

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 166**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11764685 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2627771**

54 Título: **Métodos para alterar la reactividad de las paredes celulares vegetales**

30 Prioridad:

18.10.2010 US 394109 P

15.10.2010 EP 10013693

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

14.10.2015

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)

J.E. Mommaertsiaan 14

1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:

MEULEWAETER, FRANK y

VANHOLME, BARTEL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 548 166 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 las paredes celulares vegetales

- 5 La presente invención se refiere a la modificación de la reactividad de las paredes celulares vegetales, incluyendo las paredes celulares de plantas secundarias, particularmente como se pueden encontrar en fibras naturales de plantas productoras de fibra. En particular, la presente invención se refiere a fibras de algodón con reactividad alterada. La reactividad modificada se podría aplicar en métodos para la tinción de la pared celular que contiene material derivado de plantas tal como fibras naturales, utilizando colorantes reactivos con las fibras, para mejorar, p. ej., la solidez del color, o para disminuir los volúmenes de aguas residuales utilizadas durante el proceso de tinción.
- 10 La reactividad modificada se podría aplicar también para mejorar la reactividad de fibras naturales con reaccionantes tales como ignífugos, agua, aceite y repelentes de la suciedad, agentes antiarrugas, suavizantes, agentes antiestáticos, agentes blanqueadores fluorescentes, etc.
- La presente invención proporciona métodos para aumentar la eficiencia de la producción de oligómeros de N-acetilglucosamina en las paredes celulares vegetales, con la ventaja adicional de que las plantas producidas por métodos de la invención no muestran un retraso en el crecimiento de las raíces.
- 15 **Antecedentes de la técnica**
- Las fibras naturales, que incluyen celulosa que contiene fibras naturales de plantas tales como algodón y lino, han sido utilizadas por la humanidad durante más de 5000 años. Sin embargo, 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 β -1-4-enlazados.
- 20 Esta naturaleza relativamente inerte es, p. ej., evidente durante el proceso de tinción de fibras y tejidos de algodón. Se utilizan varios tipos de colorantes para el algodón de color tales como colorantes directos y, sobre todo, colorantes reactivos con las fibras, que son ambas moléculas aniónicas. El propio algodón desarrolla una carga aniónica en agua, por lo que sin un tratamiento especial, la absorción de colorante por la fibra o el tejido es bastante elaborada.
- 25 Los colorantes directos crean un enlace hidrógeno relativamente débil con el polímero de celulosa formando una unión semi-permanente. Los colorantes directos son más fáciles de utilizar y menos costosos que los tintes reactivos con fibras, pero no resisten bien el lavado. Colorantes reactivos con las fibras son moléculas que combinan cromóforos con un grupo reactivo que forma enlaces covalentes fuertes con la fibra a través de reacción con grupos hidroxilo. Los enlaces covalentes proporcionan una buena resistencia de la fibra teñida frente al lavado.
- 30 Durante el proceso de tinción, se necesitan grandes cantidades de electrolitos para proteger los colorantes aniónicos de las cargas de fibra aniónicas. Colorantes hidrolizados sin tratar (hasta 40%) necesitan ser separados mediante múltiples etapas de lavado, generando grandes volúmenes de aguas residuales, que también contienen los electrolitos antes mencionados.
- 35 La provisión de fibras de celulosa con una carga eléctrica positiva, p. ej., mediante la incorporación de compuestos químicos cargados positivamente, podría, por lo tanto, mejorar la capacidad de tinción de fibras de celulosa naturales, así como mejorar cualquier reacción química de la fibra de celulosa modificada con compuestos químicos cargados negativamente. También haría posible el uso de colorantes de carácter ácido.
- 40 Varias publicaciones han descrito la incorporación en o el revestimiento de oligómeros de quitosano en fibras de celulosa para preparar mezclas de quitosano/celulosa, hilos o tejidos. El quitosano es un polímero de glucosamina cargado positivamente, que se puede obtener por desacetilación de quitina, p. ej., mediante tratamientos alcalinos. La quitina en sí es un polímero de N-acetilglucosamina β -1-4 enlazado (GlcNAc).
- La solicitud de patente US2003/0134120 describe el revestimiento de fibras naturales con quitosano.
- 45 Liu et al. (*Carbohydrate Polymers* 44 (2003) 233-238) describen un método para el revestimiento de fibras de algodón con quitosano, por oxidación del hilo de algodón con peryodato de potasio a 60°C en agua y subsiguiente tratamiento con una disolución de quitosano en ácido acético acuoso. Con el revestimiento de quitosano, la superficie de la fibra de algodón se volvió fisiológica y biológicamente activa. Puesto que la reactividad química del grupo amino es mayor que el grupo hidroxilo de monómeros de celulosa, la fibra tiene más potencial para una modificación química adicional. Además de ello, la superficie lisa de la fibra de algodón se volvió tosca, sugiriendo un mayor potencial para la absorción del fármaco y la liberación controlada del mismo.

Sobre la base de la función fisiológica de quitosano en inhibir, p. ej., dermatofitos, mucha prendas, tejidos y fibras funcionales emplean fibras de mezcla de celulosa quitosano, conjugados de fibras de celulosa-quitosano y tejidos revestidos con resinas que contienen quitosano.

- 5 El documento WO 00/09729 describe la expresión de genes de quitina sintasa y quitina desacetilasa en vegetales para alterar la pared celular para usos industriales y una resistencia mejorada a enfermedades. Específicamente usos citados son: proporcionar una única fuente vegetal de celulosa, quitina y quitosano, para aumentar la resistencia a la tracción y aumentar el chasquido quebradizo. Genes de quitina sintasa sugeridos específicamente se derivan de organismos fúngicos. No se proporcionan datos experimentales sobre la producción de quitina o quitosano en plantas, ni sobre la incorporación de los mismos en las paredes celulares vegetales.
- 10 El documento WO2006/136351 demostró que la estrategia tal como se propone en el documento WO00/09729 no conduce a la incorporación funcional de quitina en la pared celular vegetal. En su lugar, el documento WO 2006/136351 describe que la quitina se produce eficazmente en la pared celular secundaria de fibras de algodón sólo cuando la N-acetilglucosamina transferasa se reubica en el aparato de Golgi. Para la quitina sintasa fúngica de *Neurospora crassa* la reubicación en el aparato de Golgi se consigue mediante la fusión operable de esta quitina sintasa fúngica con una secuencia de anclaje de señal heteróloga específica para el aparato de Golgi, y expresando el gen quimérico resultante en vegetales. Sin embargo, para el tipo NODC de N-acetil glucosamina transferasa, no se requiere la adición de una secuencia de anclaje señal para la localización de la proteína NodC en el aparato de Golgi ni para la incorporación de quitina-oligosacáridos en la pared celular vegetal sin alimentación externa de GlcNAc. Aunque la quitina se podría producir de manera eficiente en las paredes celulares vegetales, también se observó que las plantas transgénicas que comprenden NODC tenían raíces más cortas en comparación con las plantas de tipo salvaje.
- 15 Por lo tanto sigue existiendo una necesidad de métodos alternativos para producir paredes celulares vegetales tales como paredes celulares secundarias que comprenden polisacáridos cargados positivamente. En particular existe una necesidad de proporcionar métodos para producir plantas con oligosacáridos cargados positivamente en sus paredes celulares, pero sin retraso en el crecimiento de la raíz. Estos y otros problemas se resuelven como se describe en lo que sigue en las diferentes realizaciones, ejemplos y reivindicaciones.
- 20
- 25

Sumario de la invención

- 30 En una realización, la invención proporciona un método para la producción de una célula vegetal, o una planta tal como una planta de algodón, que comprende oligosacáridos 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, en que el gen quimérico comprende un promotor expresable en vegetales operativamente enlazado a una región que codifica el ADN para una N-acetilglucosamina transferasa de tipo NODC fusionada a una secuencia de anclaje señal de Golgi; y una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación. En otra realización, se proporciona un método para la producción de una planta tal como una planta de algodón que comprende oligosacáridos cargados positivamente en la célula utilizando métodos de acuerdo con la invención, caracterizado por que la longitud de la raíz de dicha planta es esencialmente la misma que la de una planta de tipo salvaje que no comprende el gen NODC.
- 35

- 40 La invención proporciona, además, un método para producir plantas que comprenden oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, que comprende, además, la etapa de desacetilar dichos oligosacáridos que consisten en monómeros de N-acetilglucosamina tratando la pared celular de dicha planta con una disolución alcalina o por medio de la acción enzimática de quitina desacetilasas.

- 45 La invención también proporciona genes quiméricos que comprenden un promotor expresable en plantas; una región de ADN que codifica una proteína de nodulación C fusionada a una secuencia de anclaje señal para fijar como objetivo las membranas del aparato de Golgi; y una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación, y células vegetales, plantas tales como algodón y fibras de algodón que comprenden un gen quimérico de este tipo. En otra realización, la invención proporciona plantas que consisten esencialmente en células vegetales que comprenden un gen quimérico que comprende un NODC fusionado a una secuencia de anclaje señal de Golgi, caracterizadas por que la longitud de la raíz de dicha planta es esencialmente la misma que la de una planta de tipo salvaje que no comprende NODC.

- 50 La invención proporciona además células vegetales, plantas tales como plantas de algodón, que comprenden el gen quimérico que comprende NODC fusionado a una secuencia de anclaje señal de Golgi. También se describen paredes celulares vegetales, que comprenden una cantidad incrementada de oligosacáridos, que pueden ser oligosacáridos cargados positivamente tales como oligo-N acetilglucosaminas, con un grado de polimerización de 2 a 10 o 2 a 9 o 2 a 8 o 2 a 7 o 2 a 6 o 2 a 5 o 3 a 5. Paredes celulares vegetales de este tipo

pueden obtenerse por los métodos de la invención. Estas paredes celulares vegetales se pueden someter a modificación química adicional.

Específicamente, las fibras de algodón comprenden una cantidad incrementada de los oligosacáridos cargados positivamente aquí mencionados e hilos, materiales textiles que comprenden tales fibras de algodón. Las fibras de algodón se pueden utilizar como tales o pueden haber sido sometidas a modificación química adicional, incluyendo la tinción. Estas fibras de algodón pueden ser reconocidas, p. ej., a través de la detección de NODC que comprende genes quiméricos, 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 aminos, cuando se compara con fibras de algodón obtenidas a partir de plantas de algodón de una línea isogénica que no contiene un gen quimérico NODC operativamente enlazado a una secuencia de anclaje señal de Golgi tal como se describe en esta memoria. La presencia y/o la cantidad de oligosacáridos en las fibras de algodón también se puede determinar directamente a través de, p. ej., cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) o cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (HPLC-MS).

En otra realización, la invención se dirige al uso de una región de ADN que codifica una N-acetilglucosamina transferasa capaz de ser dirigida al aparato de Golgi de una célula vegetal para aumentar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular de una célula vegetal o para aumentar la reactividad de las paredes celulares vegetales para modificaciones químicas de tales paredes celulares vegetales.

La invención también proporciona genes quiméricos que comprenden las regiones de ADN siguientes, operativamente enlazadas: un promotor expresable en plantas; una región de ADN que codifica una N-acetilglucosamina transferasa de tipo NODC fusionada a una secuencia de anclaje señal de Golgi; y una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación, y el uso de estos genes quiméricos para aumentar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular vegetal y para producir fibras de algodón, hilos y tejidos con reactividad mejorada tales como capacidad de tinción.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas NODC. Los residuos 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*; proteína ROT_NODC_RHIS3 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 residuos de aminoácidos conservados en todas las proteínas se indican en negrita. ROT_NODC_BRAJA: proteína NODC de *Bradyrhizobium japonicum*; proteína ROT_NODC_RHIS3 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: Longitud de raíz de tipo salvaje (col) y plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con pTJN6 y pTGK42. A: comparación entre plantas de tipo salvaje y plantas transformadas con pTJN6 y con dos líneas que contienen pTGK42. Barras negras: tipo salvaje; barras controladas: pTJN6-23; barras sombreadas: pTGK42-10; barras con franjas verticales: pTGK42-28. B: comparación entre plantas de tipo salvaje y diferentes líneas transgénicas que contienen pTJN6. Barras negras: tipo salvaje; barras controladas: pTJN6-4; barras sombreadas: TJN6-14; barras con franjas verticales: pTJN6-23; barras con franjas horizontales: pTJN6-26.

Figura 4: Presencia de mono-, di-, tri-, tetra- y pentámeros de GlcNAc en plantas de *Arabidopsis* transformadas con pTJN6. Los valores enmarcados en círculos representan los valores para los oligómeros de GlcNAc; el número de hexágonos por encima de estos valores representa el grado de polimerización de estos oligómeros. Los gráficos se muestran en pares, de los cuales el gráfico superior es de tipo salvaje, y el gráfico inferior es el transformante que contiene pTJN6.

Descripción detallada de diferentes realizaciones de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que, tras la expresión en células vegetales, la fusión de una secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga a una N-acetilglucosamina transferasa del tipo NODC inesperadamente incrementó la incorporación de oligómeros específicos N-acetilglucosamina en las paredes celulares vegetales hasta 65 veces cuando se compara con las paredes celulares de plantas que expresan un N-acetilglucosamina transferasa del tipo NODC no fusionada a una secuencia de anclaje señal de Golgi. La síntesis de los oligómeros de GlcNAc no requería la adición externa de GlcNAc al medio de crecimiento.

Al mismo tiempo, mientras que la expresión de los NODC en las plantas afectó negativamente a la longitud de la raíz, la fusión de la secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga para NODC restauró la longitud de la raíz al nivel de tipo salvaje.

Así, en una primera forma de realización de la invención, se proporciona un método para la producción de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular vegetal, particularmente la pared celular secundaria, en donde el método comprende la etapa de introducir un gen quimérico en la célula vegetal, y el gen quimérico comprende los siguientes fragmentos de ADN enlazados operativamente:

- un promotor expresable en plantas;
- una región de ADN que codifica una N-acetilglucosamina transferasa del tipo NODC fusionada a una secuencia de anclaje señal para fijar como objetivo las membranas del aparato de Golgi; y
- una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación.

En otra realización, se proporciona un método para la producción de una planta que comprende oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, particularmente la pared celular secundaria, en donde el método comprende las etapas de

- o introducir un gen quimérico en la célula vegetal, comprendiendo el gen quimérico los siguientes fragmentos de ADN enlazados operativamente:
 - un promotor expresable en plantas;
 - una región de ADN que codifica una N-acetilglucosamina transferasa del tipo NODC fusionada a una secuencia de anclaje señal para fijar como objetivo las membranas del aparato de Golgi; y
 - una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación;
- o regeneración de dicha célula vegetal en una planta.

Adecuado para el método de la invención es que la proteína de nodulación C se expresa en dicha célula vegetal. La proteína de nodulación C puede expresarse en todas las células de dicha planta. Alternativamente, la proteína de nodulación C puede expresarse en tejidos específicos de dicha planta sólo, pero no en otras, tales como las raíces u hojas de algodón.

Proteínas nodulación y sus genes codificantes están involucrados en la síntesis de las señales de lipo-quito-oligosacáridos o quito-oligómeros acetilados (factores Nod) que conducen a la formación de nódulos típicos de la simbiosis entre Rhizobiaceae y plantas leguminosas.

Los productos génicos nod más cruciales, requeridos para la síntesis de estos lipo-quito-oligosacáridos son NODA, NODB y NODC. En ausencia de otros productos génicos nod que pueden formar una señal de núcleo que consiste en oligómeros de cuatro o cinco residuos de N-acetilglucosamina que portan un grupo acilo enlazado a 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-acetilglucosaminil transferasa que produce la cadena de quito-oligosacárido; el grupo N-acetilo del residuo no reductor de N-acetilglucosamina de la cadena de quito-oligosacárido se separa por NODB, que actúa como una quitina oligosacárido desacetilasa; NODA está implicado en la unión de la cadena de acilo al grupo amino libre generado por la acción de NODB. Otros factores Nod, codificados por otros genes *nod*, proporcionan cualquiera de los grupos químicos decorativos discriminando los diferentes factores de nodulación. Para los fines de la presente invención, sólo las proteínas NODC y genes codificantes son de relevancia.

La proteína de nodulación C ("proteína NODC") es una proteína bien caracterizada (para una revisión, véase Kamst y Spaink, 1999, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 11, págs. 187-199). Pertenece a una familia de proteínas β -polisacárido sintasa que están involucradas en la síntesis de polisacáridos lineales que contienen residuos de monosacáridos β -enlazados. Las enzimas que están estructuralmente más estrechamente relacionadas con NODC son transferasas implicadas en la síntesis de la quitina (N-acetilglucosaminas β -1-4-enlazadas); celulosa (el polímero de residuos de glucosa β -1-4-enlazadas); ácido hialurónico (un co-polímero de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico) y oligosacáridos de quitina producidos durante el desarrollo temprano de embriones de peces cebra. Se pueden reconocer seis regiones cortas conservadas entre estas proteínas. Para las proteínas NODC, estas secuencias cortas corresponden a:

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

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

5 Proteínas NODC también se caracterizan frecuentemente por tramos hidrófobos de residuos aminoácidos que representan dominios de transmembrana (Barney et al., 1996, *Molecular Microbiology* 19, págs. 443-453). El dominio hidrofóbico N-terminal se extiende por la membrana bacteriana en una orientación $N_{out}-C_{in}$, siendo expuesto el dominio hidrofílico grande adyacente al citoplasma bacteriano. Esta orientación parece depender de la presencia de la o las regiones hidrofóbicas cerca del extremo C, que contiene potencialmente tres vanos de membrana, de manera que el extremo C de NODC se encuentra normalmente en el periplasma bacteriano.

10 El gran bucle hidrofílico de NODC también tiene otra similitud estructural con regiones similares en las otras β -glucosil transferasas. Esta región se ha propuesto que se compone de un dominio A (que se extiende desde aproximadamente el residuo 45 a 140 en la secuencia de SEQ ID NO 4) que consiste en láminas β y hélices α alternantes, y de un dominio B (correspondiente a los residuos 215-280 de SEQ ID NO 4) que se cree que es la responsable de la capacidad de procesamiento de NODC. En el dominio A, se conservan dos residuos aspartato (residuos 88 y 139 de SEQ ID NO. 4); en el dominio B también se conservan un residuo aspartato y el motivo QXXRW (residuos 240 y 276-280 de SEQ ID NO 4) y se piensa que son cruciales para la actividad catalítica.

15 Cuando se comparan entre sí diferentes proteínas NODC, se revelan las secuencias de aminoácidos que están más conservadas. La Figura 1 representa un alineamiento de diferentes proteínas NODC de SEQ ID NO 1, 2, 8, 4, 7, 5 e indica un número de residuos conservados entre las diferentes proteínas NODC, incluyendo (en orden):

20 - la secuencia PXVDVIXPXXNE
 - la secuencia VDDGSXN
 - la secuencia GDXLVDVSDTXXXXDV
 - la secuencia GXXMGQ
 - la secuencia DMEYWLACNEERXXQXRFGXVMXCXGXCXMYR
 - la secuencia FRTXYXPXAXXTXVP
 25 - la secuencia YLXQQLRWARSTXRXTXL
 - la secuencia QNXGXXLL
 - la secuencia RFXFXXHXXXNXXLXPLKXYALXT

La Figura 2 representa un alineamiento de un subconjunto de diferentes proteínas NODC, que muestra los residuos aún más conservados tales como:

30 - la secuencia WLTRLIDMEYWLACNEERXXQXRFGXVMCCCGPCAMYRRS
 - la secuencia LLXXYEXQXFXGXPXFGEDRHLTILMLXAGFRTXYVPXAXAXTXVP
 - la secuencia YLRQQLRWARSTXRDTXLA

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

40 Regiones codificantes que codifican una N-acetilglucosamina transferasa del tipo NODC se pueden obtener directamente a partir de bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Sinorhizobium*, *Desulfobacterium*, *Dokdonia*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium* o *Psychroflexus*. Sin embargo, resultará inmediatamente claro que tales regiones codificantes también se pueden hacer de manera sintética, incluso con un uso de codones adaptado a la planta, particularmente la planta de producción de fibra en la que se introduce el gen quimérico que sobre-expresa la proteína de tipo NODC.

45 Diferentes secuencias de proteínas NODC están disponibles de bases de datos tales como las secuencias de proteínas identificadas por los siguientes números de acceso: 1615305C, 1615305D, 1615305E, AAA26226, AAA63602, AAB16897, AAB24745, AAB34509, AAB47353, AAB51164, AAB71694, AAB91695, AAB95329, AAC80567, AAD11313, AAD11315, AAD11317, AAD11319, AAD11321, AAD11323, AAD11325, AAD11327, AAD11329, AAD11331, AAD11333, AAD11335, AAD11337, AAD11339, AAD11341, AAD11343, AAD11345, AAD11347, AAD11349, AAD11351, AAD11353, AAD11355, AAD11357, AAD11359, AAD11361, AAD11363, AAD11365, AAD11367, AAD11369, AAD11371, AAD11373, AAD11375, AAD11377, AAD11379, AAD11381, AAD11383, AAD11385, AAD11387, AAD11389, AAD11391, AAD11393, AAD11395, AAD11397, AAD11399, AAD11401, AAD11403, AAD11405, AAG60998, AAK00157, AAK39956, AAK39957, AAK39958, AAK39959, AAK39960, AAK39961, AAK39962, AAK39963, AAK39964, AAK39965, AAK39966, AAK39967, AAK50872, AAK65131, AAL88670, AAN62903, AAS91748, AAU11338, AAU11339, AAU11340, AAU11341, AAU11342, AAU11343, AAU11344, AAU11345, AAU11346, AAU11347, AAU11348, AAU11349, AAU11350, AAU11351,

ES 2 548 166 T3

AAU11352, AAU11353, AAU11354, AAU11355, AAU11356, AAU11357, AAU11358, AAU11359, AAU11360,
 AAU11361, AAU11362, AAU11363, AAU11364, AAU11365, AAX30049, AAX30050, AAY44091, AAY44092,
 AAY44093, AAY89044, AAZ81541, ABC40958, ABC67303, ABD39006, ABD39007, ABD39008, ABD39009,
 5 ABD39010, ABD39011, ABD39012, ABD39013, ABD39014, ABD39015, ABD39016, ABD39017, ABD39018,
 ABD39019, ABD39020, ABD39021, ABD39022, ABD39023, ABD39024, ABD39025, ABD39026, ABD39027,
 ABD39028, ABD39029, ABD39030, ABD39031, ABD39032, ABD39033, ABD39034, ABD39035, ABD39036,
 ABD39037, ABD39038, ABD67413, ABD67416, ABD67419, ABD67422, ABD67425, ABD67428, ABD67431,
 ABD67434, ABD73319, ABD73320, ABD73321, ABD73322, ABD73323, ABD73324, ABD73325, ABD73326,
 ABD73327, ABD73328, ABD73329, ABD73330, ABD94161, ABD94162, ABD94163, ABD94164, ABD94165,
 10 ABF93198, ABF93199, ABF93200, ABF93201, ABF93202, ABM69186, ABM69187, ABM69188, ABM69189,
 ABM69190, ABN09217, ABN09218, ABN09219, ABN11177, ABN11178, ABN11179, ABP93834, ABS85176,
 ABS85177, ABS85178, ABS85179, ABS85180, ABS85181, ABS85182, ABU69044, ABU69045, ABU69046,
 ABU69047, ABU69048, ABU69049, ABU69050, ABU69051, ABU69052, ABU69053, ABU69054, ABU69055,
 ABU69056, ABU69057, ABU69058, ABU69059, ABU69060, ABU69061, ABU89879, ABV25689, ABV25690,
 15 ABV25691, ABV25692, ABV25693, ABV25694, ABW96196, ABW96197, ABW96198, ABW96199, ABW96200,
 ABW96201, ABW96202, ABW96203, ABW96204, ABW96205, ABW96206, ABW96207, ABW96208, ABW96209,
 ABW96210, ABW96211, ABY59633, ABY59634, ABY59635, ABY59636, ABY59637, ACA80309, ACA80310,
 ACA80311, ACA80312, ACA80313, ACC77565, ACD39337, ACD39338, ACD39339, ACD39340, ACD39341,
 ACD39342, ACD39343, ACD39344, ACD39345, ACD39346, ACD39347, ACD62595, ACD63093, ACD63094,
 20 ACD63095, ACD63096, ACD63097, ACD63098, ACD63099, ACD63100, ACD63101, ACD63102, ACD63103,
 ACD63104, ACF19762, ACF19763, 19764 ACF, ACF19765, 19766 ACF, ACF19767, 19768 ACF, ACF19769,
 ACF19770, ACH91221, ACH91222, ACH91223, ACH91224, ACH91225, ACH91226, ACH91227, ACH91228,
 ACH91229, ACH91230, ACH91231, ACH91232, ACH91233, ACH91242, ACH91243, ACH91244, ACH91245,
 ACH91246, ACH91247, ACH91248, ACH91249, ACI47333, ACI47334, ACI47335, ACI47336, ACI47337, ACI47338,
 25 ACI47339, ACI47340, ACI47341, ACI47342, ACI47343, ACI47344, ACI47345, ACL12058, ACL12059, ACL50517,
 ACL50518, ACL50519, ACL50520, ACL50521, ACL50522, ACL50523, ACM69382, ACM79634, ACM79635,
 ACM79636, ACM79637, ACM79638, ACM79639, ACM79640, ACM79641, ACM79642, ACM79643, ACM79644,
 ACM79645, ACM79646, ACN17701, ACN69201, ACN69202, ACN69203, ACN69204, ACN69205, ACN69206,
 30 ACN69207, ACN69208, ACN69209, ACN69210, ACN69211, ACN69212, ACN69213, AC058664, AC058665,
 AC058666, AC058667, AC058668, AC058669, ACO58670, AC058671, AC058672, AC058673, AC058674,
 AC058675, ACP40990, ACS35430, ACS35434, ACT34091, ACT34094, ACT34097, ACT34100, ACT34101,
 ACT34104, ACT34107, ACT34110, ACT34113, ACT34116, ACT34119, ACT34122, ACT34125, ACT34128,
 ACT34131, ACT34134, ACT34137, ACT34140, ACT34143, ACV52950, ACV52951, ACV52952, ACV52953,
 ACV52954, ACV52955, ACX47326, ACX47327, ACX47328, ACX47329, ACX47330, ACX47331, ACX47332,
 35 ACX47333, ACX47334, ACY02884, ACY78518, ACZ52692, ACZ52693, ACZ52694, ACZ52695, ACZ52696,
 ACZ52697, ADD20957, ADD20958, ADD20959, ADD20960, ADD20961, ADD20962, ADD20963, ADD20964,
 ADD20965, ADD20966, ADD20967, ADD20968, ADD20969, ADD20970, ADD20971, ADG63645, ADG63646,
 ADG63647, ADG63648, ADG63649, ADG63650, ADG63651, ADG63652, ADJ18191, ADJ18192, BAA06082,
 BAA06083, BAA06084, BAA06085, BAA06086, BAA06087, BAA06088, BAA06089, BAA06090, BAA24092,
 40 BAB52500, C26813, CAA25810, CAA25811, CAA25814, CAA26310, CAA26311, CAA51773, CAA51774,
 CAA608779, CAA67139, CAB56055, CAC42489, CAD29949, CAD29950, CAD29951, CAD29952, CAD29953,
 CAD29954, CAD29955, CAD29956, CAD29957, CAD31533, CAD43933, CAD90257, CAD90583, CAD90584,
 CAD90585, CAD90586, CAD90587, CAD90588, CAH04369, CAN84684, CAP64017, EAQ38847, EAST2439,
 45 NP_106714, NP_435719, NP_443883, P04340, P04341, P04677, P04678, P04679, P06234, P06235, P17862,
 P24151, P26024, P50357, P53417, P72334, Q07755, Q53513, YP_001.796.208, YP_002605865, ZP_01050448 o
 ZP_01252.570.

