

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 687**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/EP2011/073627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO2012093032**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11799713 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2661498**

54 Título: **Promotores selectivos de fibras**

30 Prioridad:

04.01.2011 US 201161429615 P
05.01.2011 EP 11075002

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2017

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (50.0%)
J.E. Mommaertsiaan 14
1831 Diegem, BE y
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (50.0%)

72 Inventor/es:

MEULEWAETER, FRANK y
LLEWELLYN, DANNY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 613 687 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

Promotores selectivos de fibras

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la expresión de un gen de interés preferentemente en fibras de plantas, tales como plantas de algodón, usando un casete de expresión para regular la expresión preferencial en fibras en plantas de algodón.

Introducción a la invención

10 El algodón (*Gossypium* spp.) es la fibra textil natural más importante del mundo, y es también un cultivo oleaginoso importante. La producción de algodón proporciona unos ingresos para aproximadamente 100 millones de familias, y aproximadamente 150 países están implicados en la importación y exportación de algodón. Se estima que su impacto económico es aproximadamente 500 mil millones de dólares/año a nivel mundial. El consumo mundial de fibra de algodón es aproximadamente 115 millones de fardos, o aproximadamente 27 millones de toneladas métricas por año (National Cotton Council, <http://www.cotton.org/>, 2006). El género *Gossypium* es relativamente complejo, e incluye aproximadamente 45 especies diploides ($2n = 2x = 26$) y cinco especies tetraploides ($2n = 4x = 52$), mostrando todas ellas patrones de herencia disómicos. Las especies diploides ($2n = 26$) caen en ocho grupos genómicos (A-G, y K). El clado africano, que comprende los genomas A, B, E, y F, se producen de forma natural en África y Asia, mientras que el clado del genoma D es autóctono de las Américas. En Australia se encuentra un tercer clado diploide, que incluye C, G, y K. Las 52 especies cromosómicas, incluyendo *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense*, son alotetraploides naturales clásicos que surgen en el Nuevo Mundo a partir de la hibridación interespecífica entre una especie africana ancestral semejante al genoma A y una especie americana semejante al genoma D. Los parientes existentes más próximos de los progenitores tetraploides originales son las especies de genoma A *Gossypium herbaceum* (A1) y *Gossypium arboreum* (A2) y la especie de genoma D *Gossypium raimondii* (D5) "Ulbrich". Se estima que se ha producido poliploidización 1 a 2 millones de años atrás, dando lugar a cinco especies alotetraploides existentes. De forma interesante, la especie de genoma A produce fibra hilable y se cultiva en una escala limitada, mientras que la especie de genoma D no lo hace. Más del 95% del cultivo anual de algodón a nivel mundial es algodón *G. hirsutum*, Upland o Americano, y el algodón de fibra cortada extralarga o Pima (*G. barbadense*) da cuenta de menos del 2% (National Cotton Council, <http://www.cotton.org/>, 2006). La comprensión de la contribución de los subgenomas A y D a la expresión génica en los alotetraploides puede facilitar la mejora de los rasgos de las fibras, pero desafortunadamente la mayoría de la información de secuencia del algodón es actualmente muy escasa, y la decodificación de los genomas del algodón será una base para mejorar la comprensión de la importancia funcional y agronómica de la poliploidía y de la variación del tamaño genómico en el género *Gossypium*.

35 Cada fibra de algodón es una célula epidérmica individual diferenciada del óvulo. Se producen aproximadamente medio millón de fibras por cápsula de algodón, algunas formando vello y algunas formando tamo. El inicio de una célula epidérmica en fibra requiere un cambio en el destino de la célula, que es un proceso biológico fundamental que implica "interruptores" genéticos, fisiológicos y de desarrollo. Las mutaciones genéticas, la poliploidía, la polinización/fertilización, y la regulación hormonal pueden afectar al número de células que se desarrollan en fibras, o alterar las propiedades celulares de la fibra (vello frente a tamo). Sin embargo, no está claro cómo estos factores controlan cambios de la expresión génica que orquestan el patrón y ritmo en etapas tempranas del desarrollo de las fibras.

40 Por contra, el desarrollo morfológico de las fibras del algodón está bien documentado en la técnica. Las fibras de algodón sufren cuatro etapas de desarrollo que se solapan: iniciación de la célula de las fibras, elongación, biosíntesis de la pared secundaria, y maduración. La iniciación de las fibras es un proceso rápido. Las fibras esponjosas blancas comienzan a desarrollarse inmediatamente tras la antesis, y continúan hasta 3 días después de la antesis (DPA), que es seguido de la elongación de la célula de las fibras (hasta 20 DPA). La biosíntesis de la pared secundaria se inicia a alrededor de 15 dpa y continúa hasta 35 DPA, seguido de un proceso de maduración hasta 45-60 DPA. Las fibras de algodón derivan de células epidérmicas ovulares (tejidos maternos). Sin embargo, solamente ~25-30% de las células epidérmicas se diferencian en las fibras de tamo comercialmente importantes. La mayoría de las células no se diferencian en fibras, o no se desarrollan en fibras cortas o vello. Para las células comprometidas con el desarrollo de las fibras, la iniciación y elongación de las células son casi simultáneas en cada óvulo, indicando que los cambios en la expresión génica se orquestan durante la diferenciación y desarrollo de las fibras a través de mecanismos de señalización intercelular y/o control del tiempo.

La mejora genética de la producción y procesamiento de las fibras debería asegurar que este producto renovable natural se haga competitivo con las fibras sintéticas derivadas del petróleo.

55 Los estudios que identifican genes que están bajo regulación selectiva de tejido y regulación de desarrollo son importantes en la comprensión de los papeles de las proteínas en el desarrollo de las fibras y en la arquitectura de la pared celular. Además, tales genes, y específicamente sus elementos reguladores y promotores, proporcionan herramientas importantes para la modificación de las fibras a través de ingeniería genética. En muchos casos, sería

deseable que un transgén a regular desde el punto de vista del desarrollo tenga expresión exclusiva o específica en células de fibras en una etapa del desarrollo definida. Esta regulación se puede lograr de forma muy expeditiva mediante un promotor capaz de la expresión específica de las fibras. Por ejemplo, el documento WO96/040924 describe nuevos constructos de ADN que se pueden usar como sondas moleculares o que se pueden insertar en un hospedante vegetal para proporcionar modificación de la transcripción de una secuencia de ADN de interés durante diversas etapas del desarrollo de las fibras de algodón.

Los promotores útiles dirigen la expresión génica preferente o selectiva y fuertemente en fibras, es decir, fuerte y continuamente desde la fase de elongación de las fibras a través de la iniciación de la deposición de la pared secundaria hacia su terminación. La iniciación de la deposición de la pared secundaria se define como el tiempo cuando el peso seco/longitud unitaria de una fibra de algodón comienza a aumentar, o cuando el peso seco/área superficial unitaria de cualquier célula comienza a aumentar vía síntesis de nuevo material de la pared que contiene más de 40% (p/p) de celulosa. En el caso de la fibra de algodón de *G. hirsutum L.*, se espera que esto ocurra entre 14-17 DPA cuando las plantas de algodón se hacen crecer en condiciones típicas en el invernadero o en el campo (temperatura diurna de 26-34°C, temperatura nocturna de 20-26°C con luz, agua y nutrición mineral adecuados). Además, sería útil que el promotor selectivo de las fibras condujese la expresión génica solamente en las fibras, mientras que excluye o minimiza la expresión en otros tejidos. La presente invención se dirige a satisfacer estas necesidades.

Descripción de las figuras

Figura 1: Expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de FS18 en diferentes tejidos de algodón usando como referencia el gen de ARN helicasa de algodón. Los valores son el promedio de cuatro réplicas técnicas. FS18 se expresa mediante el desarrollo de las fibras tanto en las etapas de elongación como de engrosamiento de la pared celular.

