile Asn Leu Val Ser Ala Leu Val Glu Gly Arg Val
930 935 940

Arg Leu Arg Leu Asn Met Lys Gly Phe Arg Trp Ile Lys Glu Lys Trp
945 950 955 960

Gly Asp Ala Asp Val Lys Gly Lys Phe Glu Gly Leu Gly Asp Arg Ala
965 970 975

Arg Gly Leu Ala Arg Arg
980

REIVINDICACIONES

1. Un método para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente o polisacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria de una célula vegetal, comprendiendo dicho método
- 5 i. introducir mediante transformación un gen quimérico en la célula vegetal, comprendiendo dicho gen quimérico:
- a. un promotor expresable por planta;
- b. una región de ADN que codifica una quitina sintasa que comprende una secuencia de anclaje señal para seleccionar como dianas a las membranas del aparato de Golgi, o una proteína de nodulación C;
- 10 y
- c. una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación, en el que dicha quitina sintasa o proteína de nodulación C se expresa en dicha célula vegetal.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha quitina sintasa comprende una secuencia de anclaje señal seleccionada de la secuencia de anclaje señal de una sialil transferasa de rata, la secuencia de anclaje señal de una galactosil transferasa humana, la secuencia de anclaje señal del homólogo de Arabidopsis del receptor HDEL de levadura (AtERD2), la secuencia de anclaje señal de la α -2,6-sialiltransferasa, la secuencia de anclaje señal de β -1,2-xilosiltransferasa de Arabidopsis thaliana, la secuencia de anclaje señal de N-acetilglucosaminil transferasa I del tabaco, o la secuencia de aminoácidos YYHDL o LKLEI.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha quitina sintasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID No 15 desde la posición 1 hasta la posición 35.
4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha quitina sintasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID No 15.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha región de ADN codifica una proteína de nodulación C obtenible de una especie de Rhizobium, una especie de Azorhizobium, una especie de Bradyrhizobium, una especie de Mesorhizobium, una especie de Ralstonia, una especie de Streptomyces, una especie de Burkholderia, una especie de Cupriavidus o una especie de Sinorhizobium.
- 25 6. El método de las reivindicaciones 1 y 5, en el que dicha proteína de nodulación C comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID No 1, SEC ID No 2, SEC ID No 3, SEC ID No 4, SEC ID No 5, SEC ID No 6, SEC ID No 7, SEC ID No 8, SEC ID No 9, CAA67139, CAA608779, CAA51774, CAA51773, CAA25811, CAA25810, CAA25814, CAA68619, CAA2350, CAD31533, CAC05896, CAH04369, CAB56055, NP_629203, P26024, P17862, BAB524500, AAX30050, AAX30049, E38180, JQ0396, ZZZRC4, ZZZRCL, A95321, C23766, C26813, NP_659761, NP_443883, NP_106714, NP_768667, NP_435719, BAC47292, AAU11365, AAU11364, AAU11363, AAU11362, AAU11361, AAU11360, AAU11359, AAU11358, AAU11357, AAU11356, AAU11355, AAU11354, AAU11353, AAU11352, AAU11351, AAU11350, AAU114349, AAU11348, AAU11347, AAU11346, AAU11345, AAU11344, AAU11343, AAU11342, AAU11341, AAU11340, AAU11339, AAU11338, AAK65131, AAS91748, P04679_2, P04679_1, P04679, P72334, Q53513, P50357, P04678, P50536, P53417, Q07755, P04341, P04340, P24151, P04677, CAD90588, CAD90587, CAD90586, CAD90585, CAD90584, CAD90583, CAD90257, CAD43933, AAM54775, AAN62903, S34305, S09522, S07304, AAL88670, CAD29957, CAD29956, CAD29955, CAD29954, CAD29953, CAD29952, CAD29951, CAD29950, CAD29949, CAC42489, AAK53549, AAK53548, AAK50872, AAK39967, AAK39966, AAK39965, AAK39964, AAK39963, AAK39962, AAK39961, AAK39960, AAK39959, AAK39958, AAK39957, AAK39956, AAG44125, AAK00157, AAG60998, AAB71694, AAB16897, AAV80567, AAB95329, BAA24092, BAA06089, BAA06086, BAA06085, BAA06083, BAA06090, BAA06082, BAA06087, BAA06088, BAA06084, AAB91695, AAB51164, AAB47353, AAB34509, AAB24745, 1615305E, 1615305D, 165305C, CAA26311, CAA26310, CAA3731, AAA63602 ó 26226.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho promotor expresable por planta es un promotor seleccionado del promotor específico de fibras de un gen de beta-tubulina de algodón, un promotor específico de fibras de un gen de actina de algodón, un promotor específico de fibras de un gen de proteína de transferencia de lípidos de algodón, un promotor de un gen de expansina de algodón, o un promotor de un gen de quitinasa en algodón.
- 45 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha planta se selecciona de algodón, cáñamo o lino.
- 50 9. El método de la reivindicación 8, en el que la pared celular de la planta en dicha planta de algodón comprende fibras.