Otras entradas en las bases de datos UNIPROT referentes a las proteínas NODC de longitud completa se resumen en la siguiente tabla.

Tabla: Proteínas NODC de longitud completa

UniProt/UniParc ID	Accesos UniProt	Nombre de la especie	Longitud
NODC_BRAJA	P26024	Bradyrhizobium japonicum	485
NODC_AZOCA	Q07755	Azorhizobium caulinodans	395
Q6PTX8_9RHIZ	Q6PTX8	Rhizobium sp. SIN-1	408
Q70YC2_9BURK	Q70YC2	Cupriavidus taiwanensis	450
Q6EX51_SINSB	Q6EX51	Sinorhizobium sp.	452
NODC_RHIS3	P72334	Rhizobium sp.	450

UniProt/UniParc ID	Accesos UniProt	Nombre de la especie	Longitud
NODC_RHILP	P24151	Rhizobium leguminosarum	428
Q8GNH5_RHIME	Q8GNH5	Rhizobium meliloti	421
Q53254_RHITR	Q53254	Rhizobium tropici	452
Q9AQ23_BRASW	Q9AQ23	Bradyrhizobium sp.	452
NODC_RHISN	P50357	Rhizobium sp.	413
Q8KLG3_RHIET	Q8KLG3	Rhizobium etli	443
Q9RAN5_MESS7	Q9RAN5	Mesorhizobium sp.	416
Q9Z3I6_BRASS	Q9Z3I6	Bradyrhizobium sp.	481
NODC_RHILO	P17862	Rhizobium loti	424
Q8KJI5_RHILO	Q8KJI5	Rhizobium loti	424
NODC_RHIGA	P50356	Rhizobium galegae	433
NODC_RHIME	P04341	Rhizobium meliloti	426
Q9R614_RHIME	Q9R614	Rhizobium meliloti	424
O52478_RHIME	O52478	Rhizobium meliloti	402
Q52971_RHIME	Q52971	Rhizobium meliloti	402
NODC_RHILV	P04340	Rhizobium leguminosarum	424

Sin embargo, resultará claro que las variantes de las proteínas NODC, en donde se han eliminado, sustituido o insertado uno o más residuos aminoácidos, que pueden deducirse de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, también se pueden utilizar para el mismo efecto en los métodos de acuerdo con la invención, con la condición de que no se haya cambiado la actividad enzimática. Estas proteínas NODC variantes pueden tener aproximadamente un 95% de identidad de la secuencia con una cualquiera de las proteínas NODC mencionadas en esta memoria. Un método para determinar la actividad enzimática de las proteínas NODC in vitro ha sido descrito, por ejemplo, por Kamst et al., 1997 Journal of Bacteriology, 179, págs. 2103-2108.

Por lo tanto, tal como se utiliza en esta memoria, una "N-acetilglucosamina transferasa que es del tipo NODC" es una N-acetilglucosamina transferasa que cataliza la transferencia del resto GlcNAc de UDP-GlcNAc a un quitina oligosacárido naciente. Preferiblemente, la proteína contiene las regiones conservadas que se pueden encontrar mediante comparando las diferentes proteínas NODC.

Adecuado para los métodos de la invención son las proteínas listadas en SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 9, en particular la proteína listada en SEQ ID NO 1, y los fragmentos de ADN que codifican una proteína de este tipo.

NODC debe estar equipada con secuencias de anclaje señal heterólogas que fijan como objetivo la NODC a las membranas del aparato de Golgi. Tales secuencias son conocidas en la técnica, incluyendo las secuencias dentro de y junto al segmento de transmembrana de α -2,6-sialiltransferasa (particularmente los primeros 44 ó 52 aminoácidos de los mismos; Munro et al 1991, EMBO Journal, 10: 3577-3588); la secuencia de anclaje señal procedente de galactosiltransferasa humana (particularmente los primeros 60 aminoácidos de la misma) o la secuencia de anclaje señal procedente del homólogo de Arabidopsis del receptor HDEL de levadura (AtERD2) (Saint-Jore et al, 2002, The Plant Journal, 29: 661-678), la secuencia de anclaje señal de la proteína β 1,2-xilosiltransferasa (especialmente los primeros 36 aminoácidos de los mismos; Pagny et al, 2003, The Plant Journal 33: 189-203), las secuencias de anclaje señal de N-acetil-glucosaminil transferasa I (particularmente los primeros 77 aminoácidos de la misma; Essl et al 1999; FEBS Lett 453:169-173) o un fragmento de 20 aminoácidos de la proteína lisosomal humana LAMP1 (Brandizzi et al, 2002, Plant. Cell 14: 1077-1092). Otras señales que fijan como objetivo Golgi a ser empleadas mediante fusión en el extremo C de la N-acetilglucosamina transferasa incluyen la secuencia de aminoácidos "YYHDL" como se puede encontrar en proteínas de Arabidopsis DAGAT1, o "LKLEI" como se puede encontrar en Arabidopsis DAGAT2. La fusión de secuencias de anclaje señal de Golgi de este tipo a NODC mediante el enlace de fragmentos de ADN que codifican los respectivos polipéptidos puede conseguirse utilizando técnicas estándares de ADN recombinante.

Una secuencia de anclaje señal heteróloga, tal como se utiliza en esta memoria, significa una secuencia de anclaje señal que no es, naturalmente, parte de la proteína a la que se fusiona. La secuencia de anclaje señal heteróloga, por lo tanto, se puede derivar de otra proteína de la misma especie, o puede derivarse de una proteína de otra especie.

5 Los genes quiméricos de acuerdo con la invención comprenden un promotor expresable en plantas. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "promotor" se refiere a cualquier ADN que es reconocido y unido (directa o indirectamente) mediante una ARN polimerasa dependiente de ADN durante la iniciación de la transcripción. Un promotor incluye el sitio de inicio de la transcripción, y sitios de unión para factores de inicio de la transcripción y ARN polimerasa, y puede comprender diversos otros sitios (p. ej., potenciadores), a los que se pueden unir las proteínas reguladoras de la expresión génica.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "promotor expresable en plantas" 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, determinados promotores de origen viral o bacteriano tales como los promotores CaMV35S, el promotor del virus del trébol subterráneo N° 4 o N° 7, promotores de genes de T-ADN tales como Pmas, Pnos, Ptr1, Ptr2, virus del mosaico de la vena de la mandioca y similares.

15 na terminación de la transcripción y región de poliadenilación, tal como se utiliza en esta memoria, es una secuencia que impulsa la escisión del ARN naciente, tras lo cual se añade una cola poli (A) al extremo ARN 3' resultante. Señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación funcionales en plantas incluyen, pero no se limitan a, 3'nos, 3'35S, 3'his y 3'g7.

20 Un promotor expresable en plantas que controla el inicio y el mantenimiento de la transcripción preferiblemente en las células de fibra es un promotor que impulsa la transcripción de la región de ADN unido operativamente a un nivel más alto en las células de fibras y las células de la epidermis subyacentes que en otras células o tejidos de la planta. Promotores de este tipo incluyen el promotor de algodón de un gen de β -tubulina específico para la fibra (tal como se describe en el documento WO0210377), el promotor de algodón de un gen actina específico para la fibra (tal como se describe en el documento WO0210413), el promotor de un gen de proteína de transferencia de lípidos específico para la fibra de algodón (tal como se describe en el documento US5792933), el promotor de la envuelta de la semilla y la proteasa específica para la fibra de algodón (Hou et al., 2008, *Chinese Science Bulletin* 53, págs. 2639- 2645), el promotor del gen R2R3 MYB específica para la fibra de algodón (Pu et al., 2008, *Genetics* 180, págs. 811-820), un promotor de un gen de expansina de algodón (documento WO9830698), un promotor de un gen de quitinasa en algodón (documento US2003106097), el promotor de CesA1 (documento US6271443), o los promotores de los genes específicos para fibras descritos en el documento US6259003 o US6166294 o WO96040924.

25 Oligosacáridos cargados positivamente de acuerdo con la invención puede consistir en oligómeros de N-acetilglucosamina tales como oligómeros de N-acetilglucosamina β 1-4-enlazadas. Dichos oligosacáridos pueden comprender 2 a 10 o 2 a 9 o de 2 a 8 o 2 a 7 o 2 a 6 o 2 a 5 o 3 a 5 monómeros de N-acetilglucosamina.

30 Grado de polimerización, tal como se utiliza en esta memoria, es el número de monómeros presentes en un oligómero o en un polímero. El grado de polimerización de un oligómero de N-acetilglucosamina es el número de monómeros de N-acetilglucosamina presente en dicho oligómero.

35 En otra realización, la invención proporciona un método para producir plantas que comprenden oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular utilizando métodos de acuerdo con la invención, caracterizado por que dichas plantas tienen una longitud de la raíz que es esencialmente la misma que el de las plantas no comprenden un gen NODC.

40 La longitud de la raíz es esencialmente la misma cuando tiene una longitud de al menos 70%, u 80% o 90%, o 95%, o entre 70% y 120%, o entre 80% y 120%, o entre 80% y 110%, o entre 90% y 110%, o entre 95% y 110% de, o que es idéntica a la longitud de la raíz de tipo salvaje que no comprende un gen NODC.

45 En una realización adicional, las plantas de acuerdo con la invención se seleccionan de algodón, cáñamo o lino. En una realización adicional, dichas plantas son plantas de algodón que comprenden fibras.

50 La invención proporciona, además, paredes celulares vegetales tales como paredes celulares secundarias o fibras, incluyendo dichas paredes celulares obtenidas a partir de células vegetales utilizando los métodos de acuerdo con la invención. Tales paredes celulares vegetales comprenden oligosacáridos cargados positivamente tales como oligómeros de N-acetil glucosamina, N-acetilglucosaminas β 1-4-enlazadas, o quitina, embebidos en la celulosa.

La invención también proporciona la etapa de aislar paredes celulares vegetales y fibras de las plantas obtenidas por el método de la invención.

5 Los polisacáridos cargados positivamente de acuerdo con la invención pueden modificarse adicionalmente, p. ej., desacetilarse parcial o totalmente de manera que se obtienen oligómeros que comprenden residuos glucosamina. El grupo amino de las glucosaminas resultantes es químicamente más reactivo que el grupo aminoacetilo de N-acetil glucosamina o el grupo hidroxilo de la celulosa.

10 La desacetilación de N-acetilglucosamina puede realizarse químicamente utilizando métodos que incluyen la hidrólisis alcalina, a través de la aplicación de tecnología termo-mecano-químico (Pelletier et al, 1990, Biotechnol Bioeng 36, págs. 310-315), utilizando la técnica de impregnación alcalina (Rao et al, 1987, Indian Journal of Technology, 25, págs. 194-196), utilizando disolventes orgánicos miscibles en agua como diluyentes (Batista y Roberts, 1990, Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics, 191, págs..429-434), utilizando tiofenol para atrapar oxígeno durante los procesos de desacetilación (Domard y Rinaudo, 1983, International Journal of Biological Macromolecules, 5, págs. 49-52) o utilizando condiciones de autoclave (No et al., 2000, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, págs. 2625-2627). La desacetilación de la quitina también se puede realizar 15 enzimáticamente utilizando quitina desacetilasas. Tales quitina desacetilasas incluyen las de *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Saccharomyces cerevisiae*.

20 La pared celular vegetal obtenida de acuerdo con la invención, en particular los que han sido sometidos a una etapa de desacetilación, puede ser modificada adicionalmente de forma química. Los productos que contienen paredes celulares vegetales de este tipo tales como fibras, hilos o tejidos tienen cualidades que se asemejan a las de las mezclas de celulosa-quitosano descritas en la técnica, incluyendo una capacidad de tinción mejorada, una inhibición mejorada de, p. ej., dermatofitos, la liberación controlada de fármacos, etc.

25 La invención también proporciona los genes quiméricos tal como se describe en esta memoria, y células vegetales o plantas que contienen tales genes quiméricos, y el uso de dichos genes quiméricos para incrementar la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, o para incrementar la reactividad de las paredes celulares vegetales, fibras de algodón o hilos o tejidos para modificaciones químicas tales como la capacidad de tinción. La invención proporciona, además, plantas tales como plantas de algodón, que contienen dichos genes quiméricos, caracterizado por que la longitud de la raíz de dicha planta es esencialmente la misma que la de las plantas isogénicas que no contienen tales genes quiméricos. La invención proporciona, además, las fibras a partir de dicha planta de algodón, y un hilo o tejido hecho de dichas fibras.

30 Un aumento en la eficiencia de la producción de oligómeros de N-acetilglucosamina, o un aumento en la cantidad de oligosacáridos cargados positivamente en las paredes celulares vegetales tal como se utiliza en esta memoria significa un incremento de oligosacáridos positivamente cargados u oligómeros de N-acetilglucosamina en las paredes celulares vegetales que es al menos 2 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o 2 a 100 veces, o 5 a 100 veces, o 10 a 100 veces o 20 a 100 veces.

35 En una realización específica, la invención proporciona fibras de algodón obtenidas o que se pueden obtener a partir de plantas de algodón de acuerdo con los métodos de la invención, o que comprende el gen quimérico de acuerdo con la invención. En otras palabras, las fibras de algodón se proporcionan a partir de plantas de algodón que comprenden en el genoma, tales como el genoma nuclear, de sus células un gen quimérico que comprende un promotor expresable en plantas operativamente unido a una región de ADN que codifica una N-acetilglucosamina transferasa de tipo NODC fusionada a una secuencia de anclaje señal de Golgi. Realizaciones particulares de 40 regiones codificantes de ADN o promotores comprendidos en los genes quiméricos transferidos a plantas de algodón según se describen en otra parte en este documento.

45 Las fibras de algodón de acuerdo con la invención se pueden distinguir de fibras de algodón que se producen de forma natural, es decir, fibras de algodón obtenidas de una línea isogénica que no comprende un gen quimérico de acuerdo con la invención, mediante la capacidad de fibras de este tipo de una tinción incrementada con colorantes aniónicos (incluido, p. ej., rojo de Congo), mediante la capacidad de fibras de este tipo de una tinción incrementada con colorantes reactivos con amina (incluido, p. ej., éster tetrafluorofenílico). Las fibras de algodón de acuerdo con la invención tienen también la capacidad de unir aglutinina de germen de trigo que une quito-oligómeros. Las fibras de algodón de acuerdo con la invención también se pueden distinguir de fibras de algodón que se producen de forma 50 natural mediante detección directa de la N-acetilglucosamina y oligómeros de GlcNAc tales como quitobiosa, quitotriosa o quitotetraosa, preferiblemente después del tratamiento del material de la pared celular de la fibra con celulosa. Las fibras de algodón de acuerdo con la invención también se pueden distinguir por su contenido incrementado en nitrógeno.

55 Las fibras de algodón de acuerdo con la invención también se pueden distinguir de las fibras revestidas con quitosano o de hilos de mezcla de quitosano/celulosa en que los oligómeros cargados positivamente son distribuidos

de manera de manera más o menos uniforme en las paredes celulares vegetales secundarias que constituyen las fibras. Por consiguiente, en las secciones microscópicas de fibras de algodón, teñidas, p. ej., con Rojo Congo o con tetrafluorofenilo tal como se describe aquí más adelante, los colorantes serán distribuidos de manera más o menos uniforme a lo largo de las paredes celulares que constituyen las fibras de algodón, mientras que en 5 fibras revestidas con quitosano, la tinción se concentrará en la capa de quitosano dispuesta como una lámina en la superficie de las fibras tratadas.

Las fibras de algodón de acuerdo con la invención también se pueden distinguir de otras fibras de algodón mediante la detección de la NODC que comprende genes quiméricos en ácidos nucleicos que permanecen en el material vegetal asociado con fibras de algodón.

10 La tinción incrementada del material de la pared celular vegetal de acuerdo con la invención por parte de colorantes aniónicos tales como Rojo Congo se puede cuantificar, p. ej., tiñendo una cantidad uniforme de material en condiciones estándares, extendiendo el material sobre una zona normalizada (tal como un pocillo en una placa de múltiples pocillos), digitalizando una imagen de la zona de la escala de grises de la capa coloreada de material. 15 Cuanto menos gris, tanto más teñido será el material de la pared celular vegetal. De esta manera, fibras y material de la pared celular de acuerdo con la invención se pueden obtener con un incremento de al menos 10%, o al menos 30%, o al menos 50% en la tinción mediante Rojo Congo en comparación con el material control de la pared celular o fibras de líneas de plantas isogénicas sin un gen que codifica NODC.

El material de la pared celular vegetal de acuerdo con la invención también se puede teñir con colorantes ácidos tales como Naranja Ácido 7. Las fibras y el material de la pared celular de acuerdo con la invención se pueden 20 obtener con un aumento de al menos 50%, o al menos 70%, o entre 50% y 100% en la tinción por parte de Naranja Ácido 7 en comparación con el material control de la pared celular o fibras de líneas de plantas isogénicas sin un gen que codifica NODC.

La capacidad de las nuevas fibras de algodón de unirse específicamente a aglutinina de germen de trigo (detectable por el grupo fluoróforo acoplado) es una característica distintiva clara de las nuevas fibras de algodón previstas 25 frente a las fibras de algodón de origen natural. A excepción de una muy baja fluorescencia de fondo, las fibras de algodón que se producen de forma natural no manchan/fluorescen cuando son tratadas con WGA-alexa fluor 488 o 555. La fluorescencia de fibras de algodón aumenta al menos 5 veces cuando están presentes quito-oligómeros. Por consiguiente, la invención proporciona fibras de algodón que son capaces de unirse específicamente a aglutinina de germen de trigo, o WGA acoplado a un fluoróforo, tal como WGA Alexa 488 o WGA Alexa 555 o que, cuando se 30 tratan con WGA Alexa 488 o WGA Alexa 555 proporcionan una fluorescencia brillante bajo la 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 la fibra.

Material de la pared celular vegetal de acuerdo con la invención, incluyendo fibras de algodón posee típicamente 35 quito-oligosacáridos en una concentración de al menos 0,1 µg/mg de material de la pared celular, o al menos 1 µg/mg de material de la pared celular, o al menos 5 µg/mg de material de la pared celular.

Dondequiera que los métodos de la invención están dirigidos a la introducción de un gen quimérico en una célula vegetal, resultará claro que estos métodos también se pueden aplicar en casos en los que la célula vegetal se incorpora en una planta madura. P. ej., células transgénicas se pueden regenerar en plantas transgénicas de acuerdo con métodos establecidos.

40 Métodos para transformar células vegetales y plantas son bien conocidos en la técnica. Métodos para transformar plantas de algodón también son bien conocidos en la técnica. La transformación de algodón mediada por Agrobacterium se ha descrito, p. ej., en la patente de EE.UU. 5.004.863 o en la patente de EE.UU. 6.483.013 y la transformación de algodón por bombardeo de partículas se reseña, p. ej., en el documento WO 92/15675.

Los genes quiméricos se pueden introducir mediante transformación en plantas de algodón a partir de las cuales se 45 puede derivar el callo embriogénico 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-CI, Acala B1644, Acala B1654-26, Acala B1654-43, Acala B3991, Acala GC356, Acala GC510, Acala GAM1, Acala CI, Acala Royale, Acala Maxxa, Acala Prema, Acala B638, Acala B1810, Acala B2724, Acala B4894, Acala B5002, no Acala "picker" Siokra, variedad "stripper" FC2017, Coker 315, STONEVILLE 506, STONEVILLE 825, DP50, DP61, DP90, DP77, DES119, McN235, 50 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 55 derivados de los mismos.

"Algodón", tal como se utiliza en esta memoria, incluye *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* y *Gossypium herbaceum* o la progenie de cruces entre estas especies.

Los métodos y medios de la presente invención se pueden emplear también para otras especies de plantas tales como el cáñamo, yute, lino y plantas leñosas, incluyendo, pero no limitado a *Pinus spp.*, *Populus spp.*, *Picea spp.*, *Eucalyptus spp.* etc.

La planta transformada obtenida puede utilizarse en un esquema de reproducción convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir el gen quimérico de acuerdo con la invención en otras variedades de la misma especie o de especies de plantas relacionadas o en plantas híbridas. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas contienen los genes quiméricos de la invención como una inserción genómica estable y también están abarcados por la invención.

Colorantes reactivos que se pueden utilizar en relación con el método de teñir fibras de algodón, hilo o tejido comprenden Rojo Reactivo 120 (RR120), Amarillo Reactivo 176 (RY176), Azul Levafix CA, Naranja Reactivo 35, Negro Reactivo 5, Rojo Reactivo 116. La tinción se puede hacer también con colorantes ácidos tales como Naranja Ácido 7, Azul Ácido 62, Azul Ácido 281, Rojo Ácido 361, Azul Ácido 277, Rojo Ácido 4, Azul Ácido 113, Amarillo Ácido 137, Azul Ácido 127:1 y Azul Ácido 193. Estos colorantes se aplican de acuerdo con protocolos bien conocidos en la técnica.

Tal como se usa en esta memoria "que comprende" debe interpretarse como especificar la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados a que se refiere, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Así, p. ej., un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir, estar embebidos en un ácido nucleico o proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una región de ADN, que se define funcional o estructuralmente, puede comprender regiones de ADN adicionales, etc.

Las células de plantas transgénicas y plantas obtenidas por los métodos descritos en esta memoria también pueden utilizarse adicionalmente en subsiguientes procesos de transformación, p. ej., para introducir un gen quimérico adicional.

Las plantas de algodón o semillas que comprenden el gen quimérico descrito en esta memoria o las obtenidas por los métodos descritos en esta memoria pueden, además, tratarse con herbicidas de algodón tales como diurón, fluometurón, MSMA, oxifluorfen, prometrina, trifluralina, carfentrazona, cletodim, fluazifop-butilo, glifosato, norflurazon, pendimetalina, piritiobac sódico, trifloxisulfurona, tepraloxidim, glufosinato, flumioxazina, tidiazurón; insecticidas del algodón tales como acefato, aldicarb, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, abamectina, acetamiprid, emamectina benzoato, imidacloprid, indoxacarb, lambda-cihalotrina, spinosad, tiodicarb, gamma-cihalotrina, spiromesifen, piridilil, flonicamid, flubendiamida, triflumuron, rynaxypyr, beta-ciflutrina, spirotetramat, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, dinetofuran, flubendiamida, cyazypyr, spinosad, spinotoram, gamma-cihalotrina, 4-[[[(6-cloropiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furano-2(5H)-ona, tiodicarb, avermectina, flonicamid, piridilil, spiromesifen, sulfoxaflor; y fungicidas del algodón tales como azoxistrobina, bixafen, boscalid, carbendazim, clorotalonil, cobre, ciproconazol, difenoconazol, dimoxistrobina, epoxiconazol, fenamidona, fluazinam, flupiram, fluxastrobina, fluxapiraxad, iprodiona, isopirazam, isotianil, mancozeb, maneb, metominostrobina, pentiopirad, picoxistrobina, propineb, protioconazol, piraclostrobina, quintoceno, tebuconazol, tetraconazol, tiofanato-metilo, trifloxistrobina. Para un tratamiento con herbicidas del algodón, dichas plantas o semillas del algodón preferiblemente comprenden, además, un rasgo que confiere una tolerancia respectiva a los herbicidas o son naturalmente tolerantes a dicho herbicida.

Los siguientes Ejemplos no limitativos describen los métodos para alterar las paredes celulares vegetales. A menos que se establezca otra cosa en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándares tal como se describe en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, 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. Materiales y métodos estándares para el trabajo molecular de plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

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

SEQ ID NO 1: proteína de nodulación C de *Azorhizobium caulinodans*

SEQ ID NO 2: proteína de nodulación C de *Bradyrhizobium japonicum*

SEQ ID NO 3: proteína de nodulación C de *Rhizobium galegae*

SEQ ID NO 4: proteína de nodulación C de *Rhizobium leguminosarum* (biovar *viciae*)

SEQ ID NO 5: proteína de nodulación C de *Rhizobium meliloti*

SEQ ID NO 6: proteína de nodulación C de *Rhizobium tropici*

SEQ ID NO 7: proteína de nodulación C de *Rhizobium leguminosarum* (biovar *phaseoli*)

SEQ ID NO 8: proteína de nodulación C de *Rhizobium sp.* Cepa N33

5 SEQ ID NO 9: proteína de nodulación C de *Rhizobium loti*

SEQ ID NO 10: ADN-T de pTJN6

SEQ ID NO 11: Secuencia de aminoácidos de NODC enlazada a la secuencia de anclaje señal de Golgi.