Figura 2: Patrones de tinción GUS para un transformante representativo que contiene el constructo de promotor FS18-GUS. Obsérvese la tinción azul en fibras a 10 y 20 dpa, y una pequeña cantidad de tinción en una glándula epidérmica distribuida a lo largo de la superficie de pecíolos de hojas jóvenes. No se observó tinción en tricomas vegetativos.

Figura 3: (Para referencia solamente) La proteína de la pared celular rica en prolina, SCWPRP, se expresa a lo largo del desarrollo de las fibras tanto en las etapas de elongación como en la de engrosamiento de la pared celular, y no se detectó en ningún otro tejido ensayado. Expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativa de la SCWPRP en diferentes tejidos usando como referencia el gen de ARN helicasa de algodón. Los valores son el promedio de cuatro réplicas técnicas.

Figura 4: (Para referencia solamente) Patrones de tinción GUS para un transformante representativo que contiene el constructo del promotor SCWPRP-GUS. Se observa que hay una tinción más débil en la fibra a 10 dpa, y una tinción muy fuerte en las fibras a 20 dpa. También hubo una tinción fuerte en un tricoma glandular sobre la superficie de las hojas, pecíolos y tallos, pero no se observó tinción en los tricomas vegetativos.

Figura 5: Expresión del transcrito de GUS dirigido por el promotor FS18 en diferentes tejidos de algodón. Se dan los datos para dos plantas T1 para cada una de cuatro líneas independientes diferentes (Figura 5A a 5D) con expresión con respecto a la muestra de fibras a 30 dpa. En la Figura 5E se da el dato cuantitativo. En las hojas, hubo dos valores atípicos (resaltados) que se sospecha que son debidos a daño de las hojas debido a trips antes de la recogida de las muestras. Nd: no determinado.

Figura 6 (Para referencia solamente) Expresión del transcrito de GUS dirigido por el promotor SCW-PRP en diferentes tejidos de algodón. Se dan datos para dos plantas T1 diferentes para cada una de cuatro líneas independientes diferentes (Figura 6A a 6D) con expresión con respecto a la muestra de fibras a 30 dpa. En la Figura 6E se da el dato cuantitativo. Nd: no determinado.

Sumario de la invención

Un promotor de un gen que se expresa preferente o selectivamente en fibras durante la elongación y la deposición de la pared secundaria de plantas normales puede ser valioso para la manipulación genética de la fibra mediante ingeniería para lograr: (1) una productividad agrícola mejorada en condiciones normales y de estrés, y (2) propiedades mejoradas de las fibras, que dependen de la modificación durante la deposición de la pared secundaria. Los promotores descritos aquí permiten que se satisfagan estos objetivos a la vez que se evitan o minimizan los efectos pleiotrópicos sobre el crecimiento y desarrollo vegetales u otras etapas del desarrollo de las fibras que podrían reducir el beneficio de los efectos buscados.

En una realización, la invención proporciona un método para expresar un ARN biológicamente activo preferentemente en una célula de fibra de una planta productora de fibra durante el desarrollo de las fibras y que es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular, comprendiendo dicho método a. proporcionar las células de dichas plantas con un gen quimérico que comprende i. un promotor preferente de la célula de fibra seleccionado del siguiente grupo de secuencias: i) una secuencia nucleotídica que comprende la

secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, ii) una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, ii. una región de ADN heteróloga, y iii. opcionalmente una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación, y b. hacer crecer dichas plantas.

5 En una realización particular, el ARN biológicamente activo codifica una proteína de interés o un ARN antisentido, ribozima, microARN, ARN de horquilla bicatenario.

En una realización específica del método para expresar un ARN biológicamente activo en una célula de fibra de una planta productora de fibra, dicha planta es una planta de algodón.

10 En otra realización, la invención proporciona el uso de un promotor preferente de la fibra seleccionado del siguiente grupo de secuencias: i) una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, ii) una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 para la expresión preferente de un ARN biológicamente activo, a partir de un fragmento de ADN heterólogo enlazado operablemente, en células de fibra de una planta productora de fibra, tal como una planta de algodón, durante el desarrollo de las fibras y que es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular.

15 Descripción detallada de la invención

20 Se describen promotores y casetes de expresión que son capaces de transcribir una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una fibra, particularmente la transcripción comienza en la etapa de elongación de las fibras durante la etapa de la pared celular secundaria de la fibra, más particularmente en una fibra de algodón, y métodos para modificar, producir, y usar los mismos en plantas, particularmente plantas de algodón. También se describen composiciones, células hospedantes transformadas, tales como plantas, que contienen un casete de expresión que comprende estos promotores selectivos de la fibra. La secuencia nucleotídica representada en SEQ ID NO: 1 representa la secuencia nucleotídica del promotor del gen FS18 de *Gossypium hirsutum* relacionado con otras proteínas de transferencia de lípidos no específicas de la planta. La secuencia nucleotídica representada en SEQ ID NO: 2 representa la secuencia nucleotídica del promotor del gen de la proteína rica en prolina, designado nominalmente el gen SCW-PRP de *Gossypium hirsutum*.

30 Se describe un promotor preferente de la fibra o selectivo de la fibra que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1 desde la posición nucleotídica 1 a la posición nucleotídica 1375, para uso en un casete de expresión. Dicho promotor preferente de la fibra o selectivo de la fibra tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1 desde la posición nucleotídica 500 a la posición nucleotídica 1375. Dicho promotor preferente de la fibra o selectivo de la fibra puede tener la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1 desde la posición nucleotídica 700 a la posición nucleotídica 1375. SEQ ID NO: 1 representa la región en dirección 5' (es decir, situada en dirección 5' de) a partir del codón que codifica el primer aminoácido de la proteína FS18. Tal región promotora puede tener al menos alrededor de 300 a alrededor de 400 a alrededor de 500 pb, al menos alrededor de 1000 pb, al menos alrededor de 1100 pb, al menos alrededor de 1300 pb, en dirección 5' del codón de comienzo del gen FS18.

35 De este modo, se describe un promotor preferente o selectivo de la célula de fibra seleccionado del siguiente grupo de secuencias: i) una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, ii) una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 90%, particularmente al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, iii) una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de ADN de alrededor de 300 pb a alrededor de 1300 pb que se hibrida en condiciones restrictivas con una secuencia nucleotídica mencionada en i) o ii).

40 Los promotores preferentes de la fibra o selectivos de la fibra descritos aquí también pueden estar comprendidos en una molécula de ADN más grande.

Además, el promotor selectivo o preferente de la célula de fibra descrito es un promotor activo durante la etapa de elongación de la fibra hasta el final de la fase de la síntesis de la pared secundaria de la fibra.

45 Las frases "ADN", "secuencia de ADN", "secuencia de ácido nucleico", y "molécula de ácido nucleico" se refieren a una estructura física que comprende una disposición ordenada de nucleótidos. La secuencia de ADN o secuencia nucleotídica puede estar contenida en una molécula nucleotídica, vector, o similar, más grande. Además, la disposición ordenada de los ácidos nucleicos en estas secuencias se puede representar en forma de un listado de secuencia, figura, tabla, medio electrónico, o similar.

50 El término "expresión" se refiere a la transcripción de un gen para producir el ARN correspondiente. Se entiende que el ARN que se produce es un ARN biológicamente activo. Dicho ARN biológicamente activo puede ser ARNm, y la traducción de este ARNm produce el producto génico correspondiente (es decir, un péptido, polipéptido, o proteína). El ácido nucleico heterólogo, enlazado operablemente a los promotores descritos aquí, también puede codificar una ribozima, ARN antisentido, ARN sentido, ARN bicatenario o moléculas de microARN naturales o sintéticas, según reglas bien conocidas en la técnica, para reducir la expresión de otros genes comprendidos en la fibra, o incluso genes presentes en un patógeno o plaga que se alimenta de las fibras de la planta transgénica.