10. El método de las reivindicaciones 1-9, que comprende además la etapa de tratar dicha pared celular con una disolución alcalina, durante un tiempo suficiente para desacetilar dicho oligosacárido que consiste en monómeros de N-acetilglucosamina.
- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además la etapa de aislar dicha pared celular de la planta o dichas fibras.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha pared celular de la planta es una pared celular secundaria de la planta.
13. Una célula vegetal que comprende un gen quimérico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 10 14. Una planta que consiste esencialmente en células vegetales de la reivindicación 13.
15. La planta de la reivindicación 14, que es algodón.
16. Un gen quimérico como se define en las reivindicaciones 1-4.
17. Uso de un gen quimérico de la reivindicación 16 para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular de una célula vegetal, o para incrementar la reactividad de las paredes celulares de la planta para modificaciones químicas de tales paredes celulares de la planta.
- 15

ROT_NODC_RHILP	MTMLDTTSTV	AVSLYALLST	AYKSMQAVYS	LPTDVSLASH	GLGGFDELPS
ROT_NODC_BRAJA	MDLLATTSAA	AVSSYALLST	IYKSQALYA	QPAINSSLDN	LGQAEVVVPA
ROT_NODC_RHIS3	MDLLTTTSTV	AVACYALLST	VYKGMQAVYS	LPPTVAPASE	DLVGSDLWPS
ROT_NODC_RHISN	MDLLGTTGAV	AISLYAALST	AYKGMQAIYA	LPTNTTAAST	PVTGSGAPPS
ROT_NODC_RHILV	MTLLATTSIA	AISLYAMLST	VYKSAQVFHA	RRTTISTTPA	KDIETNPVPS
ROT_NODC_AZOCA	MSVVDVIGLL	ATAAYVTLAS	AYKVQFIN.	VSSVTDVAGL	ESDALPLTPR
	M-----	A---Y--L--	-YK--Q----	-----	-----P-
ROT_NODC_RHILP	VDVIVPSFNE	DPRTLSECLA	SIAGQEYGGR	LQVYLVDDGS	ENREALRLVH
ROT_NODC_BRAJA	VDVIVPCFNE	NPNTLAECLE	SIASQDYAGK	MQVYVDDGS	ANRDVVAPVH
ROT_NODC_RHIS3	VDVIIPCYNE	GPLTLSACLD	SIANQEYAGK	LRVYVDDGS	GNRDAVIPIH
ROT_NODC_RHISN	VDVIVPCYNE	DPRALSACLA	SIKQDYAGE	LRVYVDDGS	GNRNAIIPVH
ROT_NODC_RHILV	VDVIVPCFNE	DPIVLSECLA	SLAEQDYAGK	LRIYVDDGS	KNRDAVVAQR
ROT_NODC_AZOCA	VDVIVPTFNE	NSSTLLECVA	SICAQDYRGP	ITIVVDDGS	TNKTSFHAVC
	VDVI-P--NE	----L-C---	S---Q-Y-G-	-----VDDGS	-N-----
ROT_NODC_RHILP	EAFARDPRFN	ILLLPQNVGK	RKAQDRCDQR	SAGDMVLNVD	SDTILASDVI
ROT_NODC_BRAJA	RIYASDPRFS	FILLANNVGK	RKAQIAAIRS	SSGDLVLNVD	SDTILAADV
ROT_NODC_RHIS3	DNYAGDPRFD	FILLPENVGK	RKAQIAAIRR	SSGDLVLNVD	SDTTLASDVI
ROT_NODC_RHISN	DHYACDPRFR	FILMPKNVGK	RKAQIVAIRE	SSGDLVLNVD	SDTTIAPDVV
ROT_NODC_RHILV	AAYADDERFN	FTILPKNVGK	RKA. IAAITQ	SSGDLILNVD	SDTTIAPDVV
ROT_NODC_AZOCA	DKYASDERFI	FVELDQNKGT	A. AQMEAIRR	TDGDLILNVD	SDTVIDKDVV
	---A-D-R--	F-----N-G-	--A-----	--GD--LNVD	SDT----DV-
ROT_NODC_RHILP	RKLVPKNARV	AVGR.MGQLT	GPQPKRQLAD	PFDDMEYWLA	CNEERSQQAR
ROT_NODC_BRAJA	TKLVLMHDP	GIGAAMGQLI	ASNRNQTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_RHIS3	RKLARKMQDP	AIGAAMGQLT	ASNRSDTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_RHISN	TKLALKMYSP	AVGAAMGQLT	ASNRSDTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_RHILV	SKLAHKMRDP	AVGAAMGQMK	ASNQADTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_AZOCA	TKLASSMRAP	NVGGVMGQLV	AKNRERSWLT	RLIDMEYWLA	CNEERIAQSR
	-KL-----	--G--MGQ--	-----	---DMEYWLA	CNEER--Q-R
ROT_NODC_RHILP	FGVMFCSGS	CVMYRLVSA.	SLLDQYDAQY	FRKQR. .FGE	.IDIHLSHA
ROT_NODC_BRAJA	FGAVMCCCGP	CAMYRRSALA	LLLDQYEAQF	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLK
ROT_NODC_RHIS3	FGAVMCCCGP	CAMYRRSLL	SLLDQYETQM	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLE
ROT_NODC_RHISN	FGAVMCCCGP	CAMYRRSALL	LLLDKYETQL	FRGRPSDFGE	DRHLTILMLN
ROT_NODC_RHILV	FGAVMCCCGP	CAMYRRSAML	SLLDQYETQL	YRGKPSDFGE	DRHLTILMLS
ROT_NODC_AZOCA	FGVMCCCGP	CAMYRRSAIT	PLLAIEYHQT	FLGRPSNFGE	DRHLTILMLK
	FG-VM-C-G-	C-MYR-----	-LL-Y---Q-	F-----FGE	-----