10 SEQ ID NO 12: secuencia de ácido nucleico de un ADN-T que comprende un gen quimérico que comprende el promotor selectivo de fibras F286 enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica NODC, que comprende, además, una secuencia que fija como objetivo Golgi (= pTDBI146)

SEQ ID NO 13: secuencia de ácido nucleico de un ADN-T que comprende un gen quimérico que comprende el promotor Gluc1A enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica NODC que comprende adicionalmente una secuencia que fija como objetivo Golgi (= pTDBI158)

15 SEQ ID NO 14: secuencia de ácido nucleico de un ADN-T que comprende un gen quimérico que comprende el promotor Gluc1D enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica NODC que comprende adicionalmente una secuencia que fija como objetivo Golgi (= pTDBI159)

SEQ ID NO 15: secuencia de ácido nucleico de un ADN-T que comprende un gen quimérico que comprende el promotor de expansina enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica NODC que comprende adicionalmente una secuencia que fija como objetivo Golgi (= pTDBI165)

20 SEQ ID NO 16: secuencia de ácido nucleico de un ADN-T que comprende un gen quimérico que comprende el promotor E6 enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica NODC que comprende adicionalmente una secuencia que fija como objetivo Golgi (= pTGK96)

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1: Construcción de genes expresables en plantas quiméricos que codifican una proteína N-acetilglucosamina transferasa fusionada a una secuencia de anclaje señal de Golgi.

Utilizando técnicas estándares de ADN recombinante, se construyó un gen quimérico NODC expresable en plantas que contiene los siguientes fragmentos de ADN enlazados operativamente:

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

35 El gen quimérico se introdujo entre los límites de ADN-T de un vector de ADN-T junto con un gen *bar* quimérico que proporciona resistencia a fosfotricina. El vector de ADN-T resultante se denominó pTJN 6. La secuencia del ADN-T de este vector se proporciona en SEQ ID NO 10.

40 El vector de ADN-T pTJN6 se introdujo en la cepa de *Agrobacterium C58C1RIF* (pEHA101) (Hood et al (1986) J. Bact 168: 1291) que se utilizó para transformar *Arabidopsis thaliana* mediante el método de inmersión floral (Clough SJ y Bent AF (1998) Plant J. 16: 735-743).

Ejemplo 2: Análisis de la longitud de las raíces de plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

Plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje y plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con pTJN6 (NODC con secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga) y pTGK42 (NODC sin secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga; véase el documento WO2006/136351) se esterilizaron con gas y se extendieron en medio de sal basal 45 0.5x Murashige y Skoog (MS) que incluía vitaminas modificadas (Sigma) y 20 g/l de glucosa. Después de embeber durante 2 días a 4°C, las placas se colocaron verticalmente en una cámara de crecimiento con un régimen de día/noche de 16 h de luz a 21°C durante un período de 9 días. Las placas fueron digitalizadas en un escáner de alta evaluación comparativa y se realizaron mediciones en ImageJ. Los datos fueron exportados a Microsoft Excel para su análisis. Se midió la longitud de la raíz y se comparó con la de las plantas de tipo salvaje. La Figura 3A muestra 50 que, mientras que la longitud de la raíz de las plantas transformadas con pTGK42 es aproximadamente 25% más corta que la de tipo salvaje, no existe diferencia significativa alguna en la longitud de la raíz entre las plantas de tipo salvaje y las transgénicas que comprenden pTJN6. La Figura B muestra que, para diferentes líneas transgénicas que comprenden pTJN6, no hay ninguna diferencia significativa en la longitud de la raíz entre las plantas de tipo salvaje y las transgénicas.

Ejemplo 3: Caracterización de los oligómeros de GlcNAc en las paredes celulares de las plantas transgénicas de Arabidopsis.

Los oligómeros de GlcNAc en plantas transgénicas de Arabidopsis transformadas con pTJN6 se analizaron utilizando una combinación de derivatización, cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas según se describe en Rozaklis et al. (2002, Clinical Chemistry 48: 131-139). En síntesis, muestras de hojas (20-150 mg) se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron en tubos Eppendorf de 2 ml utilizando un molinillo. Se añadieron 0,5 ml de MeOH al 80% y los tubos se agitaron en vórtice y se centrifugaron en una centrifuga de mesa pre-enfriada (5 min 14000 rpm). El sobrenadante se transfirió a un tubo reciente de 2 ml y se liofilizó en un speed vac. El sedimento se resuspendió en 100 μ l de MeOH que contenía PMP 0,5 M y 100 μ l de NH_3 800 mM. La mezcla de reacción se incubó a 70°C en un Thermomixer (Eppendorf) durante 9 min a 850 rpm. Después de esta etapa de incubación, la mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de 200 μ l de ácido fórmico 800 mM y se completó hasta 500 μ l con agua. Después de 3 extracciones de cloroformo subsiguientes utilizando 0,5 ml de cloroformo, las muestras se liofilizaron y se resuspendieron en 200 μ l de agua. Las muestras se analizaron en una columna Acquity UPLC BEH C18 (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.) (1,7 μ m, 150 mm x 2,1 mm) utilizando un Espectrómetro de Masas Finnigan Mat LCQ. Las fases móviles estaban compuestas de (A) agua que contenía 1% de ACN y acetato de amonio al 0,1% y (B) ACN que contenía 1% de agua y acetato de amonio al 0,1%. La temperatura de la columna se mantuvo a 55°C y la temperatura del automuestreador a 10°C. Se aplicó un caudal de 300 μ l/min durante la inicialización de la elución de gradiente. Las condiciones eran como sigue: en el tiempo de 0 min 20% (B), el tiempo de 10 min 25% (B) y el tiempo de 14 min 100% (B). La MS completa y los espectros MS/MS de los compuestos eluyentes se obtuvieron con ionización por electroproyección (ESI) hecha funcionar en modo positivo. GlcNAc derivatizado tiene un valor m/z de 552 en modo positivo, y el área total del pico fue considerado como la mejor estrategia para la cuantificación. Oligómeros de GlcNAc fueron detectados por MS/MS, en donde sólo se seleccionaron los compuestos específicos con un valor m/z específico para una mayor fragmentación. El pico 552 o el pico 755, que corresponde al monómero o dímero derivatizado, respectivamente, se utilizaron para la cuantificación. Estos niveles se compararon con los de las plantas de Arabidopsis transformadas con pTGK42 (documento WO2006/136351) y plantas de Arabidopsis de tipo salvaje. La Tabla 1 muestra que, en presencia de la secuencia de anclaje señal de Golgi, la cantidad de GlcNAc2 era hasta 65 veces mayor, y la de GlcNAc3 era hasta 35 veces mayor que en ausencia de la secuencia de anclaje señal de Golgi.

Tabla 1. Cantidades relativas de los oligómeros de N-acetilglucosamina GlcNAc2 y GlcNAc3 en hojas de plantas de Arabidopsis transformadas con pTJN6 (NODC con secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga) y con pTGK42 (NODC sin secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga; véase el documento WO2006/136351).

Construcción	GlcNAc2		GlcNAc3	
	pico zona 552	Media	pico zona 552	Media
WT	3,78E+04	5,41E+04 \pm 2,31E+04	-	-
WT	7,04E+04		-	
pTGK4210	3,07E+06	2,39E+06 \pm 0,97E+06	9,22E+05	6,70E+05 \pm 3,56E+05
pTGK4210	1,70E+06		4,18E+05	
pTGK4228	2,83E+06	1,82E+06 \pm 1,44E+06	1,04E+06	6,16E+05 \pm 6,00E+05
pTGK4228	8,00E+05		1,91E+05	
pTJN6-4	5,20E+04	3,28E+05 \pm 3,90E+05	1,51E+04	5,13E+04 \pm 5,12E+04
pTJN6-4	6,04E+05		8,75E+04	
pTJN6-14	1,67E+05	1,42E+05 \pm 0,35E+05	2,99E+04	2,64E+04 \pm 0,50E+04
pTJN6-14	1,17E+05		2,28E+04	
pTJN6-23	1,23E+08	1,36E+08 \pm 0,18E+07	2,17E+07	2,24E+07 \pm 0,09E+07
pTJN6-23	1,49E+08		2,30E+07	
pTJN6-26	1,35E+05	1,18E+05 \pm 0,25E+05	-	-
pTJN6-26	1,00E+05		-	

ES 2 548 166 T3

Construcción	GlcNAc2		GlcNAc3	
	pico zona 552	Media	pico zona 552	Media
WT	1,77E+05	1,77E+05	-	-
pTGK4210	4,57E+06	4,57E+06	8,78E+05	8,78E+05
pTJN6-23 (1)	1,43E+07	3,00E+07 ± 0,81E+07	3,63E+06	8,15E+06 ± 6,39E+06
pTJN6-23 (1)	4,57E+07		1,27E+07	
pTJN6-23 (2)	5,39E+07	4,87E+07 ± 0,74E+07	1,40E+07	1,30E+07 ± 0,14E+07
pTJN6-23 (2)	4,35E+07		1,21E+07	

5 Dado que las raíces de las plantas que contienen la secuencia de anclaje señal NODC Golgi tienen la misma longitud que las de las plantas de tipo salvaje, mientras que las de las plantas que contienen NODC sin secuencia de anclaje señal de Golgi eran significativamente más cortas que las de tipo salvaje, se investigó si los oligómeros de GlcNAc2 y GlcNAc3 estaban presentes en raíces de plantas de Arabidopsis que comprenden NODC sin secuencia de anclaje señal de Golgi (pTGK42) y con secuencia de anclaje señal de Golgi (pTJN6) utilizando métodos como los descritos anteriormente para las hojas.

10 La Tabla 2 muestra que las raíces de las plantas pTJN6 contienen oligonucleótidos GlcNAc2 y GlcNAc3 en niveles más altos que en las raíces de las plantas pTG42. Los niveles de GlcNAc2 y GlcNAc3 en las raíces son significativamente más altos que en las hojas. La presencia de oligos de GlcNAc en las raíces de las plantas de tipo salvaje se debe presumiblemente a la contaminación con material radicular de las plantas pTGK42 y plantas pTJN6. Estos resultados muestran que la restauración de la longitud de la raíz a niveles de tipo salvaje mediante la adición de la secuencia de anclaje señal de Golgi a NODC no es debido a la falta de acumulación de oligos GlcNAc en las raíces.

15 Tabla 2a. Cantidades relativas del oligómero de GlcNAc2 de N-acetilglucosamina en raíces y hojas de plantas de Arabidopsis transformadas con pTJN6 (NODC con la secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga) y con pTGK42 (NODC sin secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga; véase el documento WO2006/136351) expresadas por mg de tejido.

Construcción	Raíces		Hojas	
	pico zona 552	Media	pico zona 552	media
WT	1,72E+06	1,48E+06 ± 0,31E+06	7,53E+04	8,41E+04 ± 2,63E+04
WT	1,58E+06		5,26E+04	
WT	1,12E+06		9,40E+04	
WT	-		1,14E+05	
pTGK4210	5,63E+06	5,27E+06 ± 0,51E+06	3,81E+05	3,90E+05 ± 0,13E+05
pTGK4210	4,92E+06		4,00E+05	
pTGK4228	8,61E+06	6,80E+06 ± 2,56E+06	8,69E+05	8,11E+05 ± 0,83E+05
pTGK4228	4,98E+06		7,52E+05	
pTJN6-23	2,71E+07	1,74E+07 ± 0,66E+07	3,00E+06	2,97E+06 ± 0,18E+06
pTJN6-23	1,49E+07		2,70E+06	

Construcción	Raíces		Hojas	
	pico zona 552	Media	pico zona 552	media
pTJN6-23	1,26E+07		3,08E+06	
pTJN6-23	1,50E+07		3,09E+06	

Tabla 2b. Cantidades relativas del oligómero de GlcNAc3 de N-acetilglucosamina en raíces y hojas de plantas de Arabidopsis transformadas con pTJN6 (NODC con secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga) y con pTGK42 (NODC sin secuencia de anclaje señal de Golgi heteróloga; véase el documento WO2006/136351) expresadas por mg de tejido.

5

Construcción	Raíces		Hojas	
	pico zona 552	Media	pico zona 552	media
WT	3,62E+03	2,33E+03 ± 1,83E+03	-	-
WT	1,03E+03		-	
WT	-		-	
WT	-		-	
pTGK4210	3,13E+05	2,59E+05 ± 0,75E+05	1,69E+04	2,21E+04 ± 0,73E+04
pTGK4210	2,06E+05		2,73E+04	
pTGK4228	4,80E+05	3,47E+05 ± 1,88E+05	5,34E+04	4,31E+04 ± 1,44E+04
pTGK4228	2,14E+05		3,29E+04	
pTJN6-23	1,45E+06	9,57E+05 ± 3,36E+05	2,09E+05	2,20E+05 ± 0,16E+05
pTJN6-23	8,69E+05		2,12E+05	
pTJN6-23	7,06E+05		2,43E+05	
pTJN6-23	8,01E+05		2,16E+05	

Ejemplo 4: Caracterización de oligómeros de GlcNAc con un grado de polimerización de hasta 5 en las paredes celulares de plantas transgénicas de Arabidopsis.

10 Para detectar oligómeros de GlcNAc con un grado de polimerización de hasta 5 en plantas de Arabidopsis transformadas con pTJN6 en comparación con plantas de Arabidopsis de tipo salvaje, se realizó una derivatización de PMP. El análisis LC-MS se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.) conectado a un espectrómetro de masas SYNAPT HDMS Q-ToF (Micromass, Manchester, Reino Unido). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Acquity BEH C18 (2,1 mm x 150 mm, 1,7 µm) (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.), utilizando una elución con gradiente. Las fases móviles estaban compuestas de (A) agua que contiene 1% de ACN y ácido fórmico al 0,1% y (B) ACN que contenía 1% de agua y ácido fórmico al 0,1%.

15 La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C y la temperatura del automuestreador a 10°C. Se aplicó un caudal de 350 µl/min durante la elución con gradiente de inicialización en el tiempo de 0 min 5% (B), tiempo de 30 min 50% (B), tiempo de 33 min 100% (B). El eluyente fue dirigido al espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización por electroproyección y la interfaz LockSpray para medición de la masa exacta. Los parámetros de la

20 fuente MS fueron los siguientes: tensión capilar 1,5 kV, cono de muestreo 40 V, cono de extracción 4 V, temperatura de la fuente 120°C, temperatura de desolvatación 350°C, flujo de gas del cono 50L/h, gas de desolvatación 550L/h. La energía de colisión para la célula de la trampa y la transferencia se fijó en 6 y 4 V, respectivamente. Para la adquisición de datos se activó el modo de mejora del intervalo dinámico. Los datos de la exploración completa se registraron en modo centroide V negativo, el intervalo de masas se fijó entre m/z 100-1600 con una velocidad de

25 barrido de 0,2 s/barrido utilizando el software Masslynx (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). Leu-encefalina (400 pg/µl solubilizados en agua/ACN (1:1, v/v) acidificados con ácido fórmico al 0,1%) se utilizó para la calibración de la masa de bloqueo mediante el barrido cada 10 segundos con un tiempo de exploración de 0,5 segundos, se promediaron 3 barridos. Para los fines de MS/MS, se aplicaron los mismos ajustes, excepto que la energía de

colisión de la trampa se elevó de 10 a 45 V. Todos los disolventes utilizados fueron de calidad ULC/MS (Biosolve, Valkenswaard, Países Bajos), el agua fue producida por un sistema de purificación de agua DirectQ-UV (Millipore S.A.S., Molsheim, Francia). La Figura 4 muestra que las plantas que expresan pTJN6-23 contienen monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de GlcNAc.

- 5 Ejemplo 5: Expresión específica para fibras de NODC fusionada a una secuencia de anclaje señal de Golgi en algodón.

Plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen NODC quimérico fusionado a una secuencia de anclaje señal de Golgi como se esboza en el Ejemplo 1, bajo el control del promotor selectivo de fibras F286 (que se describe en el documento US2003/106097) (= pTDBI146), el promotor Gluc1A (= pTDBI158) y Gluc1D (= pTDBI159) (documento WO 2008/083969), el promotor E6 (documento US6096950) (= pTGK96) o con el promotor de expansina (documento US6566586) (= pTDBI165), se generaron utilizando el método de transformación como se describe en el documento US6483013. Se aislaron y se analizaron para polímeros de N-acetilglucosamina mediante HPLC fibras de estas plantas de algodón transgénicas. Estas fibras transgénicas contenían hasta 0,5% de glucosamina que sólo podía detectarse tras hidrólisis del TFA, demostrando que es parte de un polímero. Fibras de líneas no transformadas contenían menos de 0,01% de GlcN. La presencia de quitobiosa se demostró en la fibra de una de las líneas transformadas con pTDBI158. La quitobiosa no se detectó en la fibra de líneas no transformadas. Líneas seleccionadas con altos niveles de oligómeros de N-acetilo fueron cultivadas en el campo y se seleccionaron líneas que crecen normales y forman cápsulas normales. La fibra de estas líneas se utiliza para producir hilos y tejidos con una reactividad mejorada, tales como una capacidad de tinción mejorada. Fibras aisladas de las cápsulas de algodón de plantas transgénicas tienen una cantidad incrementada de polímeros N-acetilglucosamina que se distribuyen uniformemente a lo largo de la pared celular.

Ejemplo 6: Fibras de algodón con reactividad incrementada.

Se generaron, tal como se describe en el Ejemplo 5, plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen quimérico NODC fusionado a una secuencia de anclaje señal de Golgi enlazado operativamente a un promotor específico de fibras. De estas plantas se cosechan fibras de algodón maduras y se pueden teñir con Rojo Congo o se pueden hacer reaccionar con WGA-Alexa fluor 555. Además, las fibras de algodón maduras resultantes se pueden teñir con colorantes comerciales, incluidos los colorantes reactivos del algodón (p. ej., Rojo Reactivo 120, Azul Levafix CA), colorantes ácidos (Naranja Ácido 7, Azul Ácido 281) y colorantes reactivos con la lana (p. ej., Rojo Reactivo 116, Ámbar Realan EHF).

- 30 Tinción con WGA-Alexa 555

Las fibras de algodón no necesitan ser deshidratadas o permeabilizadas. En cambio, los lípidos y ceras se separan mediante el tratamiento de las fibras por 3 veces durante 10 minutos en una mezcla de cloroformo:metanol (1:1), seguido por dos veces con un tratamiento de 10 minutos en acetona y dos veces de 5 minutos en éter. Las fibras se dejaron secar al aire.

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

Las fibras se colocan en disolución de bloqueo (NaCl 150 mM, tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,4; Tween 20 al 0,1% y albúmina de suero bovino al 1%) y se incuban durante una hora. Después de ello, el tampón se reemplaza por el mismo tampón que contenía WGA-fluorocromo y se incubó durante 4 h. La disolución de WGA-fluorocromo se reemplaza por disolución de bloqueo, se lava durante 10 minutos, seguido de lavado por 3 veces durante 10 min con disolución de bloqueo sin BSA y lavado por 2 veces durante 5 min con disolución de bloqueo sin BSA y sin Tween. Las fibras teñidas se montan en un portaobjetos de microscopio y se evalúan por medio de microscopía de fluorescencia (Axioplan 2 (Zeiss, Jena, Alemania) utilizando Filterset 38 (excitación: BP470/40; emisión: BP525/50) para conjugado de Alexa fluor 488 o Filterset 20 (excitación: BP546/12; emisión: BP575-640) para Alexa fluor 555 o conjugado de tetrametilrodamina. Considerando que no se puede detectar fluorescencia específica en fibras de algodón procedentes de plantas de algodón no transgénicas, es detectable una fluorescencia brillante en las fibras de algodón procedentes de plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen quimérico NODC fusionado a una secuencia de anclaje señal de Golgi. Secciones microscópicas virtuales de las fibras de algodón demuestran que el WGA-fluor555 se distribuye uniformemente a través de la pared celular secundaria de las células de fibras de algodón.

- 50 Para preparar para la tinción, la fibra se trató durante 30 min a 80°C con agua destilada que contiene 1 g/l de carbonato sódico y 1 g/l de Sandozin NIN (detergente no iónico), seguido de secado. La fibra se tiñó utilizando una relación de líquido/fibras de 50:1 con 2% de Azul Ácido 62 durante 60 min a 98°C. Después de la tinción, las muestras de fibra se enjuagaron con agua fría y se secaron en condiciones ambientales. El agotamiento se determinó midiendo la concentración del baño de colorante antes y después de la tinción utilizando un espectrofotómetro.

ES 2 548 166 T3

Como puede verse en el ejemplo de una línea de algodón transformada con el vector pTDBI158 de ADN-T, fibra teñida con Azul Ácido 62 de acuerdo con el protocolo anterior muestra un nivel de agotamiento incrementado.

	transgen	% agotamiento a pH 4	% agotamiento a pH 7
G4GH396-35101 HH	gfa-nodc	23,9	18,7
G4GH396-35101 wt	ninguno	16,3	13,0

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Bioscience N. V.
 Meulewaeter, Frank
 Vanholme, Baret

5 <120> Métodos para alterar la reactividad de las paredes celulares vegetales
 <130> BCS10-2016
 <160> 16
 <170> PatenIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 397
 <212> PRT
 <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

Leu Asp Gln Asn Lys Gly Lys Arg Ala Ala Gln Met Glu Ala Ile Arg
 115 120 125

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

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

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

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

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

Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Ile Thr Pro Leu Leu Ala Glu

ES 2 548 166 T3

210 215 220

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

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

Val Pro Gly Ala Val Ala Arg Thr Leu Val Pro Asp Gly Leu Ala Pro
 260 265 270

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

Ala Leu Ala Leu Arg Ile Lys Lys Asn Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Phe
 290 295 300

Glu Ile Cys Ala Gln Asn Leu Gly Thr Ala Leu Leu Val Met Thr
 305 310 315 320

Met Ile Ser Leu Ser Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gln Thr Pro Val Ile
 325 330 335

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Bradyrhizobium japonicum

5

<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

ES 2 548 166 T3

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

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

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

ES 2 548 166 T3

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

Pro Thr Glu Glu Gly Lys Gln Pro Val Ile Leu His Pro Asn Ala Gly
405 410 415

Arg Ser Pro Ala Gly Val Gly Gly Arg Leu Leu Leu Phe Val Arg Arg
420 425 430

Arg Tyr Arg Ser Leu His Arg Ala Trp Arg Arg Arg Arg Val Phe Pro
435 440 445

Val Ala Ile Val Arg Leu Ser Thr Asn Lys Trp Ser Ala Asp Asp Ser
450 455 460

Gly Arg Lys Pro Ser Val Ile Arg Ala Arg Val Gly Cys Arg Arg Pro
465 470 475 480

Val Ala Pro Arg His
485

<210> 3

<211> 433

<212> PRT

5 <213> Rhizobium galegae

<400> 3

Met Thr Leu Leu Glu Thr Ile Gly Ile Ala Ala Val Thr Leu His Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ala Ile Tyr Lys Ser Met Gln Ala Phe Tyr Ala Arg Lys
20 25 30

Ala Ser Gly Ser Gln Pro Arg Ser Lys Asp Ile Asp Pro Ala Ala Leu
35 40 45

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

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

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

Leu Pro Val His Asp Phe Tyr Thr Ser Asp Pro Arg Phe Glu Phe Leu
100 105 110

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

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

Ile Ala Ser Asp Val Val Thr Leu Leu Val Glu Lys Met Arg Asp Ser

ES 2 548 166 T3

<210> 4
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Rhizobium leguminosarum

5 <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

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

ES 2 548 166 T3

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 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

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

ES 2 548 166 T3

100					105					110					
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		
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

ES 2 548 166 T3

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

<213> Rhizobium tropici

<400> 6

5

ES 2 548 166 T3

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
 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

ES 2 548 166 T3

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
 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
 < 213> Rhizobium leguminosarum
 <400> 7

5

ES 2 548 166 T3

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

ES 2 548 166 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

<213> Rhizobium sp.