55

El término “proteína”, usado de forma intercambiable con el término “polipéptido”, como se usa aquí, describe un grupo de moléculas que consisten en más de 30 aminoácidos, mientras que el término “péptido” describe moléculas que consisten hasta 30 aminoácidos. Las proteínas y péptidos pueden formar además dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de (poli)péptido. Las moléculas proteicas o peptídicas que forman tales dímeros, trímeros, etc., pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de mayor orden correspondientes se denominan, en consecuencia, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Los términos “proteína” y “péptido” también se refieren a proteínas o péptidos modificados de forma natural, en los que la modificación se efectúa por ejemplo mediante glicosilación, acetilación, fosforilación y similar. Tales modificaciones son bien conocidas en la técnica. También se describe un gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN enlazadas operablemente: a) un promotor preferente de la célula de la fibra o un promotor selectivo de la célula de la fibra seleccionado de i) una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, o ii) una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica que comprende al menos 90%, particularmente al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, o iii) una secuencia nucleotídica que comprende un fragmento de ADN de alrededor de 300 pb a alrededor de 1300 pb que se hibrida en condiciones restrictivas con una secuencia nucleotídica mencionada en i) o ii); b) una región de ADN heteróloga que codifica un ARN biológicamente activo de interés; y opcionalmente c) una señal de terminación de la transcripción y de poliadenilación operable en células vegetales.

El término “heterólogo” se refiere a la relación entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteicas que derivan de diferentes fuentes. Por ejemplo, un promotor es heterólogo con respecto a una región de ADN enlazado operablemente, tal como una secuencia codificante, si tal combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Además, una secuencia particular puede ser “heteróloga” con respecto a una célula u organismo en el que se inserta (es decir, no aparece de forma natural en esa célula u organismo particular).

La expresión “gen quimérico” se refiere a cualquier gen que contiene: a) secuencias de ADN, que incluyen secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza, o b) secuencias que codifican partes de proteínas no juntas de forma natural, o c) partes de promotores que no están juntos de forma natural. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de la encontrada en la naturaleza. Un gen o polinucleótido o polipéptido “homólogo”, como se usa aquí, se refiere a un gen o polinucleótido o polipéptido que comparte similitud de secuencia con el gen o polinucleótido o polipéptido de interés.

La expresión “selectiva de la fibra” (o “transcripción”, o selectivo de la célula de la fibra, que es equivalente) significa la transcripción de una secuencia de ácido nucleico por un promotor (o un elemento regulador de la transcripción) de una manera tal que la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en fibras contribuye más de 10 veces, más de 20 veces, o incluso más de 100 veces que la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en la mayoría de los otros tejidos vegetales. En otras palabras, en la expresión selectiva de la fibra, la transcripción del ácido nucleico enlazado operablemente al promotor descrito aquí, en la fibra, contribuye al grado de la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente en cualquier tejido individual de la mayoría de otros tejidos vegetales.

La expresión “preferente de la fibra” (o “transcripción”, que es equivalente) significa la transcripción de una secuencia de ácido nucleico mediante un elemento regulador de la transcripción de manera que la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en fibras contribuye a entre 2 y 10 veces de la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en la mayoría de los otros tejidos vegetales. La expresión “potenciada para la fibra” es equivalente a la expresión “preferente de la fibra”. En otras palabras, en la expresión preferente de la fibra, la transcripción del ácido nucleico enlazado operablemente al promotor descrito en la fibra contribuye a entre 2 y 10 veces de la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico en cualquier tejido individual de la mayoría de otros tejidos vegetales.

Se encuentra que las secuencias de transcripción identificadas aquí median una expresión fuerte preferente o selectivamente en la fibra, más específicamente en la etapa de elongación y en la fase de pared celular secundaria de la fibra. Un casete de expresión que comprende SEQ ID NO: 1 y sus fragmentos, que tiene función promotora, dirige la expresión preferente o selectivamente en fibras durante la elongación de la fibra y la formación de la pared celular secundaria de la fibra. Más específicamente, un casete de expresión que comprende SEQ ID NO: 1 y sus fragmentos dirige la expresión en las fibras preferente o selectivamente entre 10-35 días post-antesis (dpa).

La frase “operablemente enlazada” se refiere a la disposición espacial funcional de dos o más regiones de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una región promotora puede estar situada con respecto a una secuencia de ácido nucleico de manera que la transcripción de una secuencia de ácido nucleico es dirigida por la región promotora. De este modo, una región promotora está “operablemente enlazada” a la secuencia de ácido nucleico. “Funcionalmente enlazada” es una expresión equivalente.

Como se usa aquí, “promotor” significa una región de secuencia de ADN que es esencial para el inicio de la transcripción del ADN, que da como resultado la generación de una molécula de ARN que es complementaria al ADN transcrito; esta región también se puede denominar como “región reguladora de 5’”. Los promotores están

situados habitualmente en dirección 5' de la secuencia codificante a transcribir, y tienen regiones que actúan como sitios de unión para ARN polimerasa II y otras proteínas, tales como factores de transcripción (factores proteicos que actúan en trans que regulan la transcripción), para iniciar la transcripción de un gen enlazado operablemente. Los propios promotores pueden contener subelementos (es decir, motivos promotores) tales como elementos en cis o dominios potenciadores que regulan la transcripción de genes enlazados operablemente. Los promotores descritos aquí pueden ser alterados para que contengan "ADN potenciador" para ayudar a elevar la expresión génica. Como se sabe en la técnica, ciertos elementos de ADN se pueden usar para potenciar la transcripción del ADN. Estos potenciadores se encuentran a menudo en 5' con respecto al comienzo de la transcripción en un promotor que funciona en células eucariotas, pero a menudo se pueden insertar en dirección 5' (5') o en dirección 3' (3') con respecto a la secuencia codificante. En algunos casos, estos elementos de ADN potenciadores de 5' son intrones. Entre los intrones que son útiles como ADN potenciador están los intrones de 5' del gen de actina 1 del arroz (véase el documento US5641876), el gen de actina 2 del arroz, el gen de la alcohol deshidrogenasa del maíz, el gen de la proteína 70 de choque térmico del maíz (véase el documento US5593874), el gen de shrunken 1 del maíz, el gen sensible a la luz 1 de *Solanum tuberosum*, el intrón de histona 4 de *Arabidopsis*, y el gen de la proteína de choque térmico 70 de *Petunia hybrida* (véase el documento US5659122). De este modo, como se contempla aquí, un promotor o región promotora incluye variaciones de promotores derivadas insertando o suprimiendo regiones reguladoras, sometiendo el promotor a mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, etc. La actividad o potencia de un promotor se puede medir en términos de las cantidades de ARN que produce, o de la cantidad de acumulación de proteína en una célula o tejido, con respecto a un promotor cuya actividad transcripcional se ha evaluado previamente.