Figura 1

ROT_NODC_RHILP	GSFRTEYRPS	AHAATVVPNK	LGPYLGQQLR	WARSTFR TTL	LGAP.LPNLN
ROT_NODC_BRAJA	AGFRTEYVPD	AIAATVVPHS	LRPYLRQQLR	WARSTFRDTF	LAWRLPELD
ROT_NODC_RHIS3	AGFRTEYVPD	AIAVTVPDR	LGPYLRQQLR	WARSTFRDTL	LALRLLPGLD
ROT_NODC_RHISN	AGFRTEYVPE	AIAATVVPNS	MGAYLRQQLR	WARSTFRDTL	LALRLLPGLD
ROT_NODC_RHILV	AGFRTEYVPS	AIAATVVPDT	MGVYLRQQLR	WARSTFRDTL	LALPVLPGLD
ROT_NODC_AZOCA	AGFR TGYVPS	AVARTLVPDG	.SPYLRQQLR	WARSTYRDTA	LALRIKKNLS
	--FRT-Y-P-	A-A-T-VP--	---YL-QQLR	WARST-R-T-	L-----
ROT_NODC_RHILP	RFLMLDVVGQ	NLGPLLLDHS	VL TGLAQLAL	TGTAPWLAAL	MIVAMTIDRC
ROT_NODC_BRAJA	GYLTLDVIGQ	NLGPLLLAIS	SLAALAQLLI	DGSIPWWTGL	TIAAMTTVRC
ROT_NODC_RHIS3	RYLTLDVVGQ	NLGPLLLALS	VIAGIAQFAL	TATLPWPTIL	VIAAMTIIRC
ROT_NODC_RHISN	RYLTLDVIGQ	NLGPLLLALS	VL TGLAQLAL	TATVPWSTIL	MIASMTMVR C
ROT_NODC_RHILV	RYLTLD AIGQ	NVGLLLLALS	VL TGIGQFAL	TATLPWWTIL	VIGSMTLVRC
ROT_NODC_AZOCA	KYITFEICAQ	NLGTALLVM	TMISLSL TTS	GSQTPVIILG	VVVGMSIIRC
	-----Q	N-G--LL---	-----	----P-----	---M---RC
ROT_NODC_RHILP	SVVALRARQL	RFLGFSLHTF	INIFLLLPLK	AYALCTLSNI	AWLSSLLCWQ
ROT_NODC_BRAJA	CVAALRAREL	RFIGFSLHTP	INICLLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRKVTDM
ROT_NODC_RHIS3	TVTACRARQA	RFIGFSLHTF	INIFLLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRKATL
ROT_NODC_RHISN	GVAAFRAREL	RFLGFSLHTL	LNVALLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRGSPAA
ROT_NODC_RHILV	SVAAYRAREL	RFLGFALHTL	VNIFLLIPLK	AYALCTLSNS	DWLSRG SVAI
ROT_NODC_AZOCA	CSVALIAKDF	RFLYFIVHSA	LNVLILTPLK	LYALLTIRDS	RWLSRESS..
	-----	RF-F---H--	-N---L-PLK	-YAL-T----	-WLS-----
ROT_NODC_RHILP	LESTSTADAR	TT.....ECSDMR	TASKLSPPPS	CQANDV....
ROT_NODC_BRAJA	PTEEGKQPVI	LHPNAGRSPA	GVGGRLLL FV	RRRYRSLHRA	WRRRRVFPVA
ROT_NODC_RHIS3	PNADKKQIIV	ANPIAGVGTG	SSGSAEAI RR	TDLPRDSSKL	VNADSVCSAE
ROT_NODC_RHISN	APNGVKDSPE	PHC.....
ROT_NODC_RHILV	APTVGQQGAT	KMP.....GR	ATSEIAYSGE
ROT_NODC_AZOCA
	-----	-----	-----	-----	-----
ROT_NODC_RHILP
ROT_NODC_BRAJA	IVRLSTNKWS	ADDSGRKPSV	IRARVGCRRP	VAPRH	
ROT_NODC_RHIS3
ROT_NODC_RHISN
ROT_NODC_RHILV
ROT_NODC_AZOCA
	-----	-----	-----	-----	-----