5

<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

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

ES 2 548 166 T3

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

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
 < 213> Rhizobium loti

ES 2 548 166 T3

<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

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

ES 2 548 166 T3

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

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

5

<210> 10
 < 211> 3971
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> ADN-T de pTJN6

10

<220>
 < 221> característica miscelánea
 < 222> (1)..(25)
 < 223> Límite izquierdo de ADN-T (complemento)

15

<220>
 < 221> terminador
 < 222> (56)..(316)
 < 223> 3' nos: 3'UTR del gen nopalina sintasa ADN-T pTiT37 (complemento)

20

<220>
 < 221> característica miscelánea
 < 222> (336)..(887)
 <223> bar: secuencia codificante de fosfinotricina acetil transferasa de Streptomyces hygroscopicus (complemento)

<220>
 < 221> promotor
 < 222> (888)..(1720)

ES 2 548 166 T3

- < 223> P35S3: Región del promotor del gen CaMV35S (complemento)
- <220>
< 221> promotor
5 < 222> (1769)..(2303)
< 223> P35S2: Región del promotor del gen CaMV35S
- <220>
< 221> 5'UTR
10 < 222> (2304)..(2368)
< 223> 5'cab22L: secuencia líder no traducida del gen cab22L de Petunia
- <220>
< 221> característica miscelánea
15 < 222> (2369)..(2474)
< 223> XylT: secuencia codificante para 35 aminoácidos N-terminales de beta-1,2-xilosiltransferasa de Arabidopsis thaliana
- <220>
< 221> característica miscelánea
20 < 222> (2475)..(3664)
< 223> región codificante de Node de A.caulinodans
- <220>
< 221> terminador
25 < 222> (3666)..(3914)
< 223> 3'35s: región no traducida 3' del gen CaMV35S
- <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (3947)..(3971)
< 223> RB: límite derecho de ADN-T (sintético) (complemento)
<400> 10

ES 2 548 166 T3

cggcaggata tattcaattg taaatggctc catggcgatc gctctagagg atctgcgatc 60
 tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa tttatcctag tttgcgcgct atattttggt 120
 ttctatcgcg tattaatgt ataattgcgg gactctaadc ataaaaacc atctcataaa 180
 taacgcatg cattacatgt taattattac atgcttaacg taattcaaca gaaattatat 240
 gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt caatcttaag aaactttatt gccaaatggt 300
 tgaacgatct gcttcggatc ctagaacgcg tgatctcaga tctcgggtgac 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 ccgctggtgg 600
 cggggggaga cgtacacggt cgactcggcc gtccagtcgt aggcgttgcy tgccttccag 660
 gggcccgcgt aggcgatgcc ggcgacctc cgtccacct cggcgacgag ccagggatag 720
 cgctcccga gacggacgag gtcgtccgct cactcctgcy gttcctgcyg ctcggtacgg 780
 aagttgaccg tgcttgtctc gatgtagtgg ttgacgatgg tgcagaccgc cggcatgtcc 840
 gcctcgggtg cacggcggat gtcggccggg cgtcgttctg ggtccatggt tatagagaga 900
 gagatagatt tatagagaga gactggtgat ttcagcgtgt cctctccaaa tgaatgaac 960
 ttccttatat agaggaaggg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcytca tcccttacgt 1020
 cagtggagat gtcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaaac tcttctttt 1080
 ccacgatgct cctcgtgggt ggggtccat cttgggacc actgtcggca gaggcacctt 1140
 gaatgatagc cttccttta tcgcaatgat ggcatttcta ggagccacct tccttttcta 1200
 ctgtcctttc gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgaaa 1260
 ttatcctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgacat 1320

ES 2 548 166 T3

ttttggagta gaccagagtg tcgtgctcca ccatggtgac gaagatthtc ttcttgatcat	1380
tgagtcgtaa aagactctgt atgaactggt cgccagtctt cacggcgagt tctgttagat	1440
cctcgatttg aatcttagac tccatgcatg gccttagatt cagtaggaac tacctthtta	1500
gagactccaa tctctattac ttgccttggg ttatgaagca agccttgaat cgtccatact	1560
ggaatagtag ttctgatctt gagaaatag tctthctctg tgttcttgat gcaattagtc	1620
ctgaatctth tgactgcatc thtaaccttc ttgggaaggg atthgatctc ctggagattg	1680
ttactcgggt agatcgtctt gatgagacct gctgctagg aacgcggccg ctgtacaggg	1740
cccgggcata tggcgcgcca tatgcacct acatggagtc aaaaattcag atcgaggatc	1800
taacagaact cgcctgtag actggcgaac agthcataca gagtctthta cgactcaatg	1860
acaagaagaa aatctthctg aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata	1920
tcaaagatac agthctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ththcaacaa agggtaatat	1980
cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctthcatcaa aggacagtag	2040
aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc atthcgataa aggaaaggct atcgtthcaag	2100
atgccctgc cgacagtggg cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa	2160
aagaagacgt tccaaccacg tctthcaagc aagthggattg atthgatatc tccactgacg	2220
taagggatga cgcacaatcc cactatctth cgcaagacct thctctata taaggagth	2280
cattthcatt ggagaggact cgagctcatt tctctattac thcagccata acaaaagaa	2340
tctthctct tctthataa ccaaaacct gagthaaacg aatccgaaga thctgaagat	2400
ththctgtat atthtacttc tcaactctct ctthctcatc atctactthg ththctactc	2460
atcgtcgtth tcaagthctg tagatthgat cggththgct gcgactgacg cctacgthgac	2520
gthggcgagc gcatacaagg thgtccagth cattaacgth tgcgagcgtaa cggatthctgc	2580
thgtctcgtaa agthgatctt thccgctcac tccaagggtt gacgthctg thccgacatt	2640
caatgagaac tccagcacat thctcagthg cgtcgtctct atatgctcac aagactaccg	2700
cggaccaata acgattthct thgttagacg thgggtcgacc acaaaacat cattthcagc	2760
agthtgcgac aagthacgca gcgacgaaag gthctattht gthcgaactth atcaaaacaa	2820
ggggaagcgc gccgcgcaaa thgagggcat caggagaaca gacggagacc thgacthaaa	2880
cgtagactcg gacacgthta tagataagga thgtthtaca aagctthgct cgtccatgag	2940
agccccgaat gthcggthgth tcatggggca gthcgtthca aagaatcgag aaagatctth	3000
gctthaccaga thaatcgata thgagthctg gctthcgtth aacgaggagc gattthcgc	3060
gthcaggtth ggctccgthg thgtthgthg thggccgthg gccatgthata gaagatctgc	3120
aattacgcca ctattgthg aatathgacg ccagacattc ctagggcgth cgagcaactth	3180
thgtgaggat cgccatctca caatctgth gthgaaggcg gthattthgga ccgggtacgth	3240
cccaggthgc gthagcagga cgtthgthcc gthgggctg gcgccgthacc thcgcagca	3300
actccgctgg gcccgacga ctthctcga caccgccctc gcctthcgt thaaagaaaa	3360
tthaagcaaa thatacctt thgagatag cgcacagaat thgggtacgg ctctctact	3420
thgtgthgacc atgattthcgc ththcgtgac thcatcagg thcgaacgc ccgthctcat	3480
tctgggtgth gthgtgggga thgtcthataa aagatththg thctgthgcc ththagcgaa	3540

ES 2 548 166 T3

```

agattttcgg tttctatact tcatcgttca ctcagcgttg aatgttctaa ttttaacgcc      3600
gtaaaaactc tatgccctgt taaccattcg ggatagtcgg tggctatcac gcgagagttc      3660
ctaagctagc aagcttggac acgctgaaat caccagtctc tctctacaaa tctatctctc      3720
tctatcttct ccataataat gtgtgagtag ttcccagata agggaattag ggttcctata      3780
gggtttcgcct catgtgttga gcatataaga aacccttagt atgtatttgt atttgtaaaa      3840
tacttctatc aataaaattt ctaattccta aaaccaaact ccagtactaa aatccagatc      3900
atgcatggta cagcggccaa ttgcctgcag gtcgacggcc gagtactggc aggatata      3960
ccgttgtaat t                                     3971

```

5
 <210> 11
 < 211> 431
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Proteína NODC enlazada a la secuencia de anclaje señal de Golgi XylT

10
 <220>
 < 221> SEÑAL
 < 222> (1)..(35)
 < 223> 35 aminoácidos N-terminales de beta-1,2- xilosiltransferasa de Arabidopsis thaliana

15
 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 < 222> (36)..(431)
 < 223> NODC de A.caulinodans

400> 11

ES 2 548 166 T3

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 Ser Val Val Asp Val Ile Gly Leu Leu Ala Thr Ala Ala
 35 40 45

Tyr Val Thr Leu Ala Ser Ala Tyr Lys Val Val Gln Phe Ile Asn Val
 50 55 60

Ser Ser Val Thr Asp Val Ala Gly Leu Glu Ser Asp Ala Leu Pro Leu
 65 70 75 80

Thr Pro Arg Val Asp Val Ile Val Pro Thr Phe Asn Glu Asn Ser Ser
 85 90 95

Thr Leu Leu Glu Cys Val Ala Ser Ile Cys Ala Gln Asp Tyr Arg Gly
 100 105 110

Pro Ile Thr Ile Val Val Val Asp Asp Gly Ser Thr Asn Lys Thr Ser
 115 120 125

Phe His Ala Val Cys Asp Lys Tyr Ala Ser Asp Glu Arg Phe Ile Phe
 130 135 140

ES 2 548 166 T3

Val Glu Leu Asp Gln Asn Lys Gly Lys Arg Ala Ala Gln Met Glu Ala
 145 150 155 160

Ile Arg Arg Thr Asp Gly Asp Leu Ile Leu Asn Val Asp Ser Asp Thr
 165 170 175

Val Ile Asp Lys Asp Val Val Thr Lys Leu Ala Ser Ser Met Arg Ala
 180 185 190

Pro Asn Val Gly Gly Val Met Gly Gln Leu Val Ala Lys Asn Arg Glu
 195 200 205

Arg Ser Trp Leu Thr Arg Leu Ile Asp Met Glu Tyr Trp Leu Ala Cys
 210 215 220

Asn Glu Glu Arg Ile Ala Gln Ser Arg Phe Gly Ser Val Met Cys Cys
 225 230 235 240

Cys Gly Pro Cys Ala Met Tyr Arg Arg Ser Ala Ile Thr Pro Leu Leu
 245 250 255

Ala Glu Tyr Glu His Gln Thr Phe Leu Gly Arg Pro Ser Asn Phe Gly
 260 265 270

Glu Asp Arg His Leu Thr Ile Leu Met Leu Lys Ala Gly Phe Arg Thr
 275 280 285

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

Ala Pro Tyr Leu Arg Gln Gln Leu Arg Trp Ala Arg Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Asp Thr Ala Leu Ala Leu Arg Ile Lys Lys Asn Leu Ser Lys Tyr Ile
 325 330 335

Thr Phe Glu Ile Cys Ala Gln Asn Leu Gly Thr Ala Leu Leu Leu Val
 340 345 350

Met Thr Met Ile Ser Leu Ser Leu Thr Thr Ser Gly Ser Gln Thr Pro
 355 360 365

Val Ile Ile Leu Gly Val Val Val Gly Met Ser Ile Ile Arg Cys Cys
 370 375 380

Ser Val Ala Leu Ile Ala Lys Asp Phe Arg Phe Leu Tyr Phe Ile Val
 385 390 395 400

His Ser Ala Leu Asn Val Leu Ile Leu Thr Pro Leu Lys Leu Tyr Ala
 405 410 415

Leu Leu Thr Ile Arg Asp Ser Arg Trp Leu Ser Arg Glu Ser Ser
 420 425 430

<210> 12
 < 211> 8491
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> ADN-T que comprende ácidos nucleicos que codifican el promotor F286, un péptido de retención de Golgi y una proteína NODC
- 5 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (1)..(25)
< 223> repetición del límite derecho del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)
- 10 <220>
< 221> promotor
< 222> (75)..(1484)
< 223> secuencia que incluye la región del promotor del gen quitinasa F286 de *Gossypium hirsutum* (algodón) (Haigler et al., 2004)
- 15 <220>
< 221> sig_péptido
< 222> (1485)..(1589)
- 20 <220>
< 221> gen
< 222> (1590)..(2778)
- 20 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (2781)..(3013)
< 223> secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon et al., 1991)
- 25 <220>
< 221> promotor
< 222> (3036)..(4451)
< 223> secuencia que incluye la región de promotor del gen F286 de quitinasa de *Gossypium hirsutum* (algodón) (Haigler et al., 2004)
- 30 <220>
< 221> gen
< 222> (4452)..(6281)
<223> región codificante del gen glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de *Escherichia coli* (Frohberg y Essigmann, 2006)
- 35 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (6282)..(6555)
< 223> secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker et al., 1982)
- 40 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (6598)..(6631)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- 45 <220>
< 221> promotor
< 222> (6632)..(7468)
< 223> P35S3: secuencia que incluye la región del promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., 1985)

ES 2 548 166 T3

- 5 <220>
< 221> gen
< 222> (7469)..(8020)
< 223> bar: la secuencia codificante del gen fosfinotricina acetiltransferasa de Streptomyces hygroscopicus (Thompson et al., 1987).
- 10 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (8021)..(8304)
< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker et al., 1982)
- 15 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (8305)..(8338)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- 20 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (8467)..(8491)
< 223> repetición del límite izquierdo del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988)
- <400> 12

ES 2 548 166 T3

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gctacgtacc 60
tgcagggcgg ccgccaacct ctcgagctgc catattgggt ttttactac ccacctcttc 120
attaatgta tcttcaacct ctcaactcct ttcaccacca gacgaatctt ctttagcaaa 180
atcaaaatga ccttatgaaa atttagcacg tccacctcca gattcaaagg ctgtgaatcc 240
ccaacttcgg aaattgttca tctccacatt caagaataat gagttcctca atttgtttta 300
actgattagc cgatattaag cgagttagac tccatggaaa taaaatcacc ctaataaata 360
gcaacgcttt tgaacgtctc taggttccaa gcgtgctaag gagcgccagt aacttcaatc 420
caagttgtgc gaaaacgtat gaaatggaac tgagaccagc gttcaacatc gatgaaaatt 480
tgttttaaca atgagaactg caaatcctcc atagtcttct aacatttcaa cattcgaaat 540
ctcgaaaaga aattggcttg atatgattta tttagggtgt taattttatg tattataata 600
atgcacaaat tgatatttta tgcacacat ttaatatatt taaagtatat aatatcaaat 660
cattttatga aaataaaaat accaaataat acataaattg atagttcaag tatttcatta 720
aaaattttca aaatataaat atcatattga aacattttat aaaagaatag ataccaaata 780
tgacatcatc cctgtttgag agtaaccaa cactgttttc atccagccca tgagaagtat 840
ttggcccaaa agcaaaagt tccagtacaat gaattatgaa tccccaaaaa accccaagtg 900
gtccaggtcc aagccagtct agggctgagg aaagaaatgg aaaaattgaa aagtaattcc 960
agggctctgat tcaattttat taaatttagt ttgattttgg tttcggttca taaatttaa 1020
aataatttta aaatgttata taaaactggt ttttaaaaat aaattaatca ataactaaa 1080
acgataaaaa tggcgatttg aattaagctc atattttgaa aaaaaataa aaattatctc 1140
atccagaact gattaaaacc gaaccgatga atcctagaag ccaagccaag tgtgcagagt 1200
aagaatagaa catcaacatt ttgctttaag cttttcgttg cttgcactct aagaagcata 1260
aaacgcaagc aaaacttgac actagtgtga gtgtgagtgc ccatcattca tcaacctga 1320
aaatcgccct tcccctaac agttctaacc tcactttcta acactttcac tgcagcactc 1380
aaaaacattc gccgaatctt tactataaac tcccagtgtt ggtttctcca ctccaaacc 1440
aaaccacgac caccacattt tgcttcgtat ctttgatata tatcatgagt aaacggaatc 1500
cgaagattct gaagattttt ctgtatatgt tacttctcaa ctctctctt ctcacatct 1560
acttcgtttt tcactcatcg tcgttttcaa gtgtcgtaga tgtgatcggg ttgcttgcca 1620

ES 2 548 166 T3

ctgcagccta cgtgacgttg gcgagcgcac acaagggtgg ccagttcatt aacgtgtcga 1680
 gcgtaacgga tgtcgtgttg ctcgaaagt atgctttgcc gctcactcca agggttgacg 1740
 ttatcgtgcc gacattcaat gagaactcca gcacattgct cgagtgcgtc gcttctatat 1800
 gcgcacaaga ctaccgcgga ccaataacga ttgtcgtggt agacgatggg tcgaccaaca 1860
 aacatcatt tcacgcagta tgcgacaagt acgcgagcga cgaaagggtc atatttgtcg 1920
 aacttgatca aaacaagggg aagcgcgccc cgcaaatgga ggccatcagg agaacagacg 1980
 gagacctgat actaaacgta gactcggaca cggttataga taaggatggt gttacaaagc 2040
 ttgcgtcgtc catgagagcc ccgaatgtcg gtgggtgcat ggggcagctc gttgcaaaga 2100
 atcgagaaag atcttgctt accagattaa tcgatatgga gtactggctt gcgtgtaacg 2160
 aggagcgcac tgcgcagtcg aggtttggct ccgtgatgtg ttggttggg cctgtgcgcca 2220
 tgtatagaag atctgcaatt acgccactat tggcagaata tgagcaccag acattcctag 2280
 ggcgtccgag caactttggt gaggatcgcc atctcacaat cctgatgctg aaggcgggat 2340
 ttcggaccgg gtacgtccca ggtgccgtag cgaggacgtt ggttccggat gggctggcgc 2400
 cgtacctgcy ccagcaactc cgtgggccc gcagcactta tcgcgacacc gccctgcct 2460
 tacgtataaa gaaaaatcta agcaaatata tcaccttga gatatgcgca cagaatttgg 2520
 gtacggctct ctacttgtg atgacatga tttcgtttc gctgactaca tcagggtcgc 2580
 aaacgcccgt tatcattctg ggtgtcgttg tgggatgtc tataataaga tgtgttctg 2640
 tcgcccttat agcgaagat tttcgtttc tatacttcat cgttactca gcgttgaatg 2700
 ttctaattt aacgccgta aaactctat ccctgttaac cattcgggat agtcgggtgc 2760
 tatcacgcga gatttctaa gctagcaagc ttggacacgc tgaaatcacc agtctctctc 2820
 tacaatcta tctctctcta ttttctccat aataatgtg gagtagttcc cagataaggg 2880
 aattagggtt cctatagggt ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc cttagtatgt 2940
 atttgtattt gtaaaatact tctatcaata aaatttctaa ttctaaaac caaaatccag 3000
 tactaaaatc cagacgcgtt taattaagcg gccgccaacc tctcgagctg ccatattggg 3060
 tttttacta cccacctctt cattaatgt atcttcaacc tctcaactcc tttcaccacc 3120
 agacgaatct tctttagcaa aatcaaatg accttatgaa aatttagcac gtccacctcc 3180
 agattcaaag gctgtgaatc cccaacttcg gaaattgttc atctccacat tcaagaataa 3240
 tgagttcctc aatttgtttt aactgattag ccgatattaa gcgagttaga ctccatggaa 3300
 ataaaatcac cctaataaat agcaacgctt ttgaacgtct ctaggttcca agcgtgctaa 3360
 ggagcgcag taacttcaat ccaagtgtg cgaaaacgta tgaaatggaa ctgagaccag 3420
 cgttcaacat cgatgaaaat ttgttttaac aatgagaact gcaaatcctc catagtcttc 3480
 taacatttca acattcgaaa tctcgaaaag aaattggctt gatatgattt atttaggggtg 3540
 ttaattttat gtattataat aatgcacaaa ttgatatttt atgcatcaca tttaatattt 3600
 ttaaagtata taatatcaaa tcattttatg aaaataaaaa taccaataa tacataaatt 3660
 gatagttcaa gtatttcatt aaaaattttc aaaatataaa tatcatattg aaacatttta 3720
 taaaagaata gataccaaat atgacatcat cccctgttga gagtaaccaa aactgtttt 3780
 catccagccc atgagaagta tttggcccaa aagcaaaagt ttcagtacaa tgaattatga 3840

ES 2 548 166 T3

atcccaaaaa	aaccccaagt	ggtccaggtc	caagccagtc	tagggctgag	gaaagaaatg	3900
gaaaaattga	aaagtaattc	cagggctctga	ttcaatttta	ttaaatttag	tttgattttg	3960
gtttcggttc	ataaatttaa	aaataatfff	aaaatgttat	ataaaactgt	tttttaaaaa	4020
taaattaatc	aataatctaa	aacgataaaa	atggcgattt	gaattaagct	catattttga	4080
aaaaaaaata	aaaattatct	catccagaac	tgattaaaac	cgaaccgatg	aatcctagaa	4140
gccaagccaa	gtgtgcagag	taagaataga	acatcaacat	tttgctttaa	gcttttcggt	4200
gcttgactc	taagaagcat	aaaacgcaag	caaaacttga	cactagtgtg	agtgtgagtg	4260
cccacattc	atcaaccctg	aaaatcgccc	ttcccctaat	cagttctaac	ctcactttct	4320
aacactttca	ctgcagcact	caaaaacatt	cgccgaatct	ttactataaa	ctcccagtgt	4380
tggtttctcc	actccaaacc	caaaccacga	ccaccacatt	ttgcttcgta	tctttgatat	4440
ctaggctctc	catgtgcgga	attgtttggtg	ctatcgccca	aagagacggt	gctgagattt	4500
tgtagaggg	tctgcgaagg	ctagagtata	gaggatatga	ctccgctggt	ctggctgtcg	4560
ttgatgctga	gggtcatatg	acaaggctaa	gaaggtagg	aaaggttcag	atgcttgctc	4620
aggcagctga	ggaacatcca	ttgcatggag	gtactggtat	tgcacatacc	agggtggcta	4680
ctcatgggga	gccatcagaa	gttaatgctc	atccacatgt	gagtgagcat	atcgttgtag	4740
ttcacaatgg	gataattgaa	aaccacgaac	cattgagggg	agagttaaag	gcaagaggat	4800
atacttttgt	gagtgagact	gacactgagg	ttattgcaca	tttagtgaac	tgggaaactca	4860
aacagggggg	cacattgcgt	gaggctgtgt	taagagctat	tcctcaactt	agagggtgcat	4920
acggtactgt	tattatggat	tcaagacacc	cagatactct	ccttgagct	agatcaggta	4980
gtcccttggt	cataggactt	ggaatgggtg	aaaatfftat	cgctagcgac	caattggcct	5040
tattgccagt	tacaagacga	tttattttcc	ttgaagaggg	cgatattgct	gagattacta	5100
gaaggctctgt	gaacatcttt	gataagactg	gcgctgaggt	taaacgtcag	gatatcgagt	5160
ctaaccttca	atacgatgct	ggtgataaag	gaatttacag	gcattatatg	caaaaggaaa	5220
tttatgaaca	accaaagtct	atcaaaaaca	cacttactgg	ccgtatttct	catggacagg	5280
tcgatttaag	cgagcttggt	cctaattgcag	acgaaactgct	atcaaaagtt	gagcacatac	5340
agatactggc	atgcggaact	agttataatt	caggaatggt	gtctagatac	tggttcgaaa	5400
gcttggcagg	tataccttgt	gatgtagaga	tcgcttctga	gtttagggtat	agaaagtctg	5460
ctgtgcgtag	aaattcatta	atgattacat	tatctcaatc	cggagaaaaca	gcagatacac	5520
tggttgatt	gaggctttct	aaggaactcg	gatatctggg	ttcacttgct	atttghtaatg	5580
taccaggttc	ctcattgggt	cgtgaatcag	atctagcact	tatgacaaat	gcaggaactg	5640
aaataggtgt	ggcaagtacc	aaggctttca	caaccaact	gaccgtactt	ttaatgttgg	5700
tagcaaaact	cagtcgatta	aaggggctag	atgcatctat	cgaacatgat	attgttcacg	5760
ggcttcaagc	tctcccttca	agaattgaac	aatgctttc	acaagataag	agaatagagg	5820
cattggctga	agatffffcc	gacaaacatc	acgcattggt	tcttggacgt	ggcgatcaat	5880
atccaattgc	attggaagga	gctttgaagt	tgaaagaaat	aagttacatt	cacgcagaag	5940
catatgcagc	tggaagaactc	aagcatggtc	ctttggcact	catcgacgct	gacatgcccg	6000
tgatcgtagt	ggctcctaat	aacgaaactgc	tcgaaaagct	taaatcaaat	atcgaagagg	6060

ES 2 548 166 T3

ttcgagctag aggaggctag ctttacgttt tcgctgaaca agatgctgga ttcgtgtcaa 6120
 gcgataatat gcatataatt gaaatgcctc acgttgaaga agtgattgca cctatatttt 6180
 atacagctcc attgcaactt cttagcttacc atgttgcaact tattaagga actgatgttg 6240
 atcagcctag aaacctagca aaatctgtaa cagtcgaata aacgcgtggc gcgccgaagc 6300
 agatcgttca aacatttggc aataaagttt cttagattg aatcctgttg ccggtcctgc 6360
 gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg 6420
 catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata 6480
 cgcatagaaa acaaaaatag agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc 6540
 tatgttacta gatcgggaatt cgatatcatt accctgttat ccctaaagct tattaatata 6600
 acttcgtata gcatacatta tacgaagtta tgtttcctac gcagcaggtc tcatcaagac 6660
 gatctaccgc agtaacaatc tccaggagat caaatcctt cccaagaagg ttaaagatgc 6720
 agtcaaaaga ttcaggacta attgcatcaa gaacacagag aaagacatat ttctcaagat 6780
 cagaagtact attccagatg ggacgattca aggcttgctt cataaaccaa ggcaagtaat 6840
 agagattgga gtctctaaaa aggtagtctc tactgaatct aaggccatgc atggagtcta 6900
 agattcaaat cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga 6960
 gtcttttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag cacgacactc 7020
 tggcttactc caaaaatgtc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct attgagactt 7080
 ttcaacaaag gataatttcg ggaacctcc tcggattcca ttgcccagct atctgtcact 7140
 tcatcgaaa gacagtagaa aaggaaggtg gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag 7200
 gaaaggctat cattcaagat gcctctgccg acagtggctc caaagatgga cccccacca 7260
 cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat 7320
 gtgacatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt 7380
 cctctatata aggaagtcca tttcatttgg agaggacacg ctgaaatcac cagtctctct 7440
 ctataaatct atctctctct ctatacaat ggaccagaa cgacgcccgg ccgacatccg 7500
 ccgtgccacc gaggcggaca tgccggcggg ctgcaccatc gtcaaccact acatcgagac 7560
 aagcacggtc aacttccgta ccgagccgca ggaaccgag gagtggacgg acgacctcgt 7620
 ccgtctgcgg gagcgtatc cctggctcgt cgccgaggtg gacggcgagg tcgccggcat 7680
 cgctacgcg gggccctgga aggcacgcaa cgctacgac tggacggccg agtcgaccgt 7740
 gtacgtctcc ccccgcacc agcggacggg actgggtctc acgctctaca cccacctgct 7800
 gaagtccctg gaggcacagg gcttcaagag cgtggtcgtg gtcacgggc tgcccaacga 7860
 cccgagcgtg cgcatgcacg aggcgctcgg atatgcccc cgcgcatgc tgcgggcggc 7920
 cggcttcaag cacgggaact ggcattgacgt gggtttctgg cagctggact tcagcctgcc 7980
 ggtaccgccc cgtccggtcc tgcccgtcac cgagatctga gatcaccctg tctaggatcc 8040
 gaagcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt 8100
 cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgta agcatgtaat aattaacatg 8160
 taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt 8220
 taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg 8280
 tcatctatgt tactagatcg aaacataact tcgtatagca tacattatac gaagtatca 8340
 aaacgtcgtg agacagtttg gttactata acggtcctaa ggtagcgatc gaggcattac 8400
 ggcattacgg cactcgcgag ggtccgaatc tatgtcgggt gcggagaaaag aggtaatgaa 8460
 atggcaattt acaattgaat atatcctgcc g 8491

- <210> 13
 < 211> 9567
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> ADN-T que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican el promotor gluc1A, un péptido de retención de Golgi y una proteína NODC
- 10 <220>
 < 221> característica miscelánea
 < 222> (1)..(25)
 < 223> repetición del límite derecho del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)
- 15 <220>
 < 221> promotor
 < 222> (26)..(2025)
 < 223> secuencia que incluye la región del promotor del gen beta-1,3-endoglucanasa del subgenoma A de *Gossypium hirsutum* (algodón) (Engelen y Arioli, 2008)
- 20 <220>
 < 221> sig_péptido
 < 222> (2026)..(2130)
- 25 <220>
 < 221> gen
 < 222> (2131)..(3321)
- 30 <220>
 < 221> 3'UTR
 < 222> (3322)..(3554)
 < 223> secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon et al., 1991)
- 35 <220>
 < 221> promotor
 < 222> (3555)..(3527)
 < 223> Pgluc1(A1.9): secuencia que incluye la región del promotor del gen beta-1,3-endoglucanasa gluc1A del subgenoma A de *Gossypium hirsutum* (algodón) (Engelen y Arioli, 2008)
- 40 <220>
 < 221> gen
 < 222> (5528)..(7357)
 < 223> gfaEc-1Pb: región codificante del gen glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de *Escherichia coli* (Frohberg y Essigmann, 2006)
- 45 <220>
 < 221> 3'UTR
 < 222> (7358)..(7631)
 < 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker et al., 1982)
- 50 <220>
 < 221> característica miscelánea
 < 222> (7674)..(7707)
 < 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- 55 <220>
 < 221> promotor

ES 2 548 166 T3

< 222> (7708)..(8544)

< 223> P35S3: secuencia que incluye la región del promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., 1985)

5

<220>

< 221> gen

< 222> (8545)..(9096)

< 223> bar: la secuencia codificante del gen fosfinotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987).