La confirmación de la actividad promotora para un fragmento de promotor funcional en fibra se puede determinar por los expertos en la técnica, por ejemplo un constructo de promotor-informador que comprende la secuencia genómica enlazada operablemente a un gen informador de beta-glucuronidasa (GUS), como se explica adicionalmente aquí. La capacidad de expresión preferente de la fibra o selectiva de la fibra de los fragmentos identificados o generados de los promotores descritos se puede evaluar convenientemente enlazando operablemente tales moléculas de ADN a una secuencia nucleotídica que codifica un marcador fácilmente puntuable, por ejemplo un gen de beta-glucuronidasa, introduciendo tal gen quimérico en una planta, y analizando el patrón de expresión del marcador en fibras en comparación con el patrón de expresión del marcador en otras partes de la planta. Otros candidatos para un marcador (o un gen informador) son cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y proteínas con propiedades fluorescentes, tal como la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequora victoria*. Para definir una región promotora mínima, se elimina de la región 5' del gen de interés un segmento de ADN que representa la región promotora, y se enlaza operablemente a la secuencia codificante de un gen marcador (informador) mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Este gen informador se enlaza operablemente en dirección 3' del promotor, de manera que los transcritos que se inician en el promotor transcurren a través del gen informador. Los genes informadores codifican generalmente proteínas, que se miden fácilmente, incluyendo, pero sin limitarse a, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), beta-glucuronidasa (GUS), proteína fluorescente verde (GFP), beta-galactosidasa (beta-GAL), y luciferasa. El casete de expresión que contiene el gen informador bajo el control del promotor se puede introducir en un tipo celular apropiado mediante técnicas de transfección bien conocidas en la técnica. Para evaluar la proteína informadora, se preparan lisados celulares y se llevan a cabo ensayos apropiados, que son bien conocidos en la técnica, para la proteína informadora. Por ejemplo, si CAT fuese el gen informador de elección, los lisados de células transfectadas con constructos que contienen CAT bajo el control de un promotor bajo estudio se mezclan con cloranfenicol marcado isotópicamente y acetil-coenzima A (acetil-CoA). La enzima CAT transfiere el grupo acetilo desde la acetil-CoA a la posición 2 o 3 del cloranfenicol. La reacción se monitoriza mediante cromatografía de capa fina, que separa el cloranfenicol acetilado del material sin reaccionar. Los productos de la reacción se visualizan entonces mediante autorradiografía. El nivel de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que se obtuvo, que a su vez revela el nivel de expresión y la funcionalidad específica de la fibra del promotor o fragmento de promotor de interés. Este nivel de expresión también se puede comparar con otros promotores para determinar la potencia relativa del promotor bajo estudio. Una vez que se confirma la actividad y funcionalidad, se pueden emplear análisis mutacionales y/o de supresión adicionales para determinar la región mínima y/o secuencias requeridas para iniciar la transcripción. De este modo, las secuencias se pueden suprimir en el extremo 5' de la región promotora y/o en el extremo 3' de la región promotora, y se pueden introducir sustituciones nucleotídicas. Estos constructos se introducen entonces nuevamente en las células, y se determina su actividad y/o funcionalidad. En lugar de medir la actividad de una enzima informadora, también se puede determinar la actividad promotora transcripcional (y funcionalidad) midiendo el nivel de ARN que se produce. Este nivel de ARN, tal como ARNm, se puede medir ya sea en un único punto de tiempo o en múltiples puntos de tiempo, y como tal, el incremento en veces puede ser un incremento en veces promedio, o se puede derivar un valor extrapolado a partir de valores medidos experimentalmente. Puesto que es una comparación de niveles, se puede usar cualquier método que mida niveles de ARNm. En un aspecto preferido, el tejido u órganos comparados son una fibra o tejido de fibra con una hoja o tejido de hoja. En otro aspecto preferido, se comparan múltiples tejidos u órganos. Una comparación múltiple preferida es una fibra o tejido de fibra comparado con 2, 3, 4, o más tejidos u órganos seleccionados del grupo que consiste en tejido floral, ápice floral, polen, hoja, embrión, brote, hoja primordial, ápice del brote, raíz, punta de la raíz, tejido vascular y cotiledón. Como se usa aquí, los ejemplos de órganos vegetales son fibra, hoja, raíz, etc., y los ejemplos de tejidos son hojas primordiales, ápice del brote, tejido vascular, etc. La actividad o potencia de un promotor se puede medir en términos de la cantidad de acumulación de ARNm o de proteína que produce específicamente, con respecto a la cantidad total de ARNm o proteína. El promotor expresa

preferiblemente una secuencia de ácido nucleico enlazado operablemente a un nivel mayor que alrededor de 1%, alrededor de 2%, más preferiblemente mayor que alrededor de 5% del ARNm total. Como alternativa, la actividad o potencia de un promotor se puede expresar con respecto a un promotor bien caracterizado (para el que se evaluó previamente la actividad transcripcional).

- 5 Será claro aquí además que se pueden aislar promotores FS18 equivalentes de otras plantas, preferiblemente plantas productoras de fibra. Para este fin, se pueden aislar fragmentos de promotor ortólogos de otras plantas usando como sonda SEQ ID NO: 1 o un fragmento funcional que tiene al menos 300 nucleótidos consecutivos de la misma, e identificando secuencias nucleotídicas de estas otras plantas que se hibridan en las condiciones de hibridación descritas aquí. A título de ejemplo, se puede usar un promotor como se describe aquí para cribar una genoteca de un cultivo o planta de interés para aislar secuencias de promotor correspondientes según técnicas bien conocidas en la técnica. De este modo, una secuencia de promotor como se describe aquí se puede usar como una sonda para la hibridación con una genoteca en condiciones de restricción media a elevada. Como alternativa, se pueden aislar promotores equivalentes usando las secuencias codificantes de FS18 para cribar una genoteca (por ejemplo, mediante hibridación o *in silico*) de un cultivo de interés. Cuando se obtiene identidad suficiente entre las secuencias codificantes (como regla, identidad mayor de 85%), entonces las regiones promotoras se pueden aislar en dirección 5' de los genes FS18 ortólogos.

La hibridación se produce cuando las dos moléculas de ácido nucleico se recombinan entre sí en condiciones apropiadas. La hibridación de ácidos nucleicos es una técnica bien conocida por los expertos en la técnica de manipulación de ADN. La propiedad de hibridación de un par dado de ácidos nucleicos es una indicación de su similitud o identidad. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones restrictivas. La frase "que se hibrida específicamente a" se refiere a la unión, formación de dúplex, o hibridación de una molécula solamente a una secuencia nucleotídica particular en condiciones restrictivas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana, y abarca errores de apareamiento menores que se pueden ajustar reduciendo la restricción del medio de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana. "Condiciones de hibridación restrictivas" y "condiciones de lavado de hibridación restrictivas", en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como la hibridación Southern y Northern, dependen de la secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros medioambientales. Un ejemplo de condiciones de lavado muy restrictivas es NaCl 0,15 M a 72°C durante alrededor de 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado con 0,2 X SSC a 65°C durante 15 minutos. A menudo, un lavado de restricción elevada es precedido por un lavado de baja restricción para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un lavado de restricción media ejemplar para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1 X SSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de baja restricción ejemplar para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 4 a 6 X SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, alrededor de 10 a 50 nucleótidos), las condiciones restrictivas implican típicamente concentraciones de sal de menos de alrededor de 1,5 M, más preferiblemente alrededor de 0,01 a 1,0 M, de concentración de ion Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente al menos alrededor de 30°C y al menos alrededor de 60°C para sondas largas (por ejemplo, >50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2 X (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones restrictivas todavía son sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancias idénticas. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codones máxima permitida por el código genético. Se seleccionan condiciones muy restrictivas para que sean iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones restrictivas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o Northern es formamida al 50%, por ejemplo hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1 x SSC a 60 a 65°C. Las condiciones de baja restricción ejemplares incluyen hibridación con una disolución amortiguadora de formamida al 30 a 35%, NaCl 1 M, SDS al 1% (dodecilsulfato de sodio) a 37°C, y un lavado en 1 X a 2 X SSC (20 X SSC = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a 50 a 55°C. Las condiciones de restricción moderada ejemplares incluyen hibridación en formamida al 40 a 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,5 X a 1 X SSC a 55 a 60°C. Lo siguiente son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que se pueden usar para clonar secuencias nucleotídicas ortólogas que son sustancialmente idénticas a secuencias nucleotídicas de referencia de la presente enseñanza: una secuencia nucleotídica de referencia se hibrida preferiblemente a una secuencia nucleotídica de referencia en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 2 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C, de forma más deseable en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 1 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C, todavía más deseablemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C, incluso más deseablemente todavía en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0,1 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C.