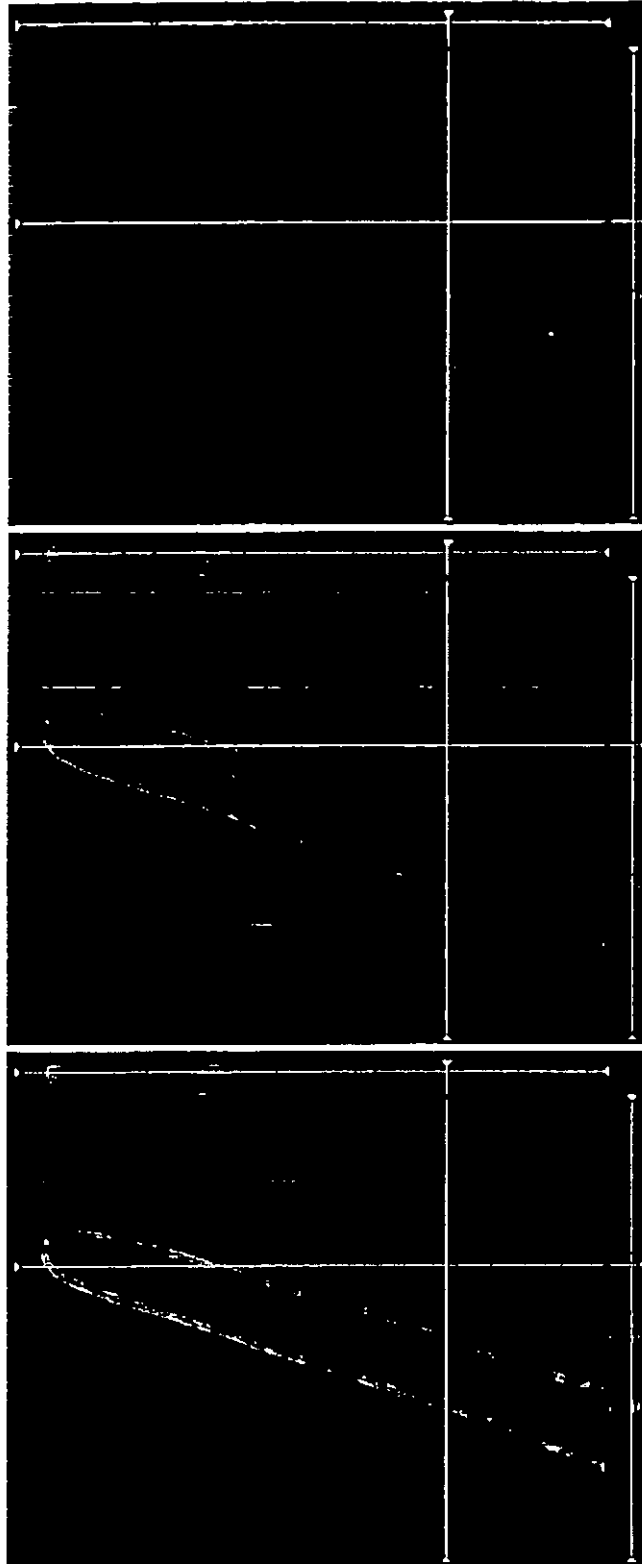
Figura 1 continuación

ROT_NODC_BRAJA	MDLLATTSAA	AVSSYALLST	IYKSVQALYA	QPAINSSLDN	LGQAEVVVPA
ROT_NODC_RHIS3	MDLLTTTSTV	AVACYALLST	VYKGMQAVYS	LPPTVAPASE	DLVGSDLWPS
ROT_NODC_RHISN	MDLLGTTGAV	AISLYAALST	AYKGMQAIYA	LPTNTTAAST	PVTGSGAPPS
ROT_NODC_RHILV	MTLLATTSIA	AISLYAMLST	VYKSAQVFHA	RRTTISTTPA	KDIETNPVPS
ROT_NODC_AZOCA	MSVVDVIGLL	ATAAYVTLAS	AYKVVQFIN.	VSSVTDVAGL	ESDALPLTPR
	M-----	A---Y--L--	-YK--Q----	-----	-----P-
ROT_NODC_BRAJA	VDVIVPCFNE	NPNTLAECLE	SIASQDYAGK	MQVYVVDGGS	ANRDVVAPVH
ROT_NODC_RHIS3	VDVIIPCYN	GPLTLSACLD	SIANQEYAGK	LRVYVVDGGS	GNRDAVIPIH
ROT_NODC_RHISN	VDVIVPCYNE	DPRALSACLA	SIKQDYAGE	LRVYVVDGGS	GNRNAIIPVH
ROT_NODC_RHILV	VDVIVPCFNE	DPIVLSECLA	SLAEQDYAGK	LRIYVVDGGS	KNRDAVVAQR
ROT_NODC_AZOCA	VDVIVPTFNE	NSSTLLECVA	SICAQDYRGP	ITIVVVDGGS	TNKTSFHAVC
	VDVI-P--NE	----L--C--	S---Q-Y-G-	----VDDGS	-N-----
ROT_NODC_BRAJA	RIYASDPRFS	FILLANVVGK	RKAQIAAIRS	SSGDLVLNVD	SDTILAADV
ROT_NODC_RHIS3	DNYAGDPRFD	FILLPENVGK	RKAQIAAIRR	SSGDLVLNVD	SDTTLASDVI
ROT_NODC_RHISN	DHYACDPRFR	FILMPKNVGK	RKAQIVAIRE	SSGDLVLNVD	SDTTIAPDVV
ROT_NODC_RHILV	AAYADDERFN	FTILPKNVGK	RKA. IAAITQ	SSGDLILNVD	SDTTIAPDVV
ROT_NODC_AZOCA	DKYASDERFI	FVELDQNKGT	A. AQMEAIRR	TDGDLILNVD	SDTVIDKDVV
	---A-D-R--	F-----N-G-	--A-----	--GDL-LNVD	SDT----DV-
ROT_NODC_BRAJA	TKLVLMHDP	GIGAAMGQLI	ASNRNQTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_RHIS3	RKLARKMQDP	AIGAAMGQLT	ASNRSDTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_RHISN	TKLALKMYS	AVGAAMGQLT	ASNRSDTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_RHILV	SKLAHKMRDP	AVGAAMGQMK	ASNQADTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAAQAR
ROT_NODC_AZOCA	TKLASSMRAP	NVGGVMGQLV	AKNRERSWLT	RLIDMEYWLA	CNEERIAQSR
	-KL---M--P	--G--MGQ--	A-N----WLT	RLIDMEYWLA	CNEER--Q-R
ROT_NODC_BRAJA	FGAVMCCCGP	CAMYRRSALA	LLLDQYEAQF	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLK
ROT_NODC_RHIS3	FGAVMCCCGP	CAMYRRSSLL	SLLDQYETQM	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLE
ROT_NODC_RHISN	FGAVMCCCGP	CAMYRRSALL	LLLDKYETQL	FRGRPSDFGE	DRHLTILMLN
ROT_NODC_RHILV	FGAVMCCCGP	CAMYRRSAML	SLLDQYETQL	YRGKPSDFGE	DRHLTILMLS
ROT_NODC_AZOCA	FGVMCCCGP	CAMYRRSAIT	PLLAIEYHQ	FLGRPSNFGE	DRHLTILMLK
	FG-VMCCCGP	CAMYRRS---	-LL--YE-Q-	F-G-PS-FGE	DRHLTILML-