10

<220>

< 221> 3'UTR

< 222> (9097)..(9380)

< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTIT37 (Depicker et al., 1982)

15

<220>

< 221> característica miscelánea

< 222> (9381)..(9414)

< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)

20

<220>

< 221> característica miscelánea

< 222> (9543)..(9567)

< 223> repetición del límite izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)

<400> 13

ES 2 548 166 T3

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gctacgtacc	60
tgcagggcgg ccgcgattat ataaataggg ggcgaatcta gggagctggc atgacccta	120
aaatagaatt ttctatittg acctatcaaa atttttaaaa ttttaaatta gtaaaggtaa	180
atitgtactt taacctctta aaatgataaa attttacttt aatcctttaa aatttacatt	240
tttactatca taaaattac aatttgattt taccctaata attttttct agcttagccc	300
tgtatataaa tatattattt ataattttta tatttaaaat ataaagtttt taattatata	360
aataattaaa atctgatatt taaaactaaa gtaatttctt ttttctttt actttttttt	420
aattgcaaca taatggttta aatatctata taacgtatga agtaatttga tataaatttt	480
atitaaattt attattatat aaattcattt agtaaaaact tttaatagaa tcaaaatttt	540
tatttgtaaa ttcgataact tttcttatca agtatatttg tgagaaccaa atatttagta	600
aaattaatat tcttattttt aaatatgata aatcttataa aaaaatattt aaaatgaaaa	660
aaattgtaca aatattataa aaaaatattt aaaatgaaaa acattgtaca aaggctatat	720
aagaagtcca aaagtctctt cgaccatgta ctcttataga gattatagat agattataaa	780
actatatgta gtttctctta acttttaaat aagaggataa atgtatttta atgtactcaa	840
acttatatat ttttatattg acaataatat caatatcaac ctaattaaga ttcattctaa	900
cattaatggt gaagattttt aataaaagaa aaggtaata aattaattag aacacaaaca	960
aacacaaatt taagtgggat gtaaggctct tgacccaaag gaaaaatttg ttacgtcgat	1020
taaattataa attaatitaa agtaaaatta cattttaacc taaaaaaga gaaaagtata	1080
tctaatttct tcgaaaatgg aaagaaaatt ataaatttat ggcatttcta aaaaaattct	1140
gaattcgcta ctaaaagatg aaattataaa atccgaagca ttaccagaag atggatcacc	1200
aatcacaaa caatcaatga aaagtaatga taattaattg aaagtgagca tttaatittg	1260

ES 2 548 166 T3

atagccatat acttcctgct gaatttatag gttctcatta atgcaattaa attatattcg 1320
 acaccttttg aatgaaataa aatgacacaa gaggaaagac ggttcatcta tttttcttt 1380
 caatcgccca tcaaaatacc aaaaatgtaa ctacatgcaa aaaatcaaat atgaaaaata 1440
 ttcataTTTT gatattttaa tatattgtgt gttcaaaacg taaatgtatt gaaaaattat 1500
 gatggtgttg ttgctgatg tccataaaat tcaatgtact cacatttattc aaatgtatac 1560
 tttgagagaa gttattttga taatactcaa gtttttttta tagatgggaa aattttttaa 1620
 attatttttt gattttgatg aaatgtatat ataaatttta attcgataca tataaatata 1680
 tatgtaaatt ttaaatttaa atttaataat atacaattaa gaaaataatt tacataaata 1740
 tataccttaa taaaaataaa attagaaaga ggaaatgtca aaacctcttc attatataca 1800
 aatatgatgg gacacgatac cctcatgcat tgatatctca tgttgtccaa aaactcggaa 1860
 tcctttttga aaaaaactt ccagagagag tatataaatc cagcagtagg cacaagaaac 1920
 gagcaccagt tattgacttt cttttgtaa aaaaaaaag tgctgagatc aagaaatata 1980
 gtgaaatag ggtccaagat tttctgggtt ttaaatctaa gcacatgag taaacggaat 2040
 ccgaagattc tgaagatttt tctgtatatg ttacttctca acttctcttt tctcatcctc 2100
 tacttctgtt tctactcctc gtcgttttca agtgctgtag atgtgatcgg tttgcttgcg 2160
 actgcagcct acgtgacgtt ggcgagcgca tacaaggtagg tccagttcat taactgtctg 2220
 agcgtaacgg atgtcgtggt tctcgaagt gatgctttgc cgctcactcc aagggttgac 2280
 gttatcgtgc cgacattcaa tgagaactcc agcacattgc tcgagtgcgt cgcttctata 2340
 tgcgcacaag actaccgagg accaataacg attgtcgtgg tagacgatgg gtcgaccaac 2400
 aaaacatcat ttacgcagt atgcgacaag tacgcgagcg acgaaagggt catatttctc 2460
 gaacttgatc aaaaacaggg gaagcgcgcc gcgcaaatgg aggccatcag gagaacagac 2520
 ggagacctga tactaaacgt agactcggac acggttatag ataaggatgt tgttacaag 2580
 cttgcgtcgt ccatgagagc cccgaatgtc ggtggtgtca tggggcagct cgttgcaaag 2640
 aatcgagaaa gatcttggct taccagatta atcgatatgg agtactggct tgcgtgtaac 2700
 gaggagcgca ttgcgcagt gaggtttggc tccgtgatgt gttgttggg gccgtgcgcc 2760
 atgtatagaa gatctgcaat tacgccacta ttggcagaat atgagcacca gacattccta 2820
 gggcgtccga gcaactttgg tgaggatcgc catctcaaa tcctgatgct gaaggcggga 2880
 tttcggaccg ggtacgtccc aggtgccgta gcgaggacgt tggttccgga tgggctggcg 2940
 ccgtacctgc gccagcaact ccgctgggcc cgcagcactt atcgcgacac cgccctcgcc 3000
 ttacgtataa agaaaaatct aagcaaatat atcacctttg agatatgccc acagaatttg 3060
 ggtacggctc tcttacttgt gatgaccatg atttcgcttt cgctgactac atcagggctc 3120
 caaacgcccc ttatcattct ggggtgtcgt gtggggatgt ctataataag atgttgttct 3180
 gtcgccctta tagcgaaga ttttcggtt ctatacttca tcgttctctc agcgttgaat 3240
 gttctaattt taacgccgtt aaaactctat gccctgttaa ccattcggga tagtcggtag 3300
 ctatcacgcg agagtcccta agctagcaag cttggacacg ctgaaatcac cagtctctct 3360
 ctacaaatct atctctctct attttctcca taataatgtg tgagtattc ccagataagg 3420
 gaattagggg tcctataggg tttcgtctcat gtgttgagca tataagaaac ccttagtatg 3480

ES 2 548 166 T3

tatttgtatt tgtaaaatac ttctatcaat aaaatttcta attcctaaaa ccaaaatcca 3540
gtactaaaat ccagacgcgt ttaattaagc ggccgcgatt atataaatag ggggcgaatc 3600
tagggagctg gcatgacccc taaaatagaa ttttctattt tgacctatca aaatttttaa 3660
aaattttaa tagtaaaggt aaatttgtac tttaacctct taaaatgata aaattttact 3720
ttaatccttt aaaatttaca tttttactat cataaaaatt acaatttgat tttacccta 3780
aaattttttt ctagcttagc cctgtatata aatataattt ttataatttt tatattttaa 3840
atataaagtt ttaattata caaataatta aaatctgata tttaaaacta aagtaatttc 3900
tttttcttt ttactttttt ttaattgcaa cataatggtt taaatatcta tataacgfat 3960
gaagtaatt gatataaatt ttattttaat ttattattat ataaattcat ttagtaaaaa 4020
cttttaatag aatcaaaatt tttatttga aattcgataa cttttcttat caagtatatt 4080
tgtgagaacc aaatatttag taaaattaat attcttattt ataaatatga taaatcttat 4140
aaaaaatat ttaaatgaa aaaattgta caaatattat aaaaaaatat ttaaatgaa 4200
aaacattgta caaaggctat ataagaagtt caaaagtttc ttcgaccatg tactcttata 4260
gagattatag atagattata aaactatag tagtttctct taacttttaa ataagaggat 4320
aaatgtattt taatgtactc aaacttatat atttttatat tgacaataat atcaatatca 4380
acctaattaa gattcattct aacattaatg ttgaagattt ttaataaaag aaaaggttaa 4440
taaattaatt agaacacaaa caaacacaaa ttaagtggg atgtaagggtc cttgacccaa 4500
aggaaaaatt tgttacgtcg attaaattat aaattaattt aaagtaaaat tacattttaa 4560
cctaaaaaaa gagaaaagta tatctaattt cttcgaaaat ggaagaaaa ttataaattt 4620
atggcatttc taaaaaatt ctgaattcgc tactaaaaga tgaaattata aaatccgaag 4680
cattaccaga agatggatca ccaaatcaca aacaatcaat gaaagtaat gataattaat 4740
tgaaagtgag catttaattt tgatagccat atacttctct ctgaatttat aggttctcat 4800
taatgcaatt aaattatatt cgacacctt tgaatgaaat aaaatgacac aagaggaaag 4860
acggttcac tatttttct tcaatcgcc catcaaaata ccaaaatgt aactacatgc 4920
aaaaaatcaa atatgaaaa tattcatatt ttgatatttt aatataattg gtgttcaaaa 4980
cgtaaatgta ttgaaaatt atgatggtgt tgttgctgta tgtccataaa attcaatgta 5040
ctcacattta tcaaatgtat actttgagag aagttatttt gataatactc aagtttttt 5100
tatagatggg aaaatttttt aaattatttt ttgattttga tgaaatgtat atataaattt 5160
taattcgata catataaata tatatgtaa ttttaaattt aaatttaata atatacaatt 5220
aagaaaataa tttacataaa tatatatcct aataaaaata aaattagaaa gaggaatgt 5280
caaacctct tcattatata caaatatgat gggacacgat accctcatgc attgatatct 5340
catgttgc aaaaactcg aatccttttt gaaaaaaaaac ttccagagag agtatataaa 5400
tccagcagta ggcacaagaa acgagcacca gttattgact ttcctttgta aaaaaaaaaa 5460
agtgtgaga tcaagaaata tagtgaata tgggtccaag attttctggg tttttaatct 5520
aagcaccatg tgcggaattg ttggtgctat cgcccaaaga gacgttctg agattttgtt 5580
agagggtctg cgaaggctag agtatagagg atatgactcc gctggtctg ctgtcgttga 5640
tgctgagggt catatgacaa ggctaagaag gttaggaag gttcagatgc ttgctcaggc 5700

ES 2 548 166 T3

agctgaggaa catccattgc atggaggtagc tggatttgca cataccaggt gggctactca 5760
 tggggagcca tcagaagtta atgctcatcc acatgtgagt gagcatatcg ttgtagttca 5820
 caatgggata attgaaaacc acgaaccatt gagggagag ttaaaggcaa gaggatatac 5880
 ttttgtgagt gagactgaca ctgaggttat tgcacattta gtgaactggg aactcaaaca 5940
 ggggggcaca ttgcgtgagg ctgtgttaag agctattcct caacttagag gtgcatacgg 6000
 tactgttatt atggattcaa gacaccaga tactctcctt gcagctagat caggtagtcc 6060
 cttggtcata ggacttgaa tgggtgaaaa ttttatcgct agcgaccaat tggccttatt 6120
 gccagttaca agacgattta ttttcctga agagggcgat attgctgaga ttactagaag 6180
 gtctgtgaac atctttgata agactggcgc tgagggttaa cgtcaggata tcgagtctaa 6240
 ccttcaatac gatgctggtg ataaaggaat ttacaggcat tatatgcaaa aggaaattta 6300
 tgaacaacca aatgctatca aaaacacact tactggcgt atttctcatg gacaggtcga 6360
 ttaagcgag cttggtccta atgcagacga actgctatca aaagttgagc acatacagat 6420
 actggcatgc ggaactagt ataattcagg aatgggtct agatactggg tcgaaagctt 6480
 ggcaggtata cttgtgatg tagagatcgc ttctgagttt aggtatagaa agtctgctgt 6540
 gcgtagaat tcattaatga ttacattatc tcaatccgga gaaacagcag atacactggc 6600
 tggattgagg ctttctaagg aactcggata tctgggttca cttgctattt gtaatgtacc 6660
 aggttcctca ttggttcgtg aatcagatct agcacttatg acaaatgcag gaactgaaat 6720
 aggtgtggca agtaccagg ctttcacaac ccaactgacc gtacttttaa tgttggtagc 6780
 aaaactcagt cgattaaagg ggctagatgc atctatcgaa catgatattg ttcacgggct 6840
 tcaagctctc cttcaagaa ttgaacaaat gctttcaca gataagagaa tagaggcatt 6900
 ggctgaagat tttccgaca aacatcacgc attgtttctt ggacgtggcg atcaatatcc 6960
 aattgcattg gaaggagctt tgaagttgaa agaaataagt tacattcacg cagaagcata 7020
 tgcagctgga gaactcaagc atggctcttt ggcactcatc gacgctgaca tgcccgtgat 7080
 cgtagtggct cctaataacg aactgctcga aaagcttaa tcaaatatcg aagaggttcg 7140
 agctagagga ggtcagcttt acgttttcgc tgaacaagat gctggattcg tgtcaagcga 7200
 taatatgcat ataattgaaa tgcctcacgt tgaagaagt attgcaccta tttttatac 7260
 agtcccattg caacttctag ctaccatgt tgcacttatt aaaggaactg atgttgatca 7320
 gcctgaaac ctagcaaat ctgtaacagt cgaataaacg cgtggcgcgc cgaagcagat 7380
 cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcatg 7440
 attatcatat aatttctggt gaattacggt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg 7500
 acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgcg 7560
 atagaaaaca aaatatagcg cgcaactag gataaattat cgcgcgcggg gtcattatg 7620
 ttactagatc ggaattcgat atcattacc tgttatccct aaagcttatt aatataactt 7680
 cgtatagcat acattatacg aagttatggt tcctacgcag caggctctcat caagacgatc 7740
 taccgagta acaatctcca ggagatcaaa taccttcca agaaggtaa agatgcagtc 7800
 aaaagattca ggactaattg catcaagaac acagagaaag acatatttct caagatcaga 7860
 agtactattc cagtatggac gattcaaggc ttgcttcata aaccaaggca agtaatagag 7920

ES 2 548 166 T3

attggagtct ctaaaaaggt agttcctact gaatctaagg ccatgcatgg agtctaagat 7980
tcaaatcgag gatctaacag aactcgccgt gaagactggc gaacagttca tacagagtct 8040
tttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acactctggt 8100
ctactccaaa aatgtcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca 8160
acaaaggata atttcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat 8220
cgaaaggaca gtagaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa 8280
ggctatcatt caagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa gatggacccc cacccacgag 8340
gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga 8400
catctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc 8460
tatataagga agttcatttc atttggagag gacacgctga aatcaccagt ctctctctat 8520
aaatctatct ctctctctat aacaatggac ccagaacgac gcccgccga catccgccgt 8580
gccaccgagg cggacatgcc ggcggtctgc accatcgtca accactacat cgagacaagc 8640
acgggtcaact tccgtaccga gccgcaggaa ccgcaggagt ggacggacga cctcgtccgt 8700
ctgcgggagc gctatccctg gctcgtcgc gaggtggacg gcgaggtcgc cggcatcgcc 8760
tacgcgggcc cctggaaggc acgcaacgcc tacgactgga cggccgagtc gaccgtgtac 8820
gtctccccc gccaccagcg gacgggactg ggctccacgc tctacacca cctgctgaag 8880
tccctggagg cacagggctt caagagcgtg gtcgctgtca tcgggctgcc caacgacccg 8940
agcgtgcga tgcacgaggc gctcggatat gcccccgcg gcatgctgcg ggcggccggc 9000
ttcaagcacg ggaactggca tgacgtgggt ttctggcagc tggacttcag cctgccggtg 9060
ccgccccgtc cgttcctgcc cgtcaccgag atctgagatc acccgttcta ggatccgaag 9120
cagatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg 9180
cgatgattat catataatct ctggtgaatt acgtaagca tgtaataatt aacatgtaat 9240
gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat 9300
acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat 9360
ctatgttact agatcgaaac ataacttctg atagcataca ttatacgaag ttatcaaac 9420
gtcgtgagac agtttgggta actataacgg tcctaaggta gcgatcgagg cattacggca 9480
ttacggcact cgcgagggtc cgaatctatg tcgggtgcgg agaaagaggt aatgaaatgg 9540
caatttaca ttgaatatat cctgccg 9567

<210> 14
< 211> 9621
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> ADN-T que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican el promotor gluc1D, un péptido de retención de Golgi y una proteína NODC

10

<220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (1)..(25)
< 223> repetición del límite derecho del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988)

<220>

ES 2 548 166 T3

- < 221> promotor
< 222> (26)..(2052)
< 223> secuencia que incluye la región del promotor del gen beta-1,3-endoglucanasa gluc1 del subgenoma D de *Gossypium hirsutum* (algodón) (Engelen y Arioli, 2008)
- 5 <220>
< 221> sig_péptido
< 222> (2053)..(2157)
- 10 <220>
< 221> gen
< 222> (2158)..(3348)
- 15 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (3349)..(3581)
< 223> secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon et al., 1991)
- 20 <220>
< 221> promotor
< 222> (3582)..(5581)
< 223> Pgluc1(D2.0): secuencia que incluye la región del promotor del gen beta-1,3-endoglucanasa gluc1 del subgenoma D de *Gossypium hirsutum* (algodón) (Engelen y Arioli, 2008)
- 25 <220>
< 221> gen
< 222> (5582)..(7411)
< 223> gfaEc-1Pb: región codificante del gen glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de *Escherichia coli* (Frohberg y Essigmann, 2006)
- 30 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (7412)..(7685)
< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTIT37 (Depicker et al., 1982)
- 35 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (7728)..(7761)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- 40 <220>
< 221> promotor
< 222> (7762)..(8598)
< 223> P35S3: secuencia que incluye la región del promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., 1985)
- 45 <220>
< 221> gen
< 222> (8599)..(9150)
< 223> bar: la secuencia codificante del gen fosfinotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987).
- 50 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (9151)..(9434)
< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTIT37 (Depicker et al., 1982)

ES 2 548 166 T3

5 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (9435)..(9468)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)

10 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (9597)..(9621)
< 223> repetición del límite izquierdo del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988)

<400> 14

ES 2 548 166 T3

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gctacgtacc 60
tgcagggcgg ccgcttcgaa cataatgcta ataaaaaatt tcctaatacat tattaataca 120
tttgataaaa ctataaagaa attgatatat tgtaaattaa acttttaact attcaatttt 180
ttcttaatag tcaataaatt aatcataata attcataatt aatatataat taacataacc 240
ataacataga attttttatt ttggcccatt aaaattttta aaattttaaa ttagtaaagg 300
aaaaattaca ctttgacccc ttaaaaatga taaaatttta ttttaatcct ttaaaattga 360
catttttact attgtaaaaa ttacaattta attttgcccc cctaaaaaat ttttctagct 420
tcgcccttgt gtataaatat attaattaca atttttatat ttgaattata taaataatta 480
aattttgata tttaaaacta aagtaatctc tttttttttt actttttttt aattgaaaca 540
taatggttta aatatctata ttacgtatga agtaatttaa tataaatfff attttaattt 600
attattatat aaattcattt agtaaaaact tttaatagaa tcaaaatfff tatttgtaa 660
ttcgataact tttcttatca agtaaatttg ttgaattaaa tatttagtaa aattaatatt 720
tttatttata aatatgataa atcttataaa aaataaaaaa atatttaaaa tgaaaaacat 780
tgtacaaagg ctatataaga agttcaaaag tttcttcgac cctgtactct aatagagatt 840
atagatagat tatagaacta ttcatagttt ctcttaacct ttaaataaga attttagtgt 900
actcaaactt acatattttt atattgataa taatgtcaat accagccgag ttaagattca 960
ctcgacatta atgttgaaaa tttttaataa aagaaaatgt tgataagtta attagaacac 1020
aagcaagcac aaatttaagt ggtaagtaag gtccttgacc ctaatggaaa aattgttatg 1080
ttgattaat tataaattaa ttttaaggtaa aattatattt tgacctaaa aaatgaaaa 1140
aatatatcta gtttcttcga aaatgaaaag aaaataataa attgatacat tataaaatff 1200
atggcatttc taaaaaaatt ctgaatttga tgaaattata ataaaaaaaa agtttaaaaa 1260
catatagatt tcaagaatag tgggaaaatt atatttgaac aacactgaag aaatccaaag 1320
cattagcaga aaatggatca ccaaatcaca aacaatcagt gaaaagtaat gataattaat 1380
tgaaagtgag catttaaatt tgatagccat atacttctg ctgaatttat aggttctcat 1440
taatgcaatt aaattatatt tgtcactttt tgaatgaaat aaatgacaca gttcatctat 1500
ttttttctt tcaatcgccc atcaaaatac cgaaaatgta actacattaa aaaagatcga 1560
aaaatattca tattttgata ttttaataga ttgtgtgttc aaggcgtaat gtactaaaa 1620
attatgatgg tgtgtcgcgt gtatgtccat aaaattcaat gtattcgcg gatcaaatg 1680
taaattttga cacaagttat tctaataata atcaagttat ttttatacat gagatacatc 1740
tcaaaattat ttttatatat ccgaaaaatc ataactgacg atcaaaactag aaagaggag 1800
tgtcaaaacc tattcattat atgcaaatat gatgggacac gataccctca tgcattgata 1860
tctcatattg tccaaaaact cagaatcctt tttgaaaaaa aaaaattcca gagagagtgt 1920
ataaatccag cagtgtgcac aagaaacgag caccagttat tgacattcct ttgtaaaaaa 1980
aaaaagaagc tgagatcaag aaatatagtg aaatatgggt ccaacatttt ctgggttttt 2040

ES 2 548 166 T3

aatctcagca ccatgagtaa acggaatccg aagattctga agatttttct gtatatgtta 2100
cttctcaact ctctctttct catcatctac ttcgtttttc actcatcgtc gttttcaagt 2160
gtcgtagatg tgatcggttt gcttgcgact gcagcctacg tgacgttggc gagcgcatac 2220
aagggtgtcc agttcattaa cgtgtcgagc gtaacggatg tcgctggtct cgaaagtgat 2280
gctttgccgc tcaactcaag ggttgacgtt atcgtgccga cattcaatga gaactccagc 2340
acattgctcg agtgcgtcgc ttctatatgc gcacaagact accgcggacc aataacgatt 2400
gtcgtggtag acgatgggtc gaccaacaaa acatcatttc acgcagtatg cgacaagtac 2460
gcgagcgagc aaaggttcat atttgtcga cttgatcaaa acaaggggaa gcgcgccgcg 2520
caaatggagg ccatcaggag aacagacgga gacctgatac taaacgtaga ctcggacacg 2580
gttatagata aggatgttgt tacaaagctt gcgtcgtcca tgagagcccc gaatgtcggc 2640
ggtgtcatgg ggagcctcgt tgcaaagaat cgagaaagat cttggcttac cagattaatc 2700
gatatggagt actggcttgc gtgtaacgag gagcgcattg cgcagtcgag gtttggctcc 2760
gtgatgtgtt gttgtgggcc gtgcgccatg tatagaagat ctgcaattac gccactattg 2820
gcagaatatg agcaccagac attcctaggg cgtccgagca actttggtga ggatcgccat 2880
ctcacaatcc tgatgctgaa ggcgggattt cggaccgggt acgtcccagg tgccgtagcg 2940
aggacgttgg ttccggatgg gctggcgccg tacctgcgcc agcaactccg ctgggcccgc 3000
agcacttatc gcgacaccgc cctcgcctta cgtataaaga aaaatctaag caaatatatc 3060
acctttgaga tatgcgaca gaatttgggt acggctctct tacttgtgat gaccatgatt 3120
tcgctttcgc tgactacatc agggtcgcaa acgcccgtta tcattctggg tgcgtttgtg 3180
gggatgtcta taataagatg ttgttctgtc gcccttatag cgaaagattt tcggtttcta 3240
tacttcatcg ttcactcagc gttgaatgtt ctaattttaa cgccgttaaa actctatgcc 3300
ctgttaacca ttcgggatag tcggtggcta tcacgcgaga gttcctaagc tagcaagctt 3360
ggacacgctg aaatcaccag tctctctcta caaatctatc tctctctatt ttctccataa 3420
taatgtgtga gtagttccca gataagggaa ttagggttcc tatagggttt cgctcatgtg 3480
ttgagcatat aagaaacctt tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa 3540
atctctaatt cctaaaacca aaatccagta ctaaaatcca gacgcgttta attaagcggc 3600
cgcttcgaac ataatgctaa taaaaaattt cctaatacatt attaaatcat ttgtataaac 3660
tataaagaaa ttgatataat gtaaatataa cttttaacta ttcaattttt tcttaatagt 3720
caataaatta atcataataa ttcataatta atatataatt aacataacca taacatagaa 3780
ttttttattt tggcccatta aaatttttaa aattttaaat tagtaaagga aaaattacac 3840
tttgaccctt taaaatgat aaaattttat ttaatcctt taaaattgac atttttacta 3900
ttgtaaaaat tacaatttaa ttttgcccc ctaaaaaatt tttctagctt cgcccttgtg 3960
tataaatata ttaattacaa tttttatatt tgaattatat aaataattaa attttgatat 4020
ttaaaactaa agtaatctct ttttttttta ctttttttta attgaaacat aatggtttaa 4080
atatctatat tacgtatgaa gtaatttaat ataaatttta ttttaattta ttattatata 4140
aattcattta gtaaaaactt ttaatagaat caaaattttt atttgtaaat tcgataactt 4200
ttcttatcaa gtaaatttgt tgaattaaat atttagtaaa attaatattt ttatttataa 4260