Se describen promotores selectivos de fibra que comprenden una secuencia nucleotídica que tiene al menos 40%, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95% de identidad de secuencia con los promotores y regiones promotoras descritos aquí, y también referidos como variantes. El término

“variante”, con respecto a las secuencias nucleotídicas reguladoras de la transcripción SEQ ID NO: 1, pretende significar secuencias sustancialmente similares. Las variantes alélicas de origen natural, tales como estas, se pueden identificar con el uso de tecnologías de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se resumen aquí antes. Las secuencias nucleotídicas variantes también incluyen secuencias nucleotídicas derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, usando mutagénesis de SEQ ID NO: 1 dirigida al sitio. Generalmente, las variantes de las secuencias nucleotídicas tendrán al menos 40%, 50%, 60%, hasta 70%, por ejemplo, preferiblemente 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, hasta 79%, generalmente al menos 80%, por ejemplo, 81% a 84%, al menos 85%, por ejemplo, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, hasta 98% y 99% de identidad de secuencia nucleotídica con la secuencia nucleotídica nativa (tipo salvaje o endógena). Los derivados de las moléculas de ADN que se describen aquí pueden incluir, pero no se limitan a, supresiones de secuencia, mutaciones de un solo punto o de múltiples puntos, alteraciones en un sitio de enzima de restricción particular, adición de elementos funcionales, u otro medio de modificación molecular que pueda potenciar o de otro modo alterar o promover la expresión. Las técnicas para obtener tales derivados son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, J. F. Sambrook, D. W. Russell, y N. Irwin (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición Volúmenes 1, 2, y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Por ejemplo, un experto normal en la técnica puede delimitar los elementos funcionales en los promotores descritos aquí, y suprimir cualesquiera elementos no esenciales. Los elementos funcionales se pueden modificar o combinar para incrementar la utilidad o expresión de las secuencias descritas para cualquier aplicación particular. Los expertos en la técnica están familiarizados con los materiales de fuentes estándar que describen condiciones específicas y procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), así como la generación de organismos recombinantes y el cribado y aislamiento de moléculas de ADN. Como se usa aquí, la expresión “porcentaje de identidad de secuencia” se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos entre dos segmentos de una ventana de ADN alineado óptimamente. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación es bien conocido por los expertos en la técnica, y se puede llevar a cabo mediante herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Waterman, M. S. *Introduction to Computational Biology: Maps, sequences and genomes*. Chapman & Hall. Londres (1995), el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970), la búsqueda mediante el método de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci., 85:2444 (1988), y preferiblemente mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos, tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA, disponibles como parte del GCG (marca registrada), Paquete Wisconsin (marca registrada de Accelrys Inc., San Diego, Calif.). Una “fracción de identidad”, para segmentos alineados y una secuencia de ensayo y una secuencia de referencia, es el número de componentes idénticos que se comparten por las dos secuencias alineadas, dividido entre el número total de componentes en el segmento de la secuencia de referencia, es decir, toda la secuencia de referencia o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad por 100. La comparación de una o más secuencias de ADN puede ser con una secuencia de ADN de longitud completa o con una porción de la misma, o con una secuencia de ADN más larga.

Los promotores descritos en la presente se pueden enlazar de forma operable a una secuencia de ácido nucleico que es heteróloga con respecto al promotor. La secuencia de ácido nucleico puede ser generalmente cualquier secuencia de ácido nucleico para la que se desea un mayor nivel o un nivel alterado (por ejemplo, en un órgano diferente) o un nivel reducido de transcripción. La secuencia de ácido nucleico puede codificar, por ejemplo, una proteína de interés. Las proteínas ejemplares de interés son, por ejemplo, polipéptidos que pueden proporcionar una característica agrícola o industrialmente importante en una fibra. Las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas adecuadas que codifican una proteína de interés incluyen, sin limitación, aquellas que codifican quitina sintasas, la proteína C de nodulación, sacarosa sintasa, expansinas, callosa sintasas, proteínas que modifican la pared de la célula de la fibra, y similares.

También se describe un vector, en particular un vector recombinante que comprende un casete de expresión como se describe aquí. Un “vector recombinante” se refiere a cualquier agente, tal como un plásmido, cósmido, virus, secuencia que se replica de forma autónoma, fago, o secuencia nucleotídica de ARN o ADN lineal monocatenario, circular monocatenario, lineal bicatenario, o circular bicatenario. El vector recombinante puede derivar de cualquier fuente, y es capaz de una integración genómica o una replicación autónoma. De este modo, en un vector recombinante se puede proporcionar cualquiera de los promotores y secuencias de ácidos nucleicos heterólogas descritos anteriormente. Un vector recombinante comprende típicamente, en una orientación 5' a 3': un promotor para dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico, y una secuencia de ácido nucleico. El vector recombinante puede comprender además un terminador transcripcional en 3', una señal de poliadenilación en 3', otras secuencias de ácidos nucleicos sin traducir, secuencias de ácidos nucleicos de tránsito y seleccionadoras de dianas, marcadores seleccionables, potenciadores, y operadores, según se desee. La frase “5' UTR” se refiere a la región no traducida de ADN en dirección 5', o 5' de la región codificante de un gen, y “3' UTR” se refiere a la región no traducida de ADN en dirección 3', o 3' de la región codificante de un gen. Los medios para preparar vectores recombinantes son bien conocidos en la técnica. Los métodos para obtener vectores recombinantes particularmente adecuados para la transformación vegetal se describen en los documentos US4971908, US4940835, US4769061 y US4757011. Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son bien conocidos en la técnica, e incluyen vectores derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens*. También se pueden proporcionar uno o más promotores adicionales en el vector recombinante. Estos

promotores pueden estar enlazados operablemente, por ejemplo, sin limitación, a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas anteriormente. Como alternativa, los promotores pueden estar enlazados operablemente a otras secuencias de ácidos nucleicos, tales como aquellas que codifican péptidos de tránsito, proteínas de marcadores seleccionables, o secuencias antisentido. Estos promotores adicionales se pueden seleccionar en base al tipo celular en el que se insertará el vector. También, en la técnica se muestran igualmente promotores que funcionan en bacterias, levadura, y plantas. Los promotores adicionales se pueden seleccionar también en base a sus características reguladoras. Los ejemplos de tales características incluyen potenciación de la actividad transcripcional, inducibilidad, especificidad tisular, y especificidad de la etapa de desarrollo.

El vector recombinante también puede contener una o más secuencias de ácidos nucleicos adicionales. Estas secuencias de ácidos nucleicos adicionales pueden ser generalmente cualesquiera secuencias adecuadas para uso en un vector recombinante. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos, y formas modificadas de las mismas, descritas anteriormente. Las secuencias de ácidos nucleicos estructurales adicionales también se pueden enlazar operablemente a cualquiera de los promotores descritos anteriormente. La una o más secuencias de ácidos nucleicos estructurales se pueden enlazar cada una de forma operable a promotores distintos. Como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos estructurales se pueden enlazar operablemente a un solo promotor (es decir, un solo operón).

La actual enseñanza también se dirige a plantas transgénicas y células hospedantes transformadas, tales como células vegetales, que comprenden un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga como se describe aquí. También se pueden introducir en la planta o en la célula hospedante otras secuencias de ácidos nucleicos, junto con el promotor y la secuencia de ácido nucleico estructural, por ejemplo también en relación con el vector descrito. Estas otras secuencias pueden incluir terminadores transcripcionales en 3', señales de poliadenilación en 3', u otras secuencias de ácidos nucleicos no traducidas, secuencias de tránsito o seleccionadoras de diana, marcadores seleccionables, potenciadores, y operadores. Se describen anteriormente secuencias de ácidos nucleicos preferidas de la presente enseñanza, incluyendo vectores recombinantes, secuencias de ácidos nucleicos estructurales, promotores, y otros elementos reguladores.

El término "transformación" se refiere aquí a la introducción (o transferencia) de ácido nucleico a un organismo receptor tal como una planta o cualesquiera partes o tejidos vegetales, incluyendo células vegetales, protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen. Las plantas que contienen la secuencia de ácido nucleico transformada se denominan "plantas transgénicas". Transformada, transgénica y recombinante se refieren a un organismo hospedante, tal como una planta, en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga (por ejemplo, un casete de expresión o un vector recombinante). El ácido nucleico se puede integrar de forma estable en el genoma de la planta.