Figura 2

ROT_NODC_BRAJA	AGFRTEYVPD	AIAATVVPHS	LRPYLRQQLR	WARSTFRDTF	LAWRLLPELD
ROT_NODC_RHIS3	AGFRTEYVPD	AIAVTVVVDR	LGPYLRQQLR	WARSTFRDTL	LALRLLPGLD
ROT_NODC_RHISN	AGFRTEYVPE	AIAATVVVNS	MGAYLRQQLR	WARSTFRDTL	LALRLLPGLD
ROT_NODC_RHILV	AGFRTEYVPS	AIAATVVVDT	MGVYLRQQLR	WARSTFRDTL	LALPVLPGLD
ROT_NODC_AZOCA	AGFRTEYVPS	AVARTLVDPG	.SPYLRQQLR	WARSTYRDTA	LALRIKKNLS
	AGFRT-YVP-	A-A-T-VP--	---YLRQQLR	WARST-RDT-	LA-----
ROT_NODC_BRAJA	GYLTLDVIGQ	NLGPLLLAIS	SLAALAQLLI	DGSIPWWTGL	TIAAMTTVRC
ROT_NODC_RHIS3	RYLTLDVVGQ	NLGPLLLALS	VIAGIAQFAL	TATLPWPTIL	VIAAMTIIRC
ROT_NODC_RHISN	RYLTLDVIGQ	NLGPLLLALS	VLGTGLAQLAL	TATVPWSTIL	MIASMTMVRC
ROT_NODC_RHILV	RYLTLDVIGQ	NVGLLLLLALS	VLGTGIGQFAL	TATLPWWTIL	VIGSMTLVRC
ROT_NODC_AZOCA	KYITFEICAQ	NLGTALLLVM	TMISLSLTTS	GSQTPVIILG	VVVGMSIIRC
	-Y-T-----Q	N-G--LL---	-----	----P-----	----M---RC
ROT_NODC_BRAJA	CVAALRAREL	RFIGFSLHTP	INICLLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRKVTDM
ROT_NODC_RHIS3	TVTACRARQA	RFIGFSLHTF	INIFLLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRKATL
ROT_NODC_RHISN	GVAAFRAREL	RFLGFSLHTL	LNVALLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRGSPAA
ROT_NODC_RHILV	SVAAYRAREL	RFLGFALHTL	VNIFLLIPLK	AYALCTLSNS	DWLSRGSVAI
ROT_NODC_AZOCA	CSVALIAKDF	RFLYFIVHSA	LNVLILTPLK	LYALLTIRDS	RWLSRESS..
	-----	RP-PF--H--	-N---L-PLK	-YAL-T---S	-WLSR-----
ROT_NODC_BRAJA	PTEEGKQPVI	LHPNAGRSPA	GVGGRLLLFV	RRRYSRLHRA	WRRRRVFPVA
ROT_NODC_RHIS3	PNADKKQIIV	ANPIAGVGTG	SSGSAEAIIR	TDLPRDSSKL	VNADSVCSAE
ROT_NODC_RHISN	APNGVKDSPE	PHC.....
ROT_NODC_RHILV	APTGVQQGAT	KMP.....GR	ATSEIAYSGE
ROT_NODC_AZOCA	;
	-----	-----	-----	-----	-----
ROT_NODC_BRAJA	IVRLSTNKWS	ADDSGRKPSV	IRARVGCRRP	VAPRH	
ROT_NODC_RHIS3	
ROT_NODC_RHISN	
ROT_NODC_RHILV	
ROT_NODC_AZOCA	
	-----	-----	-----	-----	