ES 2 548 166 T3

atatgataaa tcttataaaa aataaaaaaa tattttaaatt gaaaaacatt gtacaaaggc 4320
 tatataagaa gttcaaaaagt ttcttcgacc ctgtactcta atagagatta tagatagatt 4380
 atagaacctat tcatagtttc tcttaacctt taaataagaa ttttagtgta ctcaaactta 4440
 catatTTTTa tattgataat aatgtcaata ccagccgagt taagattcac tcgacattaa 4500
 tgttgaaaat ttttaataaa agaaaatggt gataagttaa ttagaacaca agcaagcaca 4560
 aatttaagt gtaagtaagg tccttgaccc taatggaaaa attgttatgt tgattaaatt 4620
 ataaattaat ttaaggtaaa atttatTTTT gacctaaaaa aatgaaaaaa atatatctag 4680
 tttcttcgaa aatgaaaaga aaataataaa ttgatacatt ataaaattta tggcatttct 4740
 aaaaaaattc tgaatttgat gaaattataa taaaaaaaaa gtttaaaaac atatagattt 4800
 caagaatagt gggaaaatta tatttgaaca aactgaaga aatccaaagc attagcagaa 4860
 aatggatcac caaatcaca acaatcagtg aaaagtaatg ataattaatt gaaagtgagc 4920
 atttaaattt gatagccata tacttcctgc tgaatttata ggttctcatt aatgcaatta 4980
 aattatattt gtcacttttt gaatgaaata aatgacacag ttcatctatt tttttcttt 5040
 caatcgccca tcaaaatacc gaaaatgtaa ctacattaaa aaagatcgaa aaatattcat 5100
 attttgatat ttaatatagat tgtgtgttca aggcgtaatg tactaaaaaa ttatgatggt 5160
 gttgtcgctg tatgtccata aaattcaatg tattcgcatg tatcaaatgt aaattttgac 5220
 acaagttatt ctaataataa tcaagttatt tttatacatg agatacatct caaaattatt 5280
 tttatatatc cgaaaaatca taacgtacga tcaaactaga aagaggaggt gtcaaaacct 5340
 attcattata tgcaaatatg atgggacacg ataccctcat gcattgatat ctcatattgt 5400
 ccaaaaactc agaatccttt ttgaaaaaaa aaaattccag agagagtgta taaatccagc 5460
 agtgtgcaca agaaacgagc accagttatt gacattcctt tgtaaaaaaa aaaagaagct 5520
 gagatcaaga aatatagtga aatatgggtc caacattttc tgggttttta atctcagcac 5580
 catgtgcgga attgttgggt ctatcgccca aagagacggt gctgagattt tggtagaggg 5640
 tctcggaagg ctagagtata gaggatatga ctccgctggt ctggctgtcg ttgatgctga 5700
 gggcatatg acaaggctaa gaaggtagg aaaggttcag atgcttgctc aggcagctga 5760
 ggaacatcca ttgcatggag gtactggtat tgcacatacc aggtgggcta ctcatgggga 5820
 gccatcagaa gtaaatgctc atccacatgt gagtgagcat atcgtttagg ttcacaatgg 5880
 gataattgaa aaccacgaac cattgagggg agagttaaag gcaagaggat atacttttgt 5940
 gagtgagact gacactgagg ttattgcaca tttagtgaac tgggaactca aacagggggg 6000
 cacattgctg gaggtgtgt taagagctat tcctcaactt agaggtgcat acggtactgt 6060
 tattatggat tcaagacacc cagatactct ccttgacgct agatcaggta gtcccttgggt 6120
 cataggactt ggaatgggtg aaaattttat cgctagcgac caattggcct tattgccagt 6180
 tacaagacga tttattttcc ttgaagaggg cgatattgct gagattacta gaaggtctgt 6240
 gaacatcttt gataagactg gcgctgaggt taaacgtcag gatatcgagt ctaaccttca 6300
 atacgatgct ggtgataaag gaatttacag gcatttatatg caaaaggaaa tttatgaaca 6360
 accaaatgct atcaaaaaca cacttactgg ccgtatttct catggacagc tcgatttaag 6420
 cgagcttgggt cctaattgcag acgaaactgct atcaaaaagt gagcacatac agatactggc 6480

ES 2 548 166 T3

atgcggaact agttataatt caggaatggt gtctagatac tggttcgaaa gcttggcagg 6540
 tataccttgt gatgtagaga tcgcttctga gtttaggtat agaaagtctg ctgtgcgtag 6600
 aaattcatta atgattacat tatctcaatc cggagaaaca gcagatacac tggctggatt 6660
 gaggctttct aaggaactcg gatatctggg ttcacttgtt atttgtaatg taccaggttc 6720
 ctcatgggtt cgtgaatcag atctagcact tatgacaaat gcaggaactg aaataggtgt 6780
 ggcaagtacc aaggctttca caaccact gaccgtactt ttaatgttg tagcaaaact 6840
 cagtcgatta aaggggctag atgcatctat cgaacatgat attgttcacg ggcttcaagc 6900
 tctcccttca agaattgaac aaatgctttc acaagataag agaatagagg cattggctga 6960
 agatTTTTCC gacaaacatc acgcattggt tcttggacgt ggcgatcaat atccaattgc 7020
 attggaagga gctttgaagt tgaaagaaat aagttacatt cacgcagaag catatgcagc 7080
 tggagaactc aagcatggtc ctttggcact catcgacgct gacatgcccg tgatcgtagt 7140
 ggctccta atcgaactgc tcgaaaagct taaatcaaat atcgaagagg ttcgagctag 7200
 aggaggtcag ctttacgttt tcgctgaaca agatgctgga ttcggtcaa gcgataatat 7260
 gcataataatt gaaatgcctc acgttgaaga agtgattgca cctatatattt atacagtccc 7320
 attgcaactt ctagcttacc atgttgcaact tattaagga actgatgttg atcagcctag 7380
 aaacctagca aaatctgtaa cagtcgaata aacgcgtggc gcgccgaagc agatcgttca 7440
 aacatttggc aataaagttt ctaagattg aatcctgttg ccggtcctgc gatgattatc 7500
 atataatttc tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta 7560
 tttatgagat gggTTTTTat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa 7620
 aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta 7680
 gatcgggaatt cgatatcatt accctgttat ccctaaagct tattaatata acttcgtata 7740
 gcatacatta tacgaagtta tgttctctac gcagcaggtc tcatcaagac gatctaccg 7800
 agtaacaatc tccaggagat caaatacctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaaga 7860
 ttcaggacta attgcatcaa gaacacagag aaagacatat ttctcaagat cagaagtact 7920
 attccagtat ggacgattca aggcttgctt cataaacca ggcaagtaat agagattgga 7980
 gtctctaaaa aggtagtctt tactgaatct aaggccatgc atggagtcta agattcaaat 8040
 cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga gtcttttacg 8100
 actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag cacgacactc tggcttactc 8160
 caaaaatgct aaagatacag tctcagaaga ccaaagggtt attgagactt ttcaacaaag 8220
 gataatctcg ggaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact tcatcgaaag 8280
 gacagtagaa aaggaagggt gtcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat 8340
 cattcaagat gcctctgccg acagtgttcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat 8400
 cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgacatctc 8460
 cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata 8520
 aggaagttca tttcatttgg agaggacacg ctgaaatcac cagtctctct ctataaatct 8580
 atctctctct ctataacaat ggaccagaa cgacgcccg cgcacatccg ccgtgccacc 8640
 gagggcgaca tgccggcggc ctgcaccatc gtcaaccact acatcgagac aagcacggtc 8700

ES 2 548 166 T3

aacttccgta ccgagccgca ggaaccgcag gagtggacgg acgacctcgt ccgtctgcgg 8760
gagcgcctatc cctggctcgt cgccgaggtg gacggcgagg tcgccggcat cgcctacgcg 8820
ggcccctgga aggcacgcaa cgcctacgac tggacggccg agtcgaccgt gtacgtctcc 8880
ccccgccacc agcggacggg actgggctcc acgctctaca cccacctgct gaagtccctg 8940
gaggcacagg gcttcaagag cgtggctcgt gtcacgggc tgcccaacga cccgagcgtg 9000
cgcacgcacg aggcgctcgg atatgcccc cgcggcatgc tcgggcggc cggcttcaag 9060
cacgggaact ggcacgacgt gggtttctg cagctggact tcagcctgcc ggtaccgccc 9120
cgtccggtcc tgcccgtcac cgagatctga gatcacccgt tctaggatcc gaagcagatc 9180
gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga 9240
ttatcatata atttctgttg aattacgta agcatgtaat aattaacatg taatgcatag 9300
cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga 9360
tagaaaacaa aatatagcgc gcaaacagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt 9420
tactagatcg aaacataact tcgtatagca tacattatac gaagttatca aaacgctcgtg 9480
agacagtttg gttaactata acggtcctaa ggtagcgatc gaggcattac ggcattacgg 9540
cactcgcgag ggtccgaatc tatgtcgggt gcggagaaag aggtaatgaa atggcaattt 9600
acaattgaat atacctgcc g 9621

<210> 15
< 211> 7343
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> ADN-T que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican el promotor expansina, un péptido de retención de Golgi y una proteína NODC

10

<220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (1)..(25)
< 223> repetición del límite derecho del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988)

15

<220>
< 221> promotor
< 222> (26)..(913)
< 223> secuencia que incluye la región del promotor del gen expansina de Gossypium hirsutum (algodón)

20

<220>
< 221> sig_péptido
< 222> (914)..(1018)

25

<220>
< 221> gen
< 222> (1019)..(2209)
<220>
< 221> 3'UTR
< 222> (2210)..(2442)
< 223> secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon et al., 1991)

ES 2 548 166 T3

- 5 <220>
< 221> promotor
< 222> (2465)..(3303)
<223> Pcwp: secuencia que incluye la región del promotor del gen expansina de *Gossypium hirsutum* (algodón)
- 10 <220>
< 221> gen
< 222> (3304)..(5133)
< 223> gfaEc: región codificante del gen glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de *Escherichia coli* (Frohberg y Essigmann, 2006)
- 15 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (5134)..(5407)
< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker et al., 1982)
- 20 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (5450)..(5449)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- 25 <220>
< 221> promotor
< 222> (5484)..(6320)
< 223> P35S3: secuencia que incluye la región del promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., 1985)
- 30 <220>
< 221> gen
< 222> (6321)..(6872)
< 223> bar: la secuencia codificante del gen fosfinotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987).
- 35 <220>
< 221> 3'UTR
< 222> (6873)..(7156)
< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker et al., 1982)
- 40 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (7157)..(7190)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- 45 <220>
< 221> característica miscelánea
< 222> (7319)..(7343)
< 223> repetición del límite izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)
- <400> 15

ES 2 548 166 T3

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gctacgtacc	60
tgcagggcgg ccgcgggctg gtatcttttg attggcacia acagtgcgaa caaagaagac	120
cacacaataa caattttaac aatatactaa tttaaataaa aaattttcaa taatttaata	180
agttaaccga ggaaaactta ctaagagtta gttacccttg ttaaataaac ttatcatgaag	240
taatagaaac ttttagtacg tatcatctta tatagaacia tttctatttt cagaaagtca	300
agaaaattgt attctagaaa atggcgactt cttcaccttc agtccttccc tgatcggcgc	360
ttgtgaaaaa cgaaaaacct gagtctgatt ggctgactga aaatgaacct actcatcacc	420
attcactatt accaacttca aatgataggg gaattaactg gtaaagtgta actccaccga	480
tggttgaggt ggttgctg agttaaataa gattttttta gttttgtttc aagtggcttc	540

ES 2 548 166 T3

aattgcaagc aattaggaga ctgctgctgga ataacccttc gctcaacctt ccgccattgt 600
tatggtttaa ttaaacatta tgttccatc catctatatt tatatccatt aaaacaagcc 660
gttgagcaaa taatggatac tggataccat catatctatg attaaaattt tgcattgtgcc 720
cttttaattg atagcttaag ccttaattat cctccaaatt tgtactcttt caccacttaa 780
ttggctacgt acggtactta gcgttgcttg tcatcttctg tactacaaac tctttctcat 840
tttgataaaa tagctataca ctttttctct cctcaaatca ataaggtag gtcagccaat 900
tgtttgagct accatgagta aacggaatcc gaagattctg aagatttttc tgtatatggt 960
acttctcaac tctctctttc tcatcatcta ctctgttttt cactcatcgt cgttttcaag 1020
tgtcgtagat gtgatcgggt tgcttgcgac tgcagcctac gtgacgttgg cgagcgcata 1080
caaggtagtc cagttcatta acgtgctgag cgtaacggat gtcgctggtc tcgaaagtga 1140
tgctttgccg ctcaactcaa gggttgacgt tatcgtgccg acattcaatg agaactccag 1200
cacattgctc gagtgcgtcg cttctatatt cgcacaagac taccgcggac caataacgat 1260
tgtcgtggtg gacgatgggt cgaccaacaa aacatcattt cacgcagtat gcgacaagta 1320
cgcgagcgac gaaaagttca tttttgctga acttgatcaa aacaagggga agcgcgccgc 1380
gcaaatggag gccatcagga gaacagacgg agacctgata ctaaactgtag actcggacac 1440
ggttatagat aaggatggtg ttacaaagct tgcgtcgtcc atgagagccc cgaatgtcgg 1500
tggtgtcatg gggcagctcg ttgcaaagaa tcgagaaaga tcttggttta ccagattaat 1560
cgatatggag tactggcttg cgtgtaacga ggagcgcatt gcgcagtcga ggtttggctc 1620
cgtgatgtgt tgttggtggc cgtgcgccat gtatagaaga tctgcaatta cgccactatt 1680
ggcagaatat gagcaccaga cattcctagg gcgtccgagc aactttgggtg aggatcgcca 1740
tctcacaatc ctgatgctga aggcgggatt tcggaccggg tacgtcccag gtgccgtagc 1800
gaggacggtg gttccggatg ggctggcgcc gtacctgagc cagcaactcc gctgggcccg 1860
cagcacttat cgcgacaccg ccctcgcctt acgtataaag aaaaatctaa gcaaatatat 1920
cacctttgag atatgcgcac agaatttggg tacggctctc ttacttgatg tgaccatgat 1980
ttcgtcttcg ctgactacat cagggctgca aacgcccgtt atcattctgg gtgtcgttgt 2040
ggggatgtct ataataagat gttgttctgt cggccttata gcgaaagatt ttcggtttct 2100
atacttcatc gttcactcag cgttgaatgt tctaatttta acgcccgtta aactctatgc 2160
cctgttaacc attcgggata gtcggtggct atcacgcgag agttcctaag cttagcaagct 2220
tggacacgct gaaatcacca gtctctctct acaaatctat ctctctctat tttctccata 2280
ataatgtgtg agtagttccc agataagga attaggggtc ctataggggt tcgctcatgt 2340
gttgagcata taagaaacc ttagtatgta tttgtatttg taaaactctt ctatcaataa 2400
aatttcta attcctaaaacc aaaatccagt actaaaatcc agccccgggtt aattaagcgg 2460
ccgcgggctg gtatcttttg attggcacia acagtgcgaa caaagaagac cacacaataa 2520
caattttaac aatatactaa tttaaatgaa aaattttcaa taatttaata agttaaccga 2580
ggaaaactta ctaagagtta gttaccctcg ttaaaataac tttcatgaag taatagaaac 2640
ttttagtagc tatcatctta tatagaacaa tttctatttt cagaaagtca agaaaattgt 2700
attctagaaa atggcgactt cttcaccttc agtccttccc tgatcggcgc ttgtgaaaaa 2760

ES 2 548 166 T3

cgaaaaacct gagtctgatt ggctgactga aaatgaacct actcatcacc attcactatt 2820
 accaacttca aatgataggg gaattaactg gtaaagtga actccaccga tgggtgaggt 2880
 ggttgctg agttaaata gattttttta gttttgtttc aagtggcttc aattgcaagc 2940
 aattaggaga ctgctgctga ataaccctc gctcaacctt ccgccattgt tatggtttaa 3000
 ttaaacatta tgttccatc catctatatt tatatccatt aaaacaagcc gttgagcaaa 3060
 taatggatac tggataccat catatctatg attaaaattt tgcattgccc cttttaatgt 3120
 atagcttaag ccttaattat cctccaaatt tgtactcttt caccacttaa ttggctacgt 3180
 acggtactta gcgttgcttg tcatcttctg tactacaac tctttctcat tttgtataaa 3240
 tagctataca ctttttctct cctcaaatca ataaggttag gtcagccaat tgtttgagct 3300
 accatgtgag gaattgttgg tgcattcggc caaagagagc ttgctgagat tttgttagag 3360
 ggtctgcaaa ggctagagta tagaggatat gactccgctg gtctggctgt cgttgatgct 3420
 gagggtcata tgacaaggct aagaaggta ggaaaggctc agatgcttgc tcaggcagct 3480
 gaggaacatc cattgcatgg aggtactggg attgacata ccagggtggc tactcatggg 3540
 gagccatcag aagttaatgc tcatccacat gtgagtggc atatcgttgt agttcacaat 3600
 gggataattg aaaaccacga accattgagg gaagagttaa aggcaagagg atatactttt 3660
 gtgagtgaga ctgacctga gttattgca ctttagtga actgggaact caaacagggg 3720
 ggcacattgc gtgaggctgt gtaagagct attcctcaac ttagagggtc atacggtact 3780
 gttattatgg attcaagaca cccagatact ctccttgag ctgagtcagg tagtccctg 3840
 gtcataggac ttggaatggg tgaaaatttt atcgttagcg accaattggc cttattgcca 3900
 gttacaagac gattttttt ctttgaagag ggcgatattg ctgagattac tagaaggctc 3960
 gtgaacatct ttgataagc tggcgtgag gttaaacgct aggatattca gtctaactt 4020
 caatacagat ctggtgataa aggaatttac aggcattata tgcaaaagga aatttatgaa 4080
 caaccaaatg ctatcaaaaa cacacttact ggccgtattt ctcatggaca ggtcgattta 4140
 agcagacttg gtccaatgc agacgaactg ctatcaaaag ttgagcaca acagatactg 4200
 gcatgaggaa ctagtataa ttcaggaatg gtgtctagat actggttcga aagcttggca 4260
 ggtatacctt gtgatgtaga gatcgttct gagtttaggt atagaaagtc tgctgtcgt 4320
 agaaattcat taatgattac attatctcaa tccggagaaa cagcagatac actggctgga 4380
 ttgaggcttt ctaaggaact cggatatctg ggttcaactg ctatttgtaa tgtaccaggt 4440
 tcctcattgg ttcgtgaatc agatctagca cttatgaca atgcaggaac tgaataggt 4500
 gtggcaagta ccaaggcttt cacaaccaca ctgaccgtac ttttaatgtt ggtagcaaaa 4560
 ctcagtcgat taaaggggct agatgcatct atcgaacatg atattgttca cgggcttcaa 4620
 gctctccctt caagaattga acaaatgctt tcacaagata agagaataga ggcattggct 4680
 gaagatttt ccgacaaaca tcacgattg tttcttgac gtggcgatca atatccaatt 4740
 gcattggaag gagctttgaa gttgaaagaa ataagttaca ttcacgcaga agcatatgca 4800
 gctggagaac tcaagcatgg tcctttggca ctcatcgacg ctgacatgcc cgtgatcgt 4860
 gtggctccta ataacgaact gctcgaag cttaaatcaa atatcgaaga ggttcgagct 4920
 agaggaggct agctttacgt tttcgtgaa caagatgctg gattcgtgtc aagcgataat 4980

ES 2 548 166 T3

atgcatataa ttgaaatgcc tcacgttgaa gaagtgattg cacctatatt ttatacagtc 5040
ccattgcaac ttctagctta ccatgttgca cttattaaag gaactgatgt tgatcagcct 5100
agaacacctag caaatctgt aacagtcgaa taaacgcgtg gcgcgccgaa gcagatcgtt 5160
caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccggtcct gcgatgatta 5220
tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcgatgacgt 5280
tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcgaatt atacatttaa tacgcgatag 5340
aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac 5400
tagatcggaa ttcgatatca ttaccctggt atccctaag cttattaata taacttcgta 5460
tagcatacat tatacgaagt tatgtttcct acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc 5520
cgagtaacaa tctccaggag atcaaatacc ttccaagaa ggtaaagat gcagtcaaaa 5580
gattcaggac taattgcatc aagaacacag agaaagacat atttctcaag atcagaagta 5640
ctattccagt atggacgatt caaggcttgc ttcataaacc aaggcaagta atagagattg 5700
gagtctctaa aaaggtagtt cctactgaat ctaaggccat gcatggagtc taagattcaa 5760
atcgaggatc taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta 5820
cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctggtctac 5880
tccaaaaatg tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaagg ctattgagac ttttcaacaa 5940
aggataattt cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcgaa 6000
aggacagtag aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct 6060
atcattcaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc 6120
atcgtggaag aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgacatc 6180
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacct ttcctctata 6240
taaggaagt catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctataaat 6300
ctatctctct ctctataaca atggaccacg aacgcgccc ggccgacatc cgccgtgcca 6360
ccgaggcgga catgccggcg gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg 6420
tcaacttccg taccgagccg caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc 6480
gggagcgcta tccctggctc gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgcttacg 6540
cgggccccctg gaaggcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct 6600
cccccgcca ccagcggacg ggactgggct ccacgctcta caccacctg ctgaagtccc 6660
tggaggcaca gggcttcaag agcgtggtcg ctgtcatcgg gctgccaac gacccgagcg 6720
tgcgcatgca cgaggcgctc ggatatgccc cccgcggcat gctgcgggcg gccggcttca 6780
agcacgggaa ctggcatgac gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc 6840
cccgtccggt cctgcccgtc accgagatct gagatcacc gttctaggat ccgaagcaga 6900
tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctggtgccc gtcttgcat 6960
gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat 7020
gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtccc caattataca ttaatacgc 7080
gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgatcatctat 7140
gttactagat cgaacataa cttcgtatag catacattat acgaagttat caaacgctcg 7200

tgagacagtt tggtaacta taacggtcct aaggtagcga tcgaggcatt acggcattac 7260
ggcactcgcg aggggccgaa tctatgtcgg gtgcggagaa agaggtaatg aaatggcaat 7320
ttacaattga atatctctg ccg 7343

- 5
 <210> 16
 < 211> 10829
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> ADN-T que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican el promotor E6, un péptido de retención de Golgi y una proteína NODC
- 10
 <220>
 < 221> característica miscelánea
 < 222> (1)..(25)
 < 223> repetición del límite derecho del ADN-T de Agrobacterium tumefaciens (Zambryski, 1988)
- 15
 <220>
 < 221> promotor
 < 222> (26)..(2712)
 < 223> secuencia que incluye la región del promotor del gen E6 de Gossypium hirsutum (algodón)
- 20
 <220>
 < 221> sig_péptido
 < 222> (2713)..(2817)
- 25
 <220>
 < 221> 3'UTR
 < 222> (4009)..(4244)
 < 223> secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Sanfaçon et al., 1991)
- 30
 <220>
 < 221> promotor
 < 222> (4262)..(6901)
 <223> Pcwp: secuencia que incluye la región del promotor del gen E6 de Gossypium hirsutum (algodón)
- 35
 <220>
 < 221> gen
 < 222> (6902)..(8713)
 < 223> gfaEc: región codificante del gen glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de Escherichia coli (Frohberg y Essigmann, 2006)
- 40
 <220>
 < 221> 3'UTR
 < 222> (8732)..(9005)
 < 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 (Depicker et al., 1982)
- 45
 <220>
 < 221> característica miscelánea
 < 222> (9048)..(9085)
 < 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)
- <220>
 < 221> promotor
 < 222> (9086)..(9918)

ES 2 548 166 T3

< 223> P35S3: secuencia que incluye la región del promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell et al., 1985)

<220>

< 221> gen

5 < 222> (9919)..(10470)
< 223> bar: la secuencia codificante del gen fosfinotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987).