Como se usa aquí, la frase "planta transgénica" se refiere a una planta que tiene un ácido nucleico introducido que se ha introducido de forma estable en un genoma de la planta, por ejemplo los genomas nuclear o del plastidio.

En la presente enseñanza, uno o más componentes de una planta, célula, u organismo se comparan con una planta, célula, u organismo que tiene un "antecedente genético similar". En un aspecto preferido, un "antecedente genético similar" es un antecedente en el que los organismos que se comparan comparten alrededor de 50% o más de su material genético nuclear. En un aspecto más preferido, un antecedente genético similar es un antecedente en el que los organismos que se comparan comparten alrededor de 75% o más, incluso más preferiblemente alrededor de 90% o más, de su material genético nuclear. En otro aspecto incluso más preferible, un antecedente genético similar es un antecedente en el que los organismos que se comparan son plantas, y las plantas son isogénicas excepto para cualquier material genético introducido originalmente usando técnicas de transformación vegetal.

Una célula hospedante transformada puede ser generalmente cualquier célula que sea compatible con la presente enseñanza. Una planta o célula hospedante transformada puede ser o puede derivar de una planta monocotiledónea o de una planta dicotiledónea.

En consecuencia, la presente enseñanza describe células vegetales transgénicas y plantas transgénicas que comprenden el promotor descrito o el gen quimérico descrito, es decir, la secuencia de promotor descrita aquí, enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica ARN biológicamente activo; o que comprende la célula vegetal descrita. Las secuencias de promotor preferidas y los productos de expresión de interés y otros elementos reguladores se describen anteriormente.

Una planta transgénica se puede producir introduciendo la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos como se describe anteriormente en plantas o células vegetales. "Introduciendo", en relación con la presente solicitud, se refiere a la colocación de material genético en una célula vegetal o planta por medios artificiales. Esto se puede efectuar mediante cualquier método conocido en la técnica para introducir ARN o ADN en células vegetales, protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones, polen y microsporas, otros tejidos vegetales, o plantas completas. Más particularmente, "introducir" significa integrar de forma estable en el genoma de la planta.

Las plantas que contienen secuencia de ácido nucleico transformada se denominan "plantas transgénicas".

Transgénica y recombinante se refiere a un organismo hospedante, tal como una planta, en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga (por ejemplo, el promotor, el gen quimérico o el vector como se describen aquí). El ácido nucleico se puede integrar de forma estable en el genoma de la planta.

5 Existe un número de métodos para introducir ADN en las células vegetales o en las plantas, mediante transformación. La transformación de algodón mediada por *Agrobacterium* se ha descrito, por ejemplo, en la patente US 5.004.863, en la patente US 6.483.013, y en el documento WO2000/71733.

10 Las plantas también se pueden transformar mediante bombardeo con partículas: partículas de oro o de volframio se revisten con ADN, y después se disparan en células vegetales jóvenes o embriones vegetales. Este método también permite la transformación de plastidios vegetales. La transformación del algodón mediante bombardeo con partículas se da a conocer, por ejemplo, en el documento WO 92/15675.

15 La transformación vírica (transducción) se puede usar para la expresión transitoria o estable de un gen, dependiendo de la naturaleza del genoma del virus. El material genético deseado se empaqueta en un virus vegetal adecuado, y se deja que el virus modificado infecte la planta. La progenie de las plantas infectadas está libre de virus, y también está libre del gen insertado. Los métodos adecuados para la transformación vírica se describen o se detallan adicionalmente en, por ejemplo, los documentos WO 90/12107, WO 03/052108 o WO 2005/098004.

En la patente US 7.172.881 se pueden encontrar también protocolos de transformación adicionales.

La célula vegetal puede derivar de cualquier planta productora de tricomas, tales como *Gossypium* (algodón), *Nicotiana*, *Arabidopsis*, así como las plantas productoras de fibra descritas anteriormente. En un ejemplo, la célula vegetal deriva de *Gossypium*.

20 “Algodón” o “planta de algodón”, como se usa aquí, puede ser cualquier variedad útil para hacer crecer algodón. Las variedades de algodón usadas más habitualmente son *Gossypium barbadense*, *G. hirsutum*, *G. arboreum* y *G. herbaceum*. Otras variedades incluyen *G. africanum* y *G. raimondii*. También se incluyen la progenie procedente de cruces de cualquiera de las especies anteriores con otras especies, o cruces entre tales especies.

25 Una célula vegetal de algodón puede ser cualquier célula que comprende esencialmente la información genética necesaria para definir una planta de algodón, que se puede complementar, aparte del gen quimérico descrito aquí, con uno o más transgenes adicionales. Las células pueden derivar de los diversos órganos y/o tejidos que forman una planta de algodón, incluyendo, pero sin limitarse a, frutos, semillas, embriones, tejido reproductivo, regiones meristémicas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, flores, tejido vascular, gametocitos, esporocitos, polen, y microsporas. Aunque ciertas células vegetales pueden ser capaces de regenerarse en plantas completas, en algunos casos dichas células vegetales no se pueden desarrollar o regenerar adicionalmente en una planta completa.

30

La presente enseñanza también describe una planta transgénica que consiste en la célula de la planta transgénica descrita aquí anteriormente, o que comprende el gen quimérico o el vector descrito aquí, integrado en el genoma de la planta. Esto se puede efectuar mediante protocolos de transformación descritos en cualquier otra parte en esta solicitud.

35

La presente enseñanza también describe una semilla generada a partir de una planta transgénica descrita aquí, en el que la semilla comprende el gen quimérico descrito aquí.

La semilla se forma mediante una planta embrionaria encerrada junto con nutrientes almacenados mediante una cubierta de semilla. Es el producto del óvulo que ha madurado de plantas gimnospermas y angiospermas, plantas estas últimas a las que pertenece el algodón, que se produce tras la fertilización y hasta cierto grado el crecimiento dentro de la planta madre.

40

Se describen adicionalmente aquí fibras de algodón y aceite de semilla de algodón obtenibles u obtenidos a partir de las plantas descritas aquí. Las fibras de algodón descritas aquí se pueden distinguir de otras fibras aplicando el método de detección descrito en el documento WO2010/015423 y comprobando la presencia del promotor o gen quimérico descrito aquí en las fibras. En consecuencia, el promotor también se puede usar para hacer el seguimiento de las paredes celulares, en particular fibras de algodón.

45

También se describen aquí hilos y materiales textiles obtenidos de las fibras, así como material alimentario y pienso que comprende o está hecho del aceite de semilla de algodón descrito aquí. También se describe un método para obtener aceite de semilla de algodón, que comprende cosechar las semillas de algodón de la planta de algodón descrita aquí, y extraer dicho aceite de dichas semillas. Además, también se describe un método para producir fibras de algodón, que comprende hacer crecer la planta de algodón descrita aquí y cosechar algodón a partir de dichas plantas de algodón.

50

La presente enseñanza también describe un método para producir una célula vegetal o planta transformada, que comprende introducir el gen quimérico descrito en una célula vegetal progenitora para producir una célula vegetal transformada, y opcionalmente regenerar una planta a partir de dicha célula vegetal transformada.

55

La enseñanza describe además el uso de un gen quimérico descrito aquí, para producir una célula vegetal transformada.

También se describe un método para producir fibra alterada, que comprende (i) hacer crecer la planta descrita aquí, y (ii) cosechar la fibra a partir de la planta.

- 5 También se describe fibra alterada cosechada de una planta como se describe anteriormente, o producida mediante el método de la presente invención.

10 En otro aspecto, la presente enseñanza describe un método para producir una semilla que comprende el gen quimérico descrito aquí, que comprende (a) hacer crecer una planta transgénica que comprende el gen quimérico descrito aquí o el vector descrito aquí, una planta transgénica descrita aquí o una planta transgénica obtenida mediante el método descrito aquí, en el que dicha planta transgénica produce dicha semilla, y dicho gen quimérico está comprendido en dicha semilla, y (b) aislar dicha semilla de dicha planta transgénica.