Figura 2 continuación



A

B

C

Figura 3

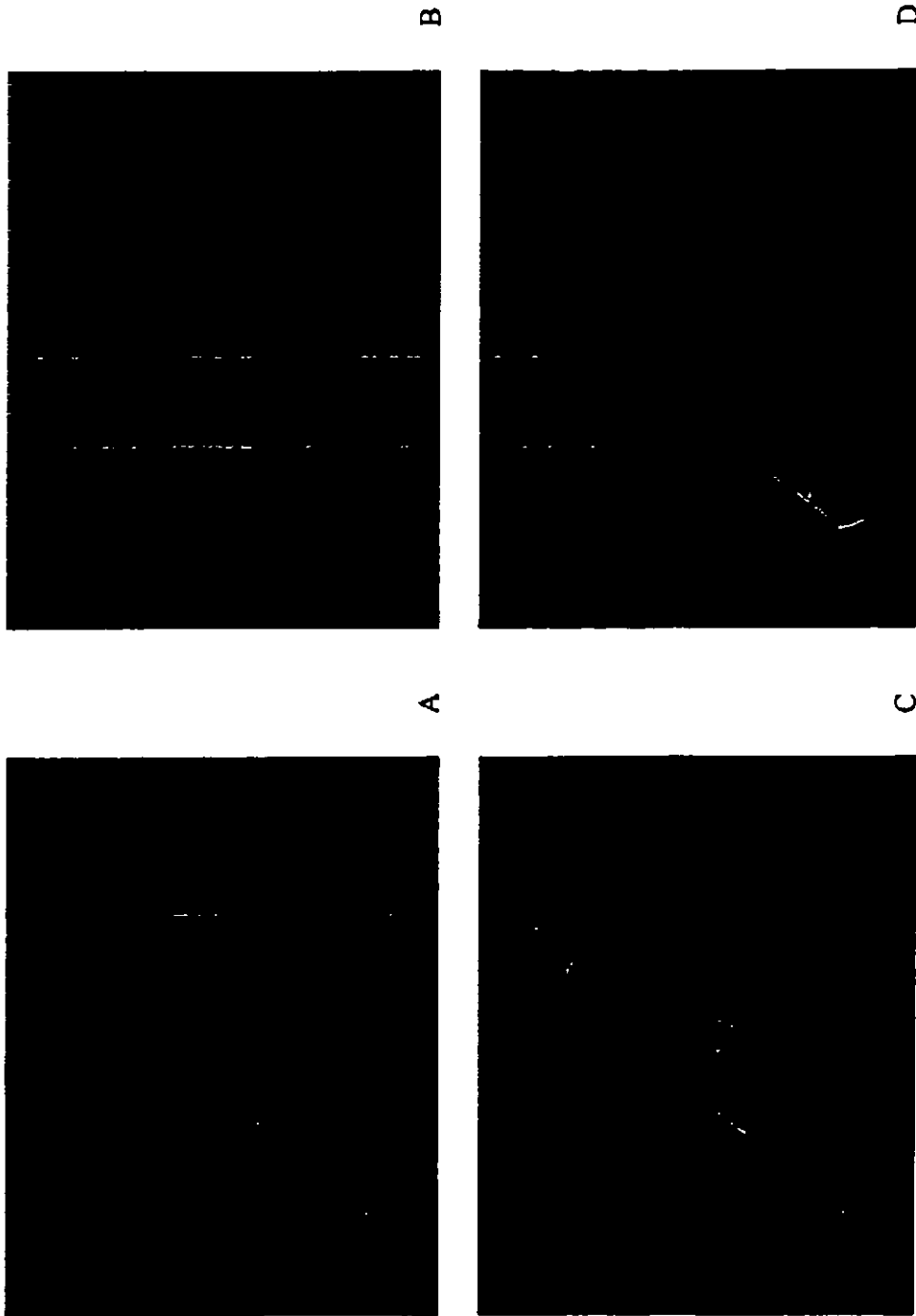


Figura 4

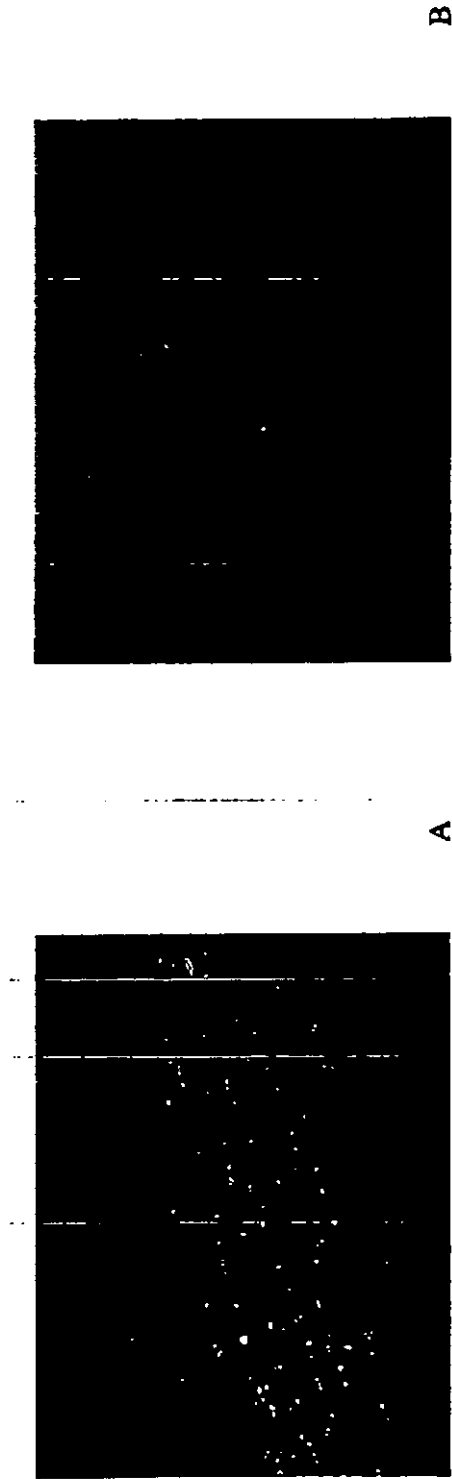