<220>

< 221> 3'UTR

10 < 222> (10471)..(10750)
< 223> 3'nos: secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen nopalina sintasa del ADN-T de pTIT37 (Depicker et al., 1982)

<220>

< 221> característica miscelánea

15 < 222> (10751)..(10788)
< 223> lox: secuencia que incluye la secuencia de reconocimiento de 34 pb para la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (Hoess y Abremski, 1985)

<220>

< 221> característica miscelánea

20 < 222> (10805)..(10829)
< 223> repetición del límite izquierdo del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski, 1988)

<400> 16

ES 2 548 166 T3

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gctacgtacc	60
tgcagggcgg ccgcgtaac ggatcaacat tcaattacaa taaagagtat agatagatac	120
atcaatacta tccagccctc tttcatgatg atgttgcaag ttttgcactc cacccccata	180
ttattatgaa gaggagaaat tcctgttaca acattaattg agctttattt tctaagaaat	240
gacttctaac attaataaat ttgaatcaat ttatagctat ttctcgact ctttcgtagt	300
atagctttct ttttatgcta aaacaggaga tgattataag acgtgaagtt gtcttaagat	360
taacaaggca gttagatgca tttaaattgg tatttaagga tatgtctgta tataactaga	420
actaattaag attacaatac actgcaaaat gattccacct tttttttttt tttggttctc	480
tcttttatat gatcaatac aatgttgata tgaacaaggt tttgcagttg tagaaaaatcg	540
tggaggactt tttttttaa aaaagaaaga taaaattcat aaaaaaatgt gaagttaagc	600
atatttagtg atgggtgggg tatgggtggg tttgctaaca tggaatgagc atggcagatt	660
ggcactttaa agaagggatg gggccgaggg ggcgggagtt gttaaactct cggcgtagaa	720
aaaggtcagt aagcgtgtcc ctggcattag acaaggagag ggggtagcac atgcacagcc	780
caactatata tctttatfff atgtcccact ccaactcccc tcatctctgc cgcaacatta	840
aataccttat gcatccttac tattcataat ggtttttttt gttgggttga tgttcaaaa	900
ttaaatfff tattatagat gtattaatat ttttaaaaat atataagatt ttttttaagt	960
aggagttaa tctttggtgg tgatgttgat tttagatata ttccccacc gcaagtagat	1020
atcatacatt ctaatataat ttaaaaaaaa gtataactaa aatataatfff atatfff	1080
atatfff gaatfff aaatfaaaa attaatfaaa tgttcatgtg tcatctacat	1140
gtatgcaacg ttagcgaagt ttaaaatata ttaatfff cattcgtgat ttgaaaaaa	1200
aaaggttaagt ttaaaggtta aacaagcata aatctaaata aatagttaaa ataatfff	1260
ttataaagtt agagaattaa ataaattatt atttatffa aaaataatfff tcaataaatt	1320
actaatffag tcacataatc taatataatt taaaaaataa ttattaacat tttaatffgt	1380

ES 2 548 166 T3

atgaattcct gttatgtatg gattcaaacc cgttcgttcc atcaacaaat tgatctgcat 1440
gagacttaag ggtagaatt ttgtgtaacc ctttttcctc ctaattttta cttttaaaaa 1500
gaaattgcaa tacaatTTTT tttttataga attctcctat ttttatttat ttatttgctt 1560
aggaagtttt actgacactg cttttatttt tccatcaatc aaatttaaga gacaattcac 1620
ttttataat taacaaaaaa aaacaaaaag aaaataaaag aaattacttt tttctttttc 1680
gtgttcgata caagatagat gaaatatgaa aaataaaatg aaatgaaaat atattactag 1740
tgatatatga cctccattat gtaggggaaa gaaataaaaa ttatattaat ttatgatact 1800
tccataatgt ggtaaaaaat aattatctag ttttttttg taaaaaaaaa aaagttgata 1860
tctatgctac taatgaggtt tcttagtgag ttgttacta ctaataaagt ttatttgcat 1920
ggttgagacc ttatgctttt caaatacca ttttgaatt ttaaaaattg tgaattttta 1980
ttatatttaa aaaacaagt atttatataa ctagtaatgt attattttga ctttttttta 2040
atcgagttaa tgttggttat ttcgttatac caattcaata aaatatttta tttatattaa 2100
attatagcat acctcacgat gtgggtgaag taaaattatt taacaaatat attttgaaaa 2160
attgataaaa aactaaatg aggttttggg tgaatagtaa gatataatta ttacaaatta 2220
taaatatgta ggttcaaaat ctatcatgtg tatatttgta ctattattct atataaattg 2280
ataaccttat aaaagtatct aatttagttt atggttgatt gatcgataat accaaattta 2340
ttaaaaatta atattagtaa agatatatag tacaaaacta aacataaaat tttatagttt 2400
aaggaaatag cggaaaaaat atcatatttg tagaactggt tagcagtgtg ggagaatggg 2460
atcattacaa ggaaaaatga aatataatc attaatacca aacataaaag aaagcgtctt 2520
ttgataaagt tgttattggt gtaatgtgaa gggaccacaa tcatcaccat tcaccacttg 2580
ctcctaattg agttgaaatc tttttacaac atagaaaact agaagatcgc cttttcttgc 2640
ttcatatata tagattttgt atcatcgcaa tttcacatca cacacacaag taaagcatta 2700
gcaaccatag ccatgagtaa acggaatccg aagattctga agatttttct gtatatgtta 2760
cttctcaact ctctctttct catcatctac ttcgtttttc actcatcgtc gttttcaagt 2820
gtcgtagatg tgatcggttt gcttgcgact gcagcctacg tgacgttggc gagcgcatac 2880
aagggtgtcc agttcattaa cgtgtcgcgc gtaacggatg tcgctggtct cgaaagtgat 2940
gctttgccgc tcaactcaaag ggttgacgtt atcgtgccga cattcaatga gaactccagc 3000
acattgctcg agtgcgtcgc ttctatatgc gcacaagact accgcggacc aataacgatt 3060
gtcgtggtag acgatgggtc gaccaacaaa acatcatttc acgcagtatg cgacaagtac 3120
gcgagcgacg aaaggttcat atttgtcga cttgatcaaa acaaggggaa gcgcgccgcg 3180
caaatggagg ccatcaggag aacagacgga gacctgatac taaacgtaga ctcggacacg 3240
gttatagata aggatgttgt taaaaagctt gcgtcgtcca tgagagcccc gaatgtcggg 3300
ggtgtcatgg ggcagctcgt tgcaagaat cgagaaagat cttggcttac cagattaatc 3360
gatatggagt actggcttgc gtgtaacgag gagcgcattg cgcagtcgag gtttggctcc 3420
gtgatgtgtt gttgtgggcc gtgcgccatg tatagaagat ctgcaattac gccactattg 3480
gcagaatatg agcaccagac attcctaggg cgtccgagca actttggtga ggatcgccat 3540
ctcacaatcc tgatgctgaa ggcgggattt cggaccgggt acgtcccagg tgccgtagcg 3600

ES 2 548 166 T3

aggacgttgg ttccgatgg gctggcgccg tacctgcgcc agcaactccg ctgggcccgc 3660
 agcacttatc gcgacaccgc cctcgcctta cgtataaaga aaaatctaag caaatatatac 3720
 acctttgaga tatgcgacac gaatttgggt acggctctct tactttgtgat gaccatgatt 3780
 tcgctttcgc tgactacatc agggctcgcaa acgcccgtta tcattctggg tgcggttgtg 3840
 gggatgtcta taataagatg ttgttctgtc gcccttatag cgaaagattt tcggtttcta 3900
 tacttcatcg ttcaactcagc gttgaatggt ctaattttaa cgccgttaaa actctatgcc 3960
 ctgtaacca ttccggatag tcggtggcta tcacgcgaga gttcctaagc tagcaagctt 4020
 ggacacgctg aaatcaccag tctctctcta caaatctatc tctctctatt ttctccataa 4080
 taatgtgtga gtagttccca gataagggaa ttagggttcc tatagggttt cgctcatgtg 4140
 ttgagcatat aagaaacctt tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa 4200
 atttctaatt cctaaaacca aaatccagta ctaaaatcca gcccgggtta attaagcggc 4260
 cgcgtcaacg gatcaacatt caattacaat aaagagtata gatagataca tcaatactat 4320
 ccagccctct ttcatgatga tgttgcaagt tttgcactcc acccccatat tattatgaag 4380
 aggagaaatt cctgttacia cattaattga gctttatfff ctaagaaatg acttctaaca 4440
 ttaataaatt tgaatcaatt tatagctatt tctcgtactc tttcgtagta tagctttctt 4500
 tttatgctaa aacaggagat gattataaga cgtgaagttg tcttaagatt aacaaggcag 4560
 ttgatgcat ttaaattggt atttaaggat atgtctgtat ataactagaa ctaattaaga 4620
 ttacaataca ctgcaaaatg attccacctt tttttttttt ttggttctct cttttatatg 4680
 atcaataca atgttgatat gaacaagggt ttgcagttgt agaaaatcgt ggaggacttt 4740
 ttttttaaaa aaagaaagat aaaattcata aaaaaatgtg aagttaagca tatttagtga 4800
 tgggtggggg atggggtggt ttgctaacat ggaatgcgca tggcagattg gcactttaa 4860
 gaagggatgg ggccgagggg gcgggagttg ttaaactctc ggcgtagaaa aaggtcagta 4920
 agcgtgtccc tggcattaga caaggagagg gggtagcaca tgcacagccc aactatatct 4980
 ctttatttta tgtcccactc cactccccct catctctgcc gcaacattaa ataccttatg 5040
 catcttactc attcataatg gttttttttg ttgggttgat gttacaaaat taaatttttt 5100
 attatagatg tattaatatt tttaaaaata tataagattt tttttaagta ggagttaat 5160
 ctttgggtggt gatgttgatt ttgatatat tccccacccg caagtagata tcatacattc 5220
 taatataatt taaaaaaaaag tataactaaa atatatttta tttttttta ttttttttg 5280
 aatttttaaa ttttaaaaaa ttaattaaat gttcatgtgt catctacatg tatgcaacgt 5340
 tagcgaagtt taaaatatat taattttttc attcgtgatt tgaaaaaaaa aaggttaagt 5400
 taaaggttaa acaagcataa atctaaataa atagttaaaa taattttttt tataaagtta 5460
 gagaattaaa taaattatta ttttatttaa aaataatfff caataaatta ctaatttagt 5520
 cacataatct aatataatff aaaaaataat tattaacatt ttaatttgta tgaattcttg 5580
 ttatgtatgg attcaaaccg gttcgttcca tcaacaaatt gatctgcatg agacttaagg 5640
 gttagaatff tgtgtaaccg tttttctccc taatttttac ttttaaaaag aaattgcaat 5700
 acaatttttt ttttatagaa tttctctatt tttatttatt tatttgctta ggaagtttta 5760
 ctgacactgc ttttattttt ccatcaatca aatttaagag acaattcact ttttataatt 5820

ES 2 548 166 T3

aacaacaaaa aacaacaaaga aaataaaaga aattactttt tcttttttcg tgttcgatac 5880
aagatagatg aaatatgaaa aataaaatga aatgaaaata tattactagt gatatatgac 5940
ctccattatg taggggaaag aaataaaaat tatattaatt tatgatactt ccataaatgtg 6000
gttaaaaata attatctagt atttttttgt aaaaaaaaaa aagttgatat ctatgctact 6060
aatgaggttt cttagttagt ttgttactac taataaagtt tatttgcatt gttgagacct 6120
tatgcttttc aaataccat atttgaattt taaaaattgt gaatttttat tatatttaaa 6180
aaacaagtta tttatataac tagtaatgta ttattttgac ttttttttaa tcgagttaat 6240
gttggttatt tcggtatacc aattcaataa aatattttat ttatattaaa ttatagcata 6300
cctcacgatg tgggtgaagt aaaattattt aacaaatata ttttgaaaaa ttgataaaaa 6360
tactaaatga ggttttggtt gaatagtaag atataattat tacaattat aaatatgtag 6420
gttcaaaatc tatcatgtgt atatttgtac tattattcta tataaattga taaccttata 6480
aaagtatcta atttagttta tggttgattg atcgataata ccaaatttat taaaaattaa 6540
tattagtaaa gatatatagt acaaaactaa acataaaatt ttatatgtta aggaaatagc 6600
ggaaaaaata tcatatttgt agaactgttt agcagtgtgg gagaatggga tcattacaag 6660
gaaaaatgaa atatatatca ttaatacaca acataaaaga aagcgtcttt tgataaagtt 6720
gttattgggtg taatgtgaag ggaccacaat catcaccatt caccacttgc tcctaattga 6780
gttgaaatct tttacaaca tagaaaacta gaagatcgcc ctttcttgct tcatatatat 6840
agattttgta tcatcgcaat ttcacatcac acacacaagt aaagcattag caaccatagc 6900
catgtgcgga attgttggtg ctatcgcca aagagacggt gctgagattt tgtagaggg 6960
tctgcgaagg cttagatata gaggatatga ctccgctggt ctggctgtcg ttgatgctga 7020
gggtcatatg acaaggctaa gaaggtagg aaaggttcag atgcttgctc aggcagctga 7080
ggaacatcca ttgcatggag gtactggtat tgcacatacc aggtgggcta ctcatgggga 7140
gccatcagaa gttaatgctc atccacatgt gagtgagcat atcgttgtag ttcacaatgg 7200
gataattgaa aaccacgaac cattgagga agagttaaag gcaagaggat atacttttgt 7260
gagtgagact gacactgagg ttattgcaca tttagtgaac tgggaaactca aacagggggg 7320
cacattgctg gaggtgtgt taagagctat tcctcaactt agaggtgcat acggtactgt 7380
tattatggat tcaagacacc cagatactct ccttgacgct agatcaggta gtccttgggt 7440
cataggactt ggaatgggtg aaaattttat cgctagcgac caattggcct tattgccagt 7500
tacaagacga tttattttcc ttgaagaggg cgatattgct gagattacta gaaggtctgt 7560
gaacatcttt gataagactg gcgctgaggt taaacgtcag gatatcgagt ctaaccttca 7620
atacagatgct ggtgataaag gaatttacag gcattatatg caaaaggaaa tttatgaaca 7680
accaaagtct atcaaaaaca cacttactgg ccgtatttct catggacagg tcgatttaag 7740
cgagcttggc cctaattgcag acgaactgct atcaaaagtt gagcacatac agatactggc 7800
atgcggaact agttataatt caggaatggt gtctagatac tggttcgaaa gcttggcagg 7860
tataccttgt gatgtagaga tcgcttctga gtttaggtat agaaagtctg ctgtgcgtag 7920
aaattcatta atgattacat tatctcaatc cggagaaaca gcagatacac tggctggatt 7980
gaggctttct aaggaactcg gatattctggg ttcacttgcct atttgtaatg taccagggtc 8040

ES 2 548 166 T3

ctcattggtt cgtaatcag atctagcact tatgacaaat gcaggaactg aaataggtgt 8100
ggcaagtacc aaggctttca caaccaact gaccgtactt ttaatgttgg tagcaaaact 8160
cagtcgatta aaggggctag atgcatctat cgaacatgat attgttcacg ggcttcaagc 8220
tctcccttca agaattgaac aaatgctttc acaagataag agaatagagg cattggctga 8280
agatTTTTCC gacaaacatc acgcattggt tcttggacgt ggcgatcaat atccaattgc 8340
attggaagga gctttgaagt tgaaagaaat aagttacatt caccgagaag catatgcagc 8400
tggagaactc aagcatggtc ctttggcact catcgacgct gacatgcccg tgatcgtagt 8460
ggctcctaataacgaaactgc tcgaaaagct taaatcaaat atcgaagagg ttcgagctag 8520
aggaggtcag ctttacgttt tcgctgaaca agatgctgga ttcgtgtcaa gcgataatat 8580
gcatataatt gaaatgcctc acgttgaaga agtgattgca cctatatTTT atacagtccc 8640
attgcaactt ctagcttacc atgttgcaact tattaagga actgatgttg atcagcctag 8700
aaacctagca aaatctgtaa cagtcgaata aacgcgtggc gcgccgaagc agatcgttca 8760
aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc 8820
atataatttc tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta 8880
tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa 8940
aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta 9000
gatcgggaatt cgatatcatt accctgttat ccctaaagct tattaatata acttcgtata 9060
gcatacatta tacgaagtta tgtttcctac gcagcaggtc tcatcaagac gatctacccg 9120
agtaacaatc tccaggagat caaacctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga 9180
ttcaggacta attgcatcaa gaacacagag aaagacatat ttctcaagat cagaagtact 9240
attccagtat ggacgattca aggcttgctt cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga 9300
gtctctaaaa aggtagtccc tactgaaact aaggccatgc atggagtcta agattcaaat 9360
cgaggatcta acagaactcg ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga gtcctttacg 9420
actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag caccgacctc tggcttactc 9480
caaaaatgac aaagatacag tctcagaaga ccaaagggtt attgagactt ttcaacaaag 9540
gataatttcg gaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact tcatcgaaag 9600
gacagtagaa aaggaagggt gctcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat 9660
cattcaagat gcctctgccg acagtgttcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat 9720
cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgacatctc 9780
cactgacgta agggatgacg cacaatccc ctatccttcg caagacctt cctctatata 9840
aggaagtcca tttcatttgg agaggacacg ctgaaatcac cagtctctct ctataaatct 9900
atctctctct ctataacaat ggaccagaa cgacgccgg cggacatccg ccgtgccacc 9960
gaggcggaca tgccggcggc ctgcaccatc gtcaaccact acatcgagac aagcacggtc 10020
aacttccgta ccgagccgca ggaaccgag gagtggacgg acgacctcgt ccgtctgagg 10080
gagcgtatc cctggctcgt cgccgaggtg gacggcgagg tcgccggcat cgcctacgcg 10140
ggcccctgga aggcacgcaa cgctacgac tggacggccg agtcgaccgt gtacgtctcc 10200
ccccgccacc ageggacggg actgggctcc acgctetaca cccacctgct gaagtccctg 10260

ES 2 548 166 T3

gaggcacagg gcttcaagag cgtggtcgct gtcacgggc tgcccaacga cccgagcgtg	10320
cgcatgcacg aggcgctcgg atatgcccc cgcgcatgc tgcgggcggc cggcttcaag	10380
cacgggaact ggcacgacgt gggtttctgg cagctggact tcagcctgcc ggtaccgccc	10440
cgtccgggcc tgcccgtcac cgagatctga gatcacccgt tctaggatcc gaagcagatc	10500
gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggc cttgcgatga	10560
ttatcatata atttctggtg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcgatga	10620
cgttatztat gagatggggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga	10680
tagaaaacaa aatatagcgc gcaaacctagg ataaattatc gcgcgcggtg tcactctatgt	10740
tactagatcg aacataact tcgtatagca tacattatac gaagttatat tcgagcatgg	10800
agccatttac aattgaatat atcctgccg	10829

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular vegetal, particularmente la pared celular secundaria, comprendiendo dicho método
- 5 i. introducir o proporcionar un gen quimérico en la célula vegetal, comprendiendo dicho gen quimérico:
1. un promotor expresable en plantas;
 2. una región de ADN que codifica una proteína de nodulación C fusionada a una secuencia de anclaje señal heteróloga para fijar como objetivo las membranas del aparato de Golgi; y
 - 10 3. una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, la etapa de regeneración de dicha célula vegetal en una planta.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que la longitud de la raíz de dicha planta es esencialmente la misma que la de una planta de tipo salvaje que comprende la proteína de nodulación C.
- 15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos oligosacáridos cargados positivamente consisten en N-acetilglucaminasas β 1-4-enlazadas con un grado de polimerización de 2 a 10.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha secuencia de anclaje señal se selecciona de la secuencia de anclaje señal de una sialil transferasa de rata, la secuencia de anclaje señal de una galactosiltransferasa humana, la secuencia de anclaje señal del homólogo de Arabidopsis del receptor de levadura HDEL (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-metilglucosaminil-transferasa I del tabaco o la secuencia de aminoácidos YYHDL o LKLEI.
- 20 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 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, una especie de Sinorhizobium, una especie de Desulfobacterium, una especie de Dokdonia, una especie de Methylobacterium, una especie de Phyllobacterium o una especie de Psychroflexus.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha proteína de nodulación C comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, 1615305C, 1615305D, 1615305E, AAA26226, AAA63602, AAB16897, AAB24745, AAB34509, AAB47353, AAB51164, AAB71694, AAB91695, AAB95329, AAC80567, AAD11313, AAD11315, AAD11317, AAD11319, AAD11321, AAD11323, AAD11325, AAD11327, AAD11329, AAD11331, AAD11333, AAD11335, AAD11337, AAD11339, AAD11341, AAD11343, AAD11345, AAD11347, AAD11349, AAD11351, AAD11353, AAD11355, AAD11357, AAD11359, AAD11361, AAD11363, AAD11365, AAD11367, AAD11369, AAD11371, AAD11373, AAD11375, AAD11377, AAD11379, AAD11381, AAD11383, AAD11385, AAD11387, AAD11389, AAD11391, AAD11393, AAD11395, AAD11397, AAD11399, AAD11401, AAD11403, AAD11405, AAG60998, AAK00157, AAK39956, AAK39957, AAK39958, AAK39959, AAK39960, AAK39961, AAK39962, AAK39963, AAK39964, AAK39965, AAK39966, AAK39967, AAK50872, AAK65131, AAL88670, AAN62903, AAS91748, AAU11338, AAU11339, AAU11340, AAU11341, AAU11342, AAU11343, AAU11344, AAU11345, AAU11346, AAU11347, AAU11348, AAU11349, AAU11350, AAU11351, AAU11352, AAU11353, AAU11354, AAU11355, AAU11356, AAU11357, AAU11358, AAU11359, AAU11360, AAU11361, AAU11362, AAU11363, AAU11364, AAU11365, AAX30049, AAX30050, AAY44091, AAY44092, AAY44093, AAY89044, AAZ81541, ABC40958, ABC67303, ABD39006, ABD39007, ABD39008, ABD39009, ABD39010, ABD39011, ABD39012, ABD39013, ABD39014, ABD39015, ABD39016, ABD39017, ABD39018, ABD39019, ABD39020, ABD39021, ABD39022, ABD39023, ABD39024, ABD39025, ABD39026, ABD39027, ABD39028, ABD39029, ABD39030, ABD39031, ABD39032, ABD39033, ABD39034, ABD39035, ABD39036, ABD39037, ABD39038, ABD67413, ABD67416, ABD67419, ABD67422, ABD67425, ABD67428, ABD67431, ABD67434, ABD73319, ABD73320, ABD73321, ABD73322, ABD73323, ABD73324, ABD73325, ABD73326, ABD73327, ABD73328, ABD73329, ABD73330, ABD94161, ABD94162, ABD94163, ABD94164, ABD94165, ABF93198, ABF93199, ABF93200, ABF93201, ABF93202, ABM69186, ABM69187, ABM69188, ABM69189, ABM69190, ABN09217, ABN09218, ABN09219, ABN11177, ABN11178, ABN11179, ABP93834, ABS85176, ABS85177, ABS85178, ABS85179, ABS85180, ABS85181, ABS85182, ABU69044, ABU69045, ABU69046, ABU69047, ABU69048, ABU69049, ABU69050, ABU69051, ABU69052, ABU69053, ABU69054, ABU69055, ABU69056, ABU69057, ABU69058, ABU69059, ABU69060, ABU69061, ABU89879, ABV25689, ABV25690, ABV25691, ABV25692, ABV25693,
- 55

5 ABV25694, ABW96196, ABW96197, ABW96198, ABW96199, ABW96200, ABW96201, ABW96202, ABW96203, ABW96204, ABW96205, ABW96206, ABW96207, ABW96208, ABW96209, ABW96210, ABW96211, ABY59633, ABY59634, ABY59635, ABY59636, ABY59637, ACA80309, ACA80310, ACA80311, ACA80312, ACA80313, ACC77565, ACD39337, ACD39338, ACD39339, ACD39340, ACD39341, ACD39342, ACD39343, ACD39344, ACD39345, ACD39346, ACD39347, ACD62595, ACD63093, ACD63094, ACD63095, ACD63096, ACD63097, ACD63098, ACD63099, ACD63100, ACD63101, ACD63102, ACD63103, ACD63104, ACF19762, ACF 19763, 19764 ACF, ACF 19765, 19766 ACF, ACF 19767, 19768 ACF, ACF 19769, ACF19770, ACH91221, ACH91222, ACH91223, ACH91224, ACH91225, ACH91226, ACH91227, ACH91228, ACH91229, ACH91230, ACH91231, ACH91232, ACH91233, ACH91242, ACH91243, ACH91244, ACH91245, ACH91246, ACH91247, ACH91248, 10 ACH91249, ACI47333, ACI47334, ACI47335, ACI47336, ACI47337, ACI47338, ACI47339, ACI47340, ACI47341, ACI47342, ACI47343, ACI47344, ACI47345, ACL12058, ACL12059, ACL50517, ACL50518, ACL50519, ACL50520, ACL50521, ACL50522, ACL50523, ACM69382, ACM79634, ACM79635, ACM79636, ACM79637, ACM79638, ACM79639, ACM79640, ACM79641, ACM79642, ACM79643, ACM79644, ACM79645, ACM79646, ACN17701, ACN69201, ACN69202, ACN69203, ACN69204, ACN69205, ACN69206, ACN69207, ACN69208, ACN69209, 15 ACN69210, ACN69211, ACN69212, ACN69213, AC058664, AC058665, AC058666, AC058667, AC058668, AC058669, ACO58670, ACO58671, ACO58672, ACO58673, ACO58674, ACO58675, ACP40990, ACS35430, ACS35434, ACT34091, ACT34094, ACT34097, ACT34100, ACT34101, ACT34104, ACT34107, ACT34110, ACT34113, ACT34116, ACT34119, ACT34122, ACT34125, ACT34128, ACT34131, ACT34134, ACT34137, ACT34140, ACT34143, ACV52950, ACV52951, ACV52952, ACV52953, ACV52954, ACV52955, ACX47326, 20 ACX47327, ACX47328, ACX47329, ACX47330, ACX47331, ACX47332, ACX47333, ACX47334, ACY02884, ACY78518, ACZ52692, ACZ52693, ACZ52694, ACZ52695, ACZ52696, ACZ52697, ADD20957, ADD20958, ADD20959, ADD20960, ADD20961, ADD20962, ADD20963, ADD20964, ADD20965, ADD20966, ADD20967, ADD20968, ADD20969, ADD20970, ADD20971, ADG63645, ADG63646, ADG63647, ADG63648, ADG63649, ADG63650, ADG63651, ADG63652, ADJ18191, ADJ18192, BAA06082, BAA06083, BAA06084, BAA06085, 25 BAA06086, BAA06087, BAA06088, BAA06089, BAA06090, BAA24092, BAB52500, C26813, CAA25810, CAA25811, CAA25814, CAA26310, CAA26311, CAA51773, CAA51774, CAA608779, CAA67139, CAB56055, CAC42489, CAD29949, CAD29950, CAD29951, CAD29952, CAD29953, CAD29954, CAD29955, CAD29956, CAD29957, CAD31533, CAD43933, CAD90257, CAD90583, CAD90584, CAD90585, CAD90586, CAD90587, CAD90588, CAH04369, CAN84684, CAP64017, EAQ38847, EAS72439, NP_106714, NP_435719, NP_443883, P04340, 30 P04341, P04677, P04678, P04679, P06234, P06235, P17862, P24151, P26024, P50357, P53417, P72334, Q07755, Q53513, YP 001.796.208, YP 002605865, ZP_01050448 o ZP_01252.570.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha NODC fusionada a la secuencia anclaje de señal de Golgi comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 11.

35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho promotor expresable en plantas es un promotor específico para fibras.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho promotor expresable en plantas es un promotor específico para fibras seleccionado del promotor específico para fibras de un gen beta-tubulina del algodón, un promotor específico para fibras de un gen actina del algodón, un promotor específico para fibras de un gen de proteína de transferencia de lípidos del algodón, un promotor de la envuelta de semillas y proteasa específica para fibras del algodón, un promotor del gen R2R3 MYB específico para fibras del algodón, un promotor de un gen expansina del algodón o un promotor de un gen quitinasa en algodón. 40

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho se selecciona de algodón, cáñamo o lino.

45 12. El método de la reivindicación 11, en el que la pared celular vegetal en dicha planta de algodón comprende fibras.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende, además, la etapa de desacetilar dichos oligosacáridos que consisten en monómeros de N-acetilglucosamina tratando la pared celular de dicha planta con una disolución alcalina durante un tiempo suficiente para desacetilar dicho oligosacárido que consiste en monómeros de N-acetilglucosamina, o a través de la acción enzimática de quitina desacetilasas.

50 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, que comprende, además, la etapa de aislar la pared celular vegetal o fibras de dicha planta.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en el que la pared celular de dicha planta es una pared celular vegetal secundaria.