En un ejemplo del método para producir una planta transgénica o el método para producir una semilla, la planta es una planta de algodón como se describe en cualquier otra parte en esta solicitud.

15 La presente enseñanza describe un método para efectuar la expresión preferente de la fibra de un ARN biológicamente activo en algodón durante el desarrollo de la fibra y que es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular, que comprende introducir en el genoma de una planta de algodón un gen quimérico descrito aquí o un vector descrito aquí que comprende un promotor preferente de la célula de fibra seleccionado del siguiente grupo de secuencias nucleotídicas: (a) una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID No. 1; y (b) una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 1; o proporcionar la planta transgénica descrita aquí.

En un aspecto adicional, la presente enseñanza describe un método para alterar las propiedades de la fibra en una planta de algodón, que comprende introducir el gen quimérico descrito aquí o el vector descrito aquí en el genoma de una planta de algodón; o proporcionar la planta transgénica descrita aquí.

- 25 En un ejemplo, el método comprende además hacer crecer dicha planta hasta que se generan semillas.

30 En otro ejemplo basado en la etapa adicional anterior, el método es para incrementar el rendimiento de algodón a partir de una planta de algodón, y comprende además cosechar el algodón producido por dicha planta de algodón. En otras palabras, se describe aquí un método para incrementar el rendimiento de algodón de una planta de algodón, que comprende introducir en el genoma de una planta de algodón el gen quimérico descrito aquí o el vector descrito aquí; o proporcionar la planta transgénica descrita aquí; hacer crecer dicha planta hasta que se generan semillas; y cosechar el algodón producido por dicha planta de algodón.

35 La expresión "incrementar el rendimiento", en relación con la presente enseñanza, se refiere a un incremento en la producción de fibras de algodón, que se puede lograr, por ejemplo, incrementando el número de fibras producidas en una semilla de algodón, la longitud de las fibras o la resistencia de las fibras. Se han descrito anteriormente los genes y sus productos de expresión implicados en conferir estas propiedades.

40 La presente enseñanza también describe el uso del gen quimérico descrito aquí, el vector descrito aquí o la planta transgénica o célula vegetal descrita aquí para la expresión preferente de la fibra o selectiva de la fibra de un producto en algodón, para alterar las propiedades de la fibra en algodón, o para incrementar el rendimiento de algodón. Las definiciones y otros ejemplos descritos anteriormente para otros aspectos descritos aquí se aplican igualmente al presente aspecto.

45 Los siguientes ejemplos no limitantes describen los métodos para aislar los promotores selectivos de fibra. Excepto que se establezca de otro modo en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como se describe en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, y en Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular vegetal se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK.

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

- 50 SEQ ID NO: 1: secuencia de promotor derivada del gen FS18 de algodón
 SEQ ID NO: 2: secuencia de promotor derivada del gen SCW-PRP de algodón
 SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 18: secuencias artificiales y cebadores
 SEQ ID NO: 19: secuencia de ácido nucleico que codifica el gen de quitina sintasa 2 de *Neurospora crassa*

(Din y Yarden, 1994)

SEQ ID NO: 20: señal dirigida al aparato de Golgi de Arabidopsis thaliana (Pagny et al., 2003)

SEQ ID NO: 21: secuencia codificante del mutante doble del gen de 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa (epsps) de Zea mays (Lebrun et al., 1997)

5 SEQ ID NO: 22: secuencia codificante del gen bar (gen de fosfotricina acetiltransferasa) de Streptomyces hygroscopicus (Thompson et al., 1987)

SEQ ID NO: 23: secuencia codificante del gen gfa (glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa) de E. coli (Frohberg y Essigmann, 2006)

Ejemplos

10 Ejemplo 1

1. Introducción y estrategia general para la identificación de promotores selectivos de fibra

En nuestra investigación, pretendimos aislar los promotores de algodón específicos para determinar su capacidad para conducir la expresión de genes quiméricos selectivamente en fibras, preferiblemente con una actividad que comienza en la etapa de elongación de la fibra y que continúa hasta la síntesis de la pared celular secundaria de la fibra. En nuestra estrategia experimental, se usaron tanto herramientas genómicas como un enfoque de gen candidato para aislar y ensayar un número de promotores de algodón. Se usó el análisis bioinformático de datos de expresión de genes existentes (colecciones EST, presentación diferencial, análisis de micromatrices, y análisis de genes candidatos) para identificar genes candidatos potenciales que se expresan predominantemente o exclusivamente en fibras de algodón. En nuestro análisis inicial, se generó una primera lista de alrededor de 450 genes potenciales expresados por fibras. Esta lista se estrechó mediante un proceso de examen de la frecuencia de aparición de ESTs homólogos a aquellos genes en bases de datos públicas (como un sustituto de la abundancia del transcrito). Subsiguientemente, se usó RT-PCR cuantitativa y/o transferencia Northern en un intervalo de tipos tisulares para validar los perfiles de expresión deducidos a partir de la bibliografía o de otros datos, inicialmente comparando solo los niveles de expresión en dos etapas de la fibra diferentes con los niveles de expresión en hojas, tallos y raíces de las mismas plantas usando los ARN o tejidos disponibles. La comparación con los niveles de expresión en tejidos que no son de fibra se usó para establecer que los promotores se expresaron selectiva o preferentemente en las fibras. A continuación, las regiones promotoras de los candidatos se aislaron a través del cribado de la biblioteca de BAC (filtros de BAC disponibles de Clemson Genomics Institute de *G. hirsutum* cv. *Acala Maxxa*), o, si estaba disponible el ADNc de longitud completa o la secuencia de ADNc de consenso incierta, mediante PCR inversa o kits de amplificación Genome Walker. Las secuencias de promotor resultantes se enlazaron a un gen informador (por ejemplo GUS) y, en una primera etapa, se evaluaron mediante bombardeo con partículas de tejidos de óvulo de algodón para verificar que el constructo era funcional. En una segunda etapa, se generaron plantas de algodón transgénicas vía transformación con *Agrobacterium* para introducir en el algodón los genes quiméricos que comprenden los constructos de promotor-gen informador. Finalmente, los perfiles de expresión en las plantas transformadas se analizaron mediante tinción con GUS cuantitativa e histoquímica, para confirmar la especificidad de la fibra del promotor y su expresión.

2. Aislamiento del promotor FS18

FS18 fue un gen expresado en fibras identificado originalmente por Orford y Timmis (1997) Theor Appl Genet 94: 909-918, mediante cribado diferencial de los ADNc de fibras de *G. hirsutum*. El clon de ADNc inicial tenía una longitud de solamente 97 pb, y formaba parte de un transcrito que se estimó que tenía alrededor de 700 bases de longitud. Éste se usó entonces como una sonda en el cribado de bibliotecas para obtener dos clones de ADNc poliadenilados más largos de 616 pb y 610 pb, respectivamente, denominados FS18 y FS18A (Orford et al. (1999) Theor Appl Genet 98: 757-764. Las proteínas codificadas por los genes que corresponden a FS18 y FS18A fueron probablemente proteínas de transferencia de lípidos no específicas, muchas de las cuales se expresaron en fibras.