Figura 5

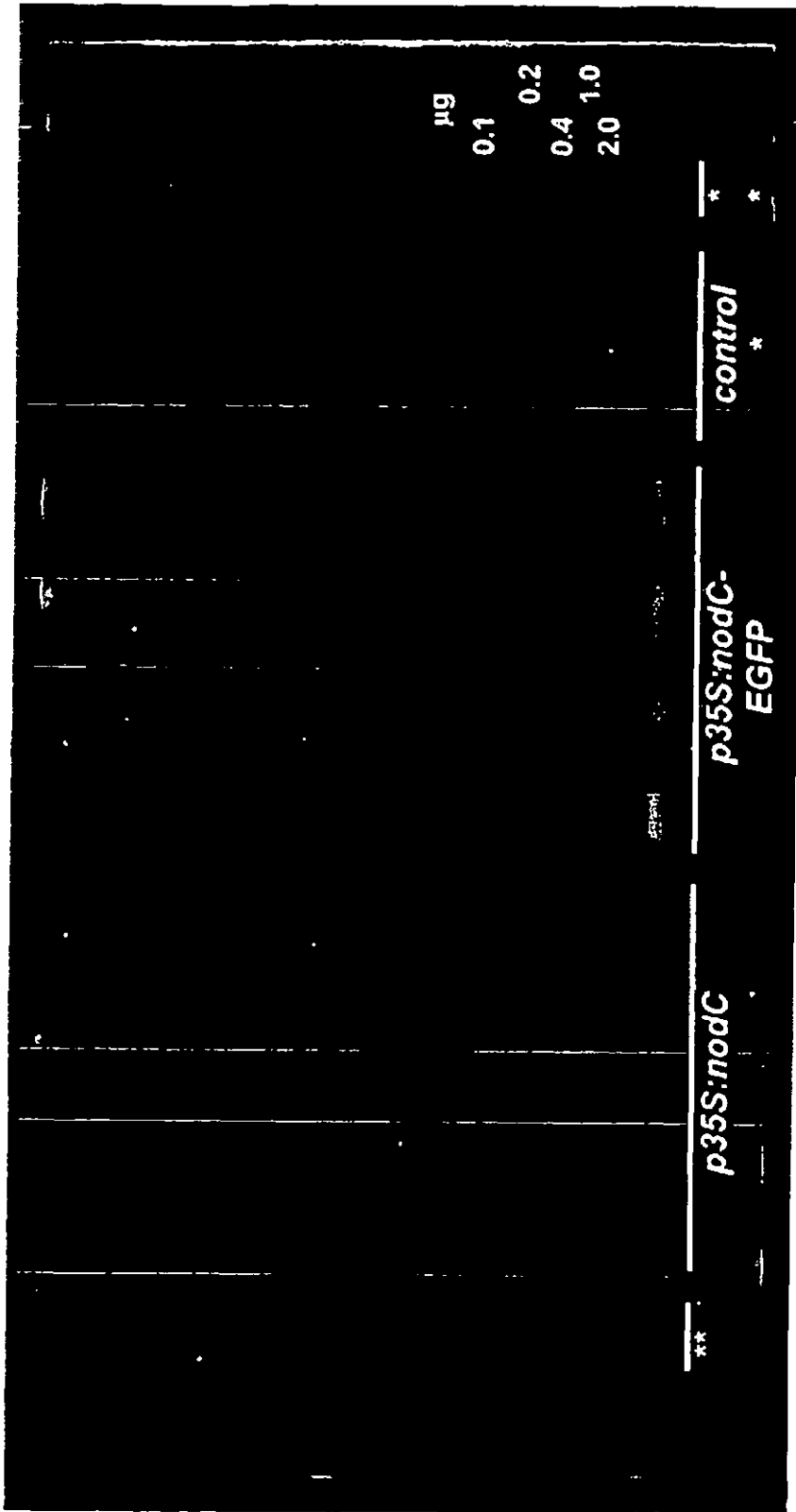
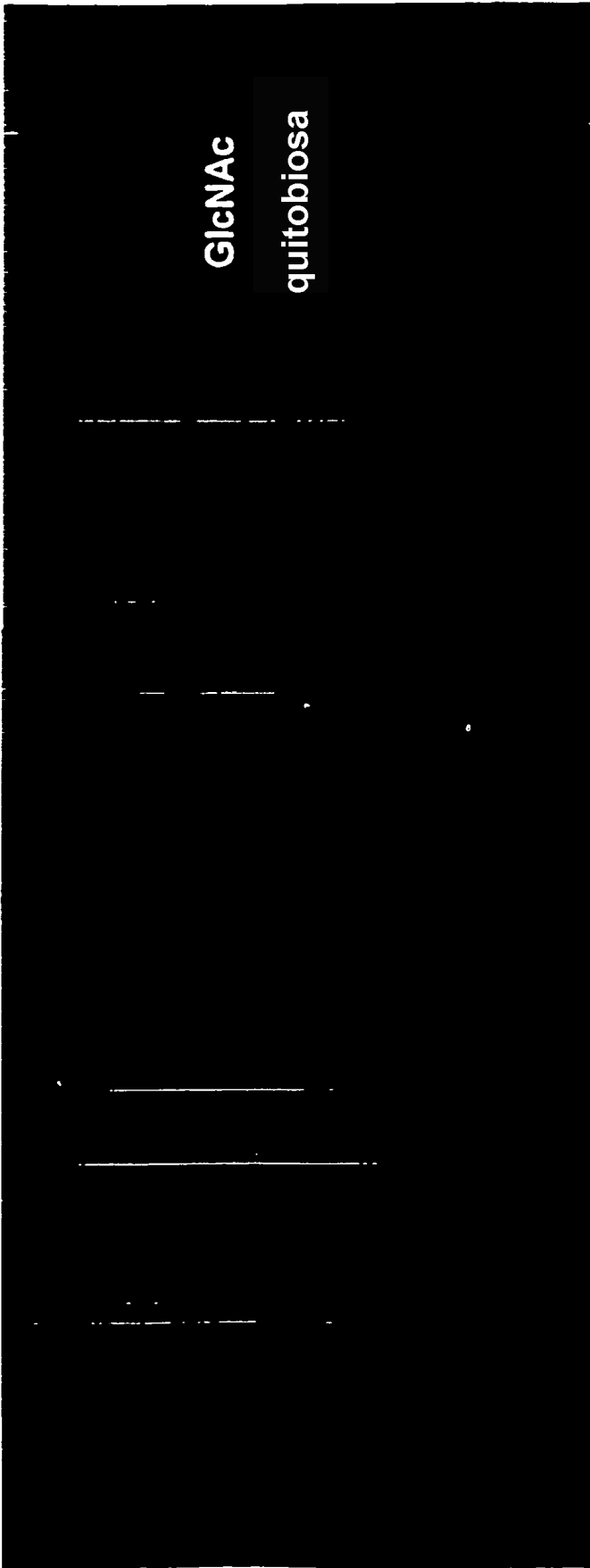


Figura 6



B.

Figura 7

A.