16. Un gen quimérico según se describe en las reivindicaciones 1 a 10.

17. Una célula vegetal que comprende el gen quimérico de la reivindicación 16.
18. Una planta que consiste esencialmente en las células vegetales de la reivindicación 17.
19. La planta de la reivindicación 18, caracterizada por que la longitud de la raíz de dicha planta es esencialmente la misma que la de plantas de tipo salvaje que no comprenden NODC.
- 5 20. La planta de la reivindicación 18 ó 19, que es algodón.
21. Uso del 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 vegetales para modificaciones químicas de estas paredes celulares vegetales.
- 10 22. Uso del gen quimérico de la reivindicación 16, para producir plantas con oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular, caracterizado por que la longitud de la raíz de dicha planta es esencialmente la misma que la de una planta isogénica que no comprende la proteína de nodulación C.
23. Uso del gen quimérico de la reivindicación 16, para producir plantas de algodón con oligosacáridos cargados positivamente en las fibras.
- 15 24. Uso del gen quimérico de la reivindicación 16. para producir fibras de algodón con reactividad mejorada tal como una capacidad de tinción mejorada.
25. Uso del gen quimérico de la reivindicación 16, para producir hilos y tejidos con reactividad mejorada tal como una capacidad de tinción mejorada.

ROT_NODC_RHILP	MTMLDTTSTV	AVSLYALLST	AYKSMQAVYS	LPTDVSLASH	GLGFGDELPS
ROT_NODC_BRAJA	MDLLATTSRA	AVSSYALLST	IYKVSQALYA	QPAINSSLDN	LQQAEEVVVPA
ROT_NODC_RHIS3	MDLLTTTSTV	AVACYALLST	YKGMQAVYS	LPPTVAPASE	DLVGSDDLWPS
ROT_NODC_RHISN	MDLLGTTGAV	AISLYAALST	AYKGMQAIYA	LPNTNTAAST	PVTGSGAPPS
ROT_NODC_RHILV	MTLLATTSIA	AISLYAMLST	VYKSAQVFHA	RRITISTTPA	KDIETNPVPS
ROT_NODC_AZOCA	MSWVDVIGLL	ATAAYVTLAS	AYKVQJFIN.	VSSVTDVAGL	ESDALPLTPR
	M-----	A---Y--L--	-YK--Q-	-----	-----P-
ROT_NODC_RHILP	VDVIVPSFNE	DPRTLSECLA	SIAGQFYGGR	LQVYLVDDGS	ENREALRLVH
ROT_NODC_BRAJA	VDVIVPCFNE	NPNTLAECLE	SIASQDYAGK	MQVYVWDDGS	ANRDVVAPVH
ROT_NODC_RHIS3	VDVIIPCYNE	GPLTLSACLD	SIANQDYAGK	LRVYVWDDGS	GNRDAVIFIH
ROT_NODC_RHISN	VDVIVPCYNE	DPRALSACLA	SIAKQDYAGE	LRVYVWDDGS	GNRNAIIPVH
ROT_NODC_RHILV	VDVIVPCFNE	DPIVLSECLA	SLAEQDYAGK	LRIYVWDDGS	KNRDAVVAQR
ROT_NODC_AZOCA	VDVIVPTFNE	NSSTLLECVA	SICAQDYRGP	ITIVVWDDGS	TNKTSFHAVC
	VDVI-P--NE	----J-C---	S---Q-Y-G-	-----VDDGS	-N-----
ROT_NODC_RHILP	EAFARDPRFN	ILLLPQNVGK	RKAQDRCDQR	SAGDMVLNVD	SDTILASDVI
ROT_NODC_BRAJA	RIYADPRFS	FILLANNVGK	RKAQIAAIRS	SSGDLVLNVD	SDTILAADV
ROT_NODC_RHIS3	DNYAGDPRFD	FILLPENVGK	RKAQIAAIRR	SSGDLVLNVD	SDTILASDVI
ROT_NODC_RHISN	DHYACDPRFR	FILMPKNVGK	RKAQIVAIRE	SSGDLVLNVD	SDTTIAPDVV
ROT_NODC_RHILV	AAAYADDERFN	FTILPKNVGK	RKA.IAAITQ	SSGDLILNVD	SDTTIAPDVV
ROT_NODC_AZOCA	DKYASDERFI	FVELDQNKGT	A.AQMEAIRR	TGDDLILNVD	SDTVIDKDVV
	---A-D-R--	F-----N-G-	--A-----	---GD--LNV	SDT----DV-
ROT_NODC_RHILP	RKLVPKNARV	AVGR.MGQLT	GPQKRQLAD	PFDMEYWLA	CNEERSQQAR
ROT_NODC_BRAJA	TKLVVKMHDP	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	AKNRRSNLIT	RLIDMEYWLA	CNEERIAQSR
	-KL-----	--G--MSQ--	-----	---DMEYWLA	CNEER--Q-R
ROT_NODC_RHILP	FGVMFCSCS	CVMYRLVSA.	SLLDQYDAQY	FRKQR..FGE	.IDIHLSHAE
ROT_NODC_BRAJA	FGVMCCCCG	CAMYRRSALA	LLLDQYEAQF	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLK
ROT_NODC_RHIS3	FGVMCCCCG	CAMYRRSLL	SLLDQYETQM	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLE
ROT_NODC_RHISN	FGVMCCCCG	CAMYRRSALL	LLLDKYETQL	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLN
ROT_NODC_RHILV	FGVMCCCCG	CAMYRRSAML	SLLDQYETQL	YRGKPSDFGE	DRHLTILMLS
ROT_NODC_AZOCA	FGVMCCCCG	CAMYRRSAIT	PLLAIEYHQT	FLGRPSNFGE	DRHLTILMLK
	FG-VM-C-G-	C-MYR-----	-LL-Y--Q-	F-----FGE	-----

FIGURA 1

ROT_NODC_RHILP	GSFRTEYRPS	AHAATVVPNK	LGPLYLQOQLR	WARSTFRDTL	LGAP.LPMLN
ROT_NODC_BRAJA	AGFRTEYVPD	ALAAATVVPHS	LRPLYRQOQLR	WARSTFRDTE	LAWRLLEPDL
ROT_NODC_RHIS3	AGFRTEYVPD	ALAVTVVPDR	LGPLYRQOQLR	WARSTFRDTL	LALRLLPGLD
ROT_NODC_RHISN	AGFRTEYVPE	ALAAATVVPNS	MGAYLRQOQLR	WARSTFRDTL	LALRLLPGLD
ROT_NODC_RHILV	AGFRTEYVPS	ALAAATVVPDT	MGAYLRQOQLR	WARSTFRDTL	LALPVLFGLD
ROT_NODC_AZOCA	AGFRTEYVPS	AVARTLVPDG	.SPYLRQOQLR	WARSTYRDTA	LALRIKKNLS
	---FRY-P-	A-A-T-VP--	---YL-QOQLR	WARST-R-T-	L-----
ROT_NODC_RHILP	RFLMLDVVGQ	NLGPELLDHS	VLTLAQLAL	TGTAPWLAAL	MIVAMTIDRC
ROT_NODC_BRAJA	GYLTLDVIGQ	NLGPELLAIS	SLAALAQULLI	DGSIPWWTGL	TIAAMTVYRC
ROT_NODC_RHIS3	RYLTLDVVGQ	NLGPELLALS	VIAGIAQFAL	TATLPWPTIL	VIAAMTIIRC
ROT_NODC_RHISN	RYLTLDVIGQ	NLGPELLALS	VLTLAQLAL	TATVPWSTIL	MIASMTWYRC
ROT_NODC_RHILV	RYLTLDAIGQ	NVGLLLALS	VLTLGIGQFAL	TATLPWWTIL	VIGSMTLVRC
ROT_NODC_AZOCA	KYITFEICAQ	NLGTALLAVM	TNISLSLTTTS	GSQTPVILG	VVVGMSIIRC
	-----Q	N-G--LL--	-----P	-----M	---RC
ROT_NODC_RHILP	SVVALRARQL	RFLGFSLHTE	INIFLLPLK	AYALCTLSNI	AWLSSLLCWQ
ROT_NODC_BRAJA	CVAALRAREL	RFIGESLHTP	INICLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRKYVDM
ROT_NODC_RHIS3	TVTACRARQA	RFIGFSLHTE	INIFLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRKTATL
ROT_NODC_RHISN	GVAARAREL	RFLGFSLHTL	LNVALLLPK	AYALCTLSNS	DWLSRGSPPA
ROT_NODC_RHILV	SVAAYRAREL	RFLGFALHTL	VNIFLLPLK	AYALCTLSNS	DWLSRGSVAI
ROT_NODC_AZOCA	CSVALIAKDF	RELYFIVHSA	LNVLILPLK	LYALLTIRDS	RWLSRESS..
	-----RF-F	---H--	-N---L-PLK	-YAL-T-	---WLS-----
ROT_NODC_RHILP	LESTSTADAR	TT.....ECSDMR	TASKLSPPPS	COANDV.....
ROT_NODC_BRAJA	PTEEGKQFVI	LHENAGRSPA	GVGGRLLLFV	RRRYSLHRA	WRRRRVFPVA
ROT_NODC_RHIS3	PNADKKQIIV	ANPIAGVGTG	SSGSAEAIRR	TDLPRDSSKL	VNADSVCSAE
ROT_NODC_RHISN	APNGVKDSPE	PHC.....
ROT_NODC_RHILV	APTVGQOGAT	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 CONTINÚA

ROT_NODC_BRAJA	MDLLATTSAA	AVSSYALLST	IYKSVQALYA	QPAINSSLDN	LGOAEVVVPA
ROT_NODC_RHIS3	MDLLTTTSTV	AVACYALLST	VYKGMQAVYS	LPPTVAPASE	DLVGSDLWPS
ROT_NODC_RHISN	MDLLGTTGAV	AISLYAALST	AYKGMQAIYA	LPTNTTAAST	PVTGSGAPPS
ROT_NODC_RHILV	MTLLATTSIA	AISLYAMLST	VYKSAQVFAH	RRTTISTTPA	KDIETNEVPS
ROT_NODC_AZOCA	MSVVDVIGLL	ATAAYVTLAS	AYKVQVQFIN.	VSSVTDVAGL	ESDALPLTPR
	M-----	A---Y--L--	-YK--Q----	-----	-----P-
ROT_NODC_BRAJA	VDVIVPCFNE	NPNTLAECLE	SIASQDYAGK	MQVYVDDGGS	ANRDVVAPVH
ROT_NODC_RHIS3	VDVIIPCYNE	GPLTLSACLD	SIANQEYAGK	LRVYVDDGGS	GNRDAVPIPH
ROT_NODC_RHISN	VDVIVPCYNE	DPRLSACLA	SIAKQDYAGE	LRVYVDDGGS	GNRNAIIPVH
ROT_NODC_RHILV	VDVIVPCFNE	DPIVLSECLA	SLAEQDYAGK	LRIYVDDGGS	KNRDAVVAQR
ROT_NODC_AZOCA	VDVIVPTENE	NSSTLLECVA	SICAQDYRGP	ITIVVDDGGS	TNKTSFHAVC
	VDVI-P--NE	----L--C--	S---Q-Y-G-	----VDDGGS	-N-----
ROT_NODC_BRAJA	RIYASDPRES	FILLANNVGK	RKAQIAAIRS	SSGDLVINVD	SDTILAADVV
ROT_NODC_RHIS3	DNYAGDPRFD	FILLPENVGK	RKAQIAAIRR	SSGDLVINVD	SDTTLASDVI
ROT_NODC_RHISN	DHYACDPRFR	FILMPKNVGK	RKAQIVAIRE	SSGDLVINVD	SDTTIAPDWW
ROT_NODC_RHILV	AAYADDEREN	FTILPKNVGK	RKA.IAAITQ	SSGDLILNVD	SDTTIAPDWW
ROT_NODC_AZOCA	DKYASDERFI	FVELDQNKGT	A.AQMEAIRR	TGDGLILNVD	SDTVIDKDVV
	---A-D-R--	F-----N-G-	--A-----	--GDL-LNVD	SDT-----DV-
ROT_NODC_BRAJA	TKLVLKMHDP	GIGAAMGQLI	ASNRNQTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAQAAR
ROT_NODC_RHIS3	RKLARKMQDP	AIGAAMGQLT	ASNRSDTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAQAAR
ROT_NODC_RHISN	TKLALKMYSP	AVGAAMGQLT	ASNRSDTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAQAAR
ROT_NODC_RHILV	SKLAHKMRDP	AVGAAMGQMK	ASNQADTWLT	RLIDMEYWLA	CNEERAQAAR
ROT_NODC_AZOCA	TKLASSMRAP	NVGGVMGQLV	AKNRERSWLT	RLIDMEYWLA	CNEERTJAQSR
	-KL---M--P	--G--MGQ--	A-N-----WLT	RLIDMEYWLA	CNEER--Q-R
ROT_NODC_BRAJA	FGAVMCCCGB	CAMYRRSALA	LLLDQYEAQF	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLK
ROT_NODC_RHIS3	FGAVMCCCGB	CAMYRRSLL	SLLDQYETQM	FRGKPSDFGE	DRHLTILMLE
ROT_NODC_RHISN	FGAVMCCCGB	CAMYRRSALL	LLLDKYETQL	FRGRPSDFGE	DRHLTILMLN
ROT_NODC_RHILV	FGAVMCCCGB	CAMYRRSAML	SLLDQYETQL	YRGKPSDFGE	DRHLTILMLS
ROT_NODC_AZOCA	FGVMCCCGB	CAMYRRSAIT	PLLAIEYHOT	FLGRPSNDFGE	DRHLTILMLK
	FG-VMCCCGB	CAMYRRS----	-LL--YE-Q-	F-G-PS-FGE	DRHLTILML-

FIGURA 2

ROT_NODC_BRAJA	AGFRTYVPD AIAATVVPHS LRPLYRQQLR WARSTFRDTF LAWRLLPGLD
ROT_NODC_RHIS3	AGFRTYVPD AIAATVVPDR LGPYLRQQLR WARSTFRDTL LAIRLLPGLD
ROT_NODC_RHISN	AGFRTYVPE AIAATVVPNS MGAYLRQQLR WARSTFRDTL LAIRLLPGLD
ROT_NODC_RHILV	AGFRTYVPS AIAATVVPDT MGAYLRQQLR WARSTFRDTL LALPVLPGLD
ROT_NODC_AZOCA	AGFRTGYVPS AVARTLVPDG .SPYLRQQLR WARSTYRDTA LALRIKKNLS
	AGFRT-YVP- A-A-T-VP-- --YLRQQLR WARST-RDT- LA-----
ROT_NODC_BRAJA	GYLTLDVIGQ NLGPLLALS SLAALAQLLI DGSIPWWTGL TIAAMTTVRC
ROT_NODC_RHIS3	RYLTLDVVQQ NLGPLLALS VIAGIAQFAL TATLPWPTIL VIAAMTIIRC
ROT_NODC_RHISN	RYLTLDVIGQ NLGPLLALS VLTGLAQAL TATVPWSTIL MIASMTMVR
ROT_NODC_RHILV	RYLTLDAIGQ NVGLLLALS VLTGLQFAL TATLPWWTIL VIGSMTLVRC
ROT_NODC_AZOCA	KYITFEICAQ NLGTALLVM TMSLSLTS GSQTPVIILG VVVGMSIIRC
	-Y-T-----Q N-G--LL--- -----P-----M--RC
ROT_NODC_BRAJA	CVAALRAREL REIGFSLHTP INICLLPLK AYALCTLSNS DWLSRKVTDM
ROT_NODC_RHIS3	TVTACRARQA REIGFSLHTF INIFLLPLK AYALCTLSNS DWLSRKVTATL
ROT_NODC_RHISN	GVAEFRAREL REIGFSLHTL LNVALLLPK AYALCTLSNS DWLSRGSPAA
ROT_NODC_RHILV	SVAAYRAREL REIGFALHTL VNIFLLPLK AYALCTLSNS DWLSRGSSVAI
ROT_NODC_AZOCA	CSVALIAKDF RFLYFIVHSA LNVLITPLK LYALLTIRDS RWLSRESS..
	-----RF-FF--H--- -N---I-PIK -YAL-T---S -WLSR-----
ROT_NODC_BRAJA	PTEEGKQPVI LHPNAGRSPA GVGRLLLFV RRRYRSLHRA WRRRRVFPVA
ROT_NODC_RHIS3	PNADKKQIIV ANPIAGVGTG SSGSAEAIRR TDLPRDSSKL VNADSVCSAE
ROT_NODC_RHISN	APNGVKDSPE PHC.....
ROT_NODC_RHILV	APTVGQGGAT KMP.....GR ATSEIAYSGE
ROT_NODC_AZOCA

ROT_NODC_BRAJA	IVRLSTNKWS ADDSGRKPSV IRARVGRPP VAPRH
ROT_NODC_RHIS3
ROT_NODC_RHISN
ROT_NODC_RHILV
ROT_NODC_AZOCA

FIGURA 2 CONTINÚA

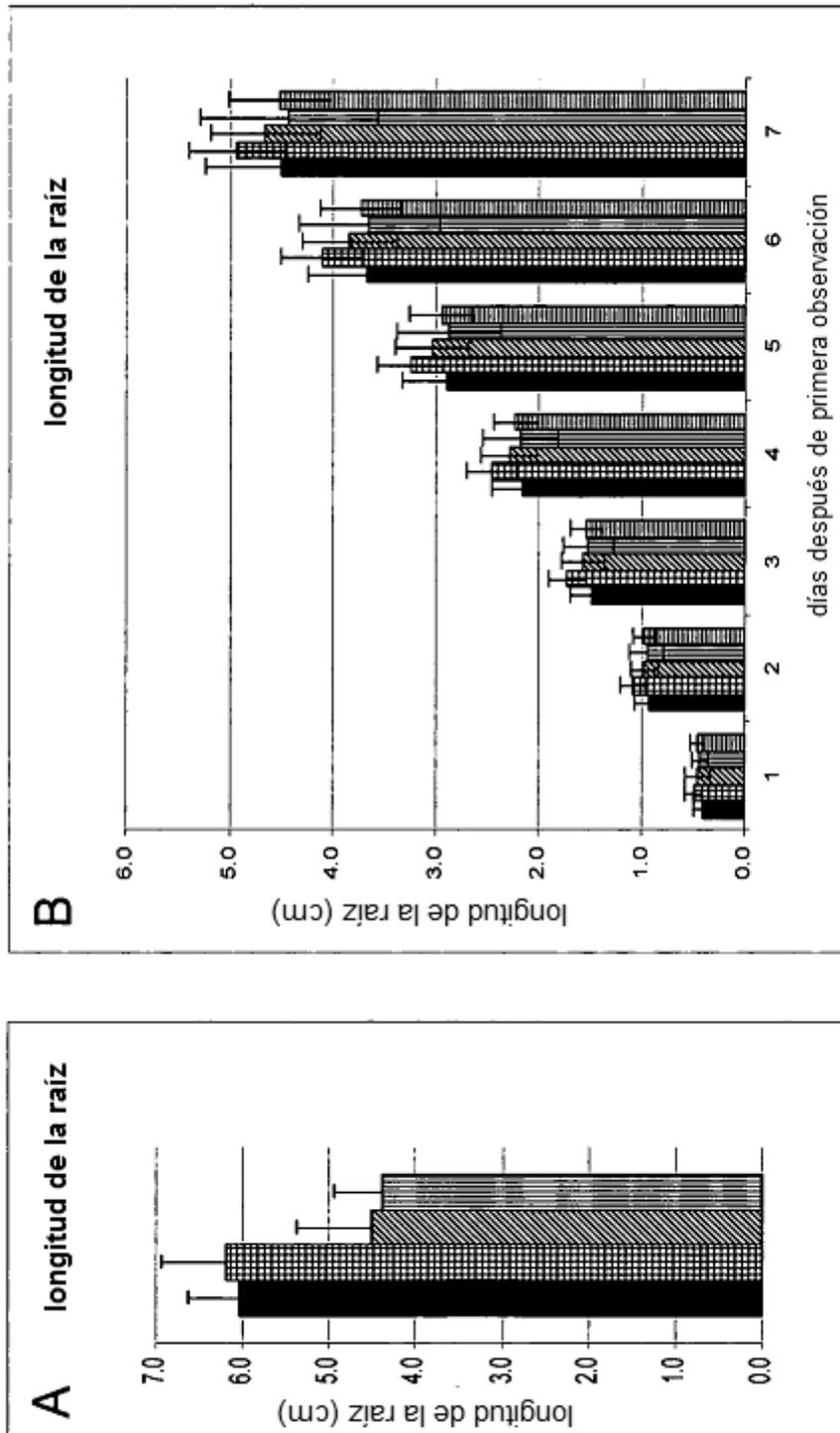


Figura 3

ES 2 548 166 T3

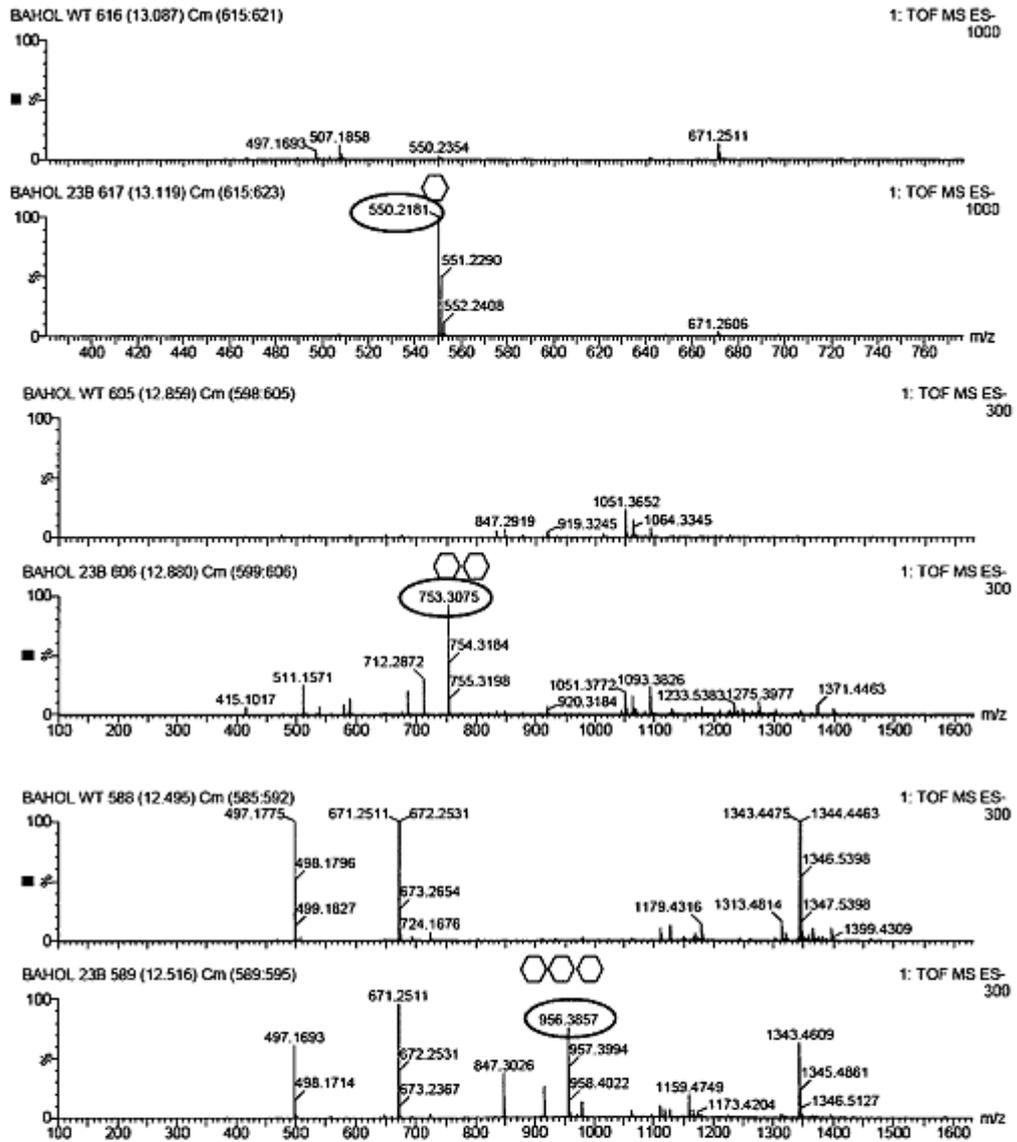


Figura 4

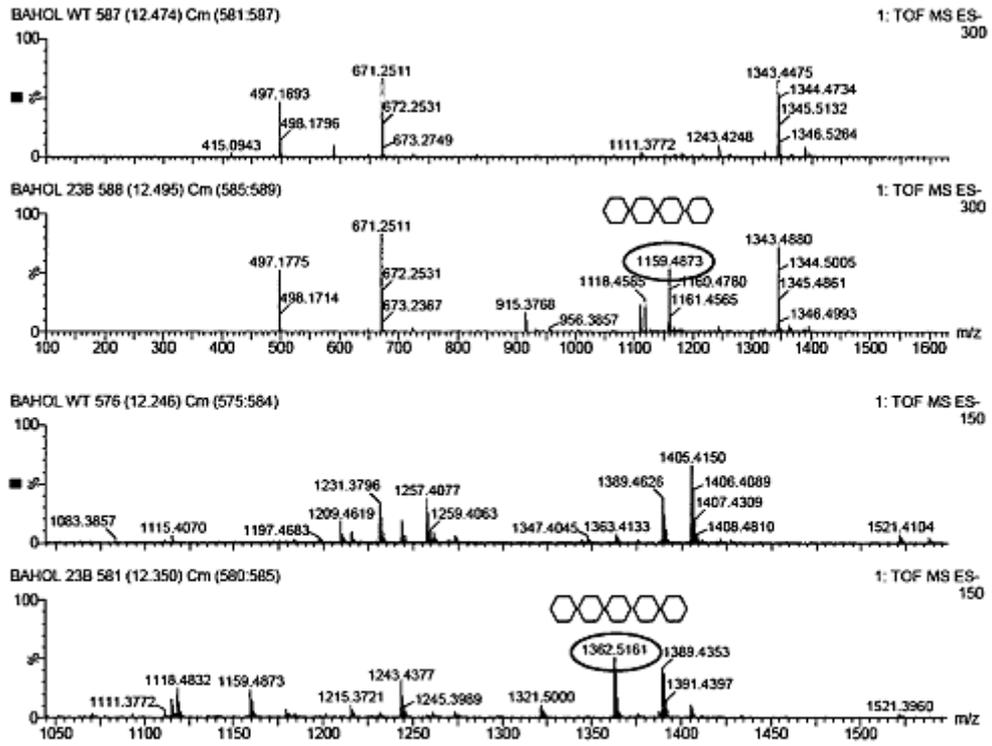


Figura 4, continúa