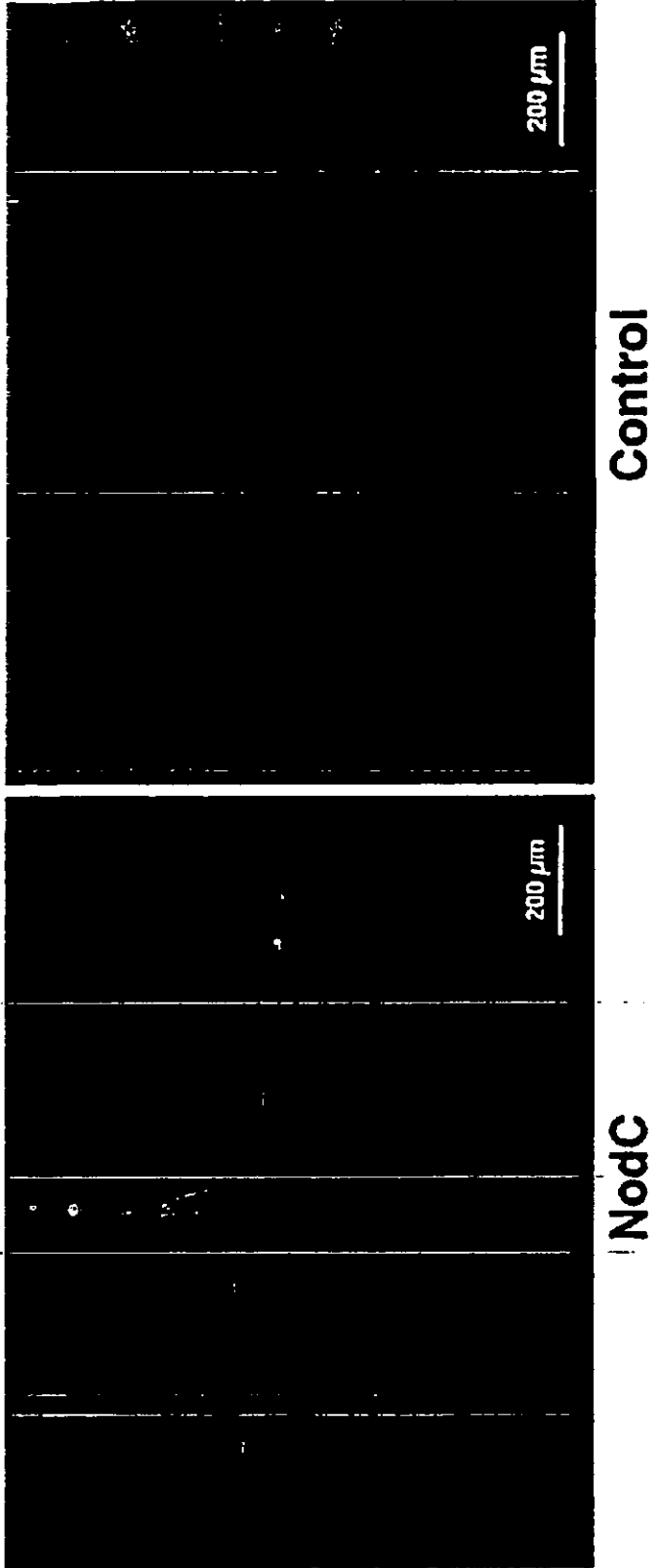


Figura 8

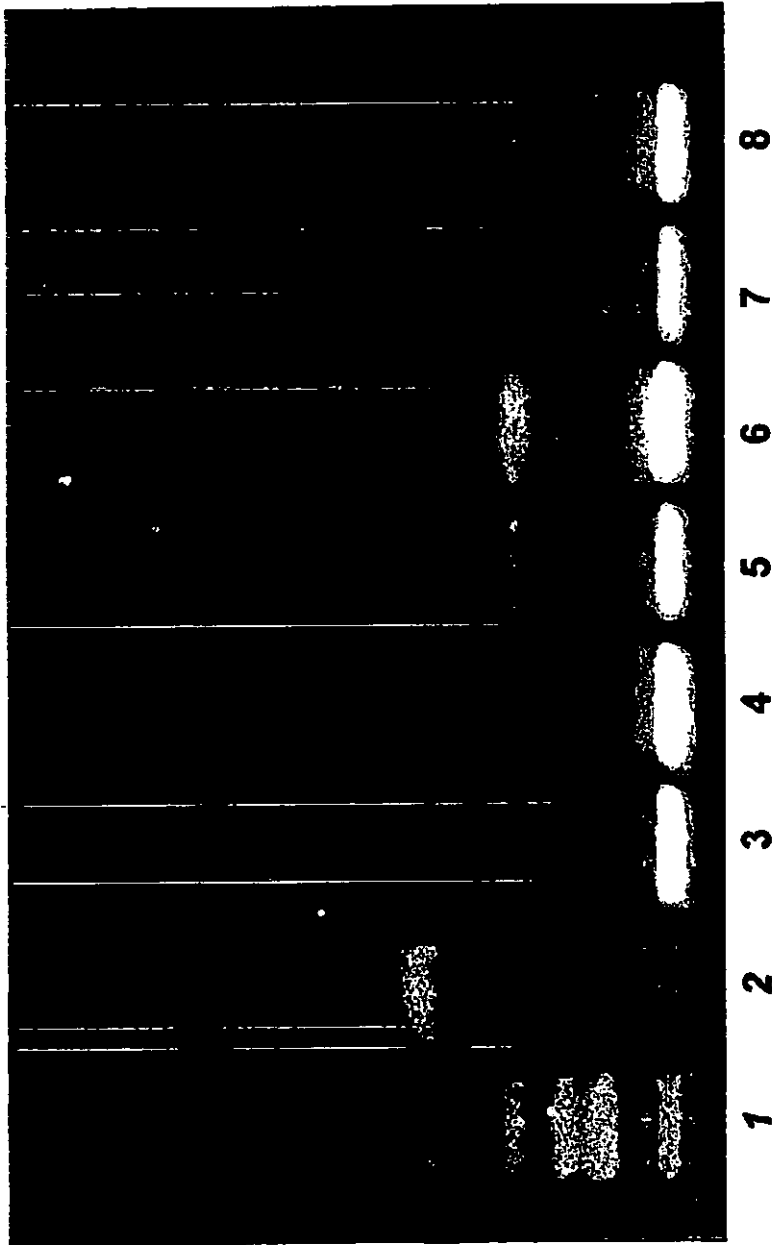


Figura 9