Al usar las secuencias nucleotídicas FS18 o FS18A en una búsqueda Megablast con parámetros por defecto y un valor E de corte de E-100 de la base de datos EST de la especie *Gossypium* de Genbank más reciente (Edición No: 177), que incluye todos los ESTs de *Gossypium* diploides y tetraploides, fue manifiesto que estos genes semejantes a FS18 probablemente eran relativamente específicos de la fibra y se expresaban en fibras de la etapa de elongación y de engrosamiento de la SCW temprana. Sin embargo, este análisis no distinguió entre los dos genes homólogos putativos en algodón tetraploide. Usando un enfoque más específico buscando (BLASTn) solamente los ESTs de *G. hirsutum* en Genbank con una región específica del gen de aproximadamente 150 pb desde la mitad del ADNc en la que se produjo la mayor variación de secuencia entre los dos genes (75% de identidad en esta región), se obtuvo una mejor imagen de los patrones de expresión de estos dos genes a un nivel tisular bruto. Megablast solamente detectó 10 ESTs con similitud elevada con FS18A (valor de E menor que E-50), mientras que detectó 294 ESTs para FS18, de manera que este último gen fue claramente el gen más altamente expresado en fibras de algodón y una diana más adecuada para el aislamiento del promotor. Ambos genes parecen ser selectivos de la fibra, y están igualmente representados en bibliotecas de ADNc tanto de fibra en elongación (0-10 dpa) como de

fibra de etapa de SCW temprana alrededor de 20-22 dpa.

Secuencias usadas para búsquedas de Megablast específicas del gen:

1) FS18

5'-

GATGGCTTAGTCGGCCTCCCACGCTGCCTTCCTTTTTTGT CAGGGAATGGTGATGG
TGCTGATGCCACAGGTTGCTGTGCCATCGTCATGAATGCCTTGGGATCGCTCTGTG
GTGATACATAGGAACCGATCTAGCT-3' (SEQ ID NO: 3)

5

2) FS18A

5'-

GATGGCGTAGTCACCCTTCCACGCTGCCTTCCTTTATTGATAGGGAATGGTAATGG
TGCTGATGCTGATGTTGATGCCCCAGCTTGCTGCGACATCGTCAGGGGTCTCTTGA
GCTCGCTGCTCTGTGGTGGTGTGTTAGGAACCGATCTAGCT-3' (SEQ ID NO: 4)

Se diseñaron cebadores para la 3'UTR de FS18 para Q-PCR, y se usaron para realizar el perfil de la expresión relativa de FS18 y FS18A en diferentes tejidos de plantas de la variedad de cultivo Coker 315 de *G. hirsutum*, usando como referencia para los niveles de expresión el gen de ubiquitina. La preparación del ARN se llevó a cabo según Wan y Wilkins (1994) (Anal Biochem 223: 72-12), con hasta 2 g de fibras molidas u otros tejidos. Todas las preparaciones de ARN se trataron con ADNasa, y se purificaron mediante extracción orgánica. En los experimentos de PCR en tiempo real, se usaron 5 µg de ARN total para la producción de ADNc según las recomendaciones del fabricante (Superscript II, BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), con cebado de ADNc de oligo-dT (0,5 µg de dT18). Los cebadores usados fueron Cebador 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) y FS18_F: 5'-ctagctgaaatcggttcg-3' (SEQ ID NO: 5) y FS18_R: 5'- ttggatcccacccttaaca-3' (SEQ ID NO: 6), y se diseñaron para amplificar un producto de 89 pb. El segundo cebador para FS18 tuvo un único emparejamiento erróneo con FS18A, pero se pensó que probablemente detectaría ambos transcritos. Los cebadores para el gen de ARN helicasa de algodón, usado como referencia en las reacciones de PCR, fueron RNAHel_F: 5'-agcctgatgatgtggaggat-3' (SEQ ID NO: 7) y RNAHel_R: 5'-tcaggaagggttgccatcttga-3' (SEQ ID NO: 8); amplificaron un producto de 180 pb (Hovav et al, 2007: Planta 227, 319-329). Los experimentos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo usando un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR system (CA, USA), de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se pipetearon en placas de 96 pocillos 15 µl de una mezcla maestra, que consiste en 10 µl de 2X SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (Sigma), 0,5 µl de cada uno de los oligonucleótidos directo e inverso 20 µM que corresponden al gen diana dado, y 4 µl de agua de grado PCR. Los moldes (5 µl de una dilución 1/500 de la reacción de ADNc) se añadieron entonces a las mezclas maestras y se transfirieron al ciclador térmico. Las condiciones del ciclado fueron 5 min. de desnaturalización a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 60°C durante 15 segundos, y elongación a 72°C durante 20 segundos. Tras la amplificación, se llevó a cabo una etapa de disociación para detectar cualesquiera productos complejos. El análisis de los datos se llevó a cabo con el software RQmanager V1.2 (Applied Biosystems), y la abundancia relativa del transcrito, en comparación con óvulos a 0 dpa, se determinó usando como patrón interno el gen de helicasa de algodón, usando el método $\Delta\Delta Ct$.

Según los datos de q-PCR (véase la Figura 1), FS18 se expresó de forma elevada en fibras (desde 10 hasta 35 dpa), aunque de forma mucho más elevada en fibras a alrededor de 20 dpa, con una pequeña cantidad de expresión en algunos otros tejidos florales, como el estigma.

En una etapa siguiente, se aisló el promotor FS18. Se usó un fragmento del extremo 5' del ADNc de FS18 como sonda para cribar una biblioteca del inserto grande BAC de *G. hirsutum* cv Acala Maxxa (GH_MBb, Clemson Genomics Institute) según el protocolo recomendado por el proveedor (<http://www.genome.clemson.edu/resources/protocols>), y se seleccionaron para la secuenciación los tres BACs que se hibridan de forma más potente (BAC3P22, 241 H24 y 213B4). La secuenciación en dirección 5' desde un cebador en la 3'UTR de FS18 (FS18Up: 5'-tgtatcacacaattggatcccacc-3') a través de la región codificante indicó que estos tres BACs fueron muy similares entre sí y a FS18. Específicamente, 3P22 fue idéntico a FS18 en la región codificante, y 241 H24 y 213B4 fueron idénticos entre sí pero tuvieron una sustitución de una sola base no conservativa con respecto a FS18.

Estaba claro que todos estos BACs codificaron un gen FS18 en lugar de un tipo FS18A, ya que carecieron de las inserciones y sustituciones de bases observadas en FS18A, y se concluyó que pueden representar dos miembros de la familia del gen FS18 muy estrechamente relacionados. Ninguno de los genes contenía un intrón. Se usó entonces una estrategia de paseo con cebador para la secuenciación en dirección 5' desde la región codificante en el promotor de los genes en BAC3P22 y BAC241 H24. Las secuencias de promotor de ambos genes fueron

ES 2 613 687 T3

extremadamente similares (99% idénticas), de manera que probablemente fueron el resultado de una duplicación relativamente reciente de un gen ancestral. Solo se estudió adicionalmente el gen codificado por 3P22.

```
1  aatggatcgg gcctcgagta agaattttt ggtccgagcc caaccagat
51  ttacaaaaa attgtgtg ttgtttct actgtttat tgcattca
101 ctattatatt gttattgtt tgtgttatt atcacacggc cgtgtgtcac
151 acatagggcat gtccttgag cgtgtgaaa aatagtatag gtgtagtffc
201 cacacggctc gacacacggc cgtgtatctc aagcaatga gttacacaga
251 tagagacacg ggctgggata cggccatgtg tccaacttt gaaagtcaca
301 cggcctgggg cattccacac gatcgtgtgt ctctgttc taggcacttt
351 gagattcac cctaaactc tagaattgt tcaaattagc ccctattgt
401 tcttaaatca ttttagggcc ctgtaaactc atatttagga claaatgggt
451 aattttact atgattgaa tgaattagct tgcatttaa ttatgattga
501 tttgataata atgcccgtga cctaataccg ttggcggaga ggggttaggg
551 gttttattgt tatttttag atattgtata gctctgttt tttgttaat
601 tttgtatta ttttaaaggc attgtttgt taagttacac ctatctaat
651 gttattctg gtaggttta tgggtgaata accctgacc accaaatcaa
701 tcacaagagt tcaatattt attatttta aaatgattg aaaatcgtta
751 atctatatat ttgcctatta ttggattaaa tattcataag agtttagacc
801 gtcgtgagac aagttagtt tatctaactg atggcatcg cacttagta
851 aaaagttagt ggcgcaaagc taccatgagg tggattatga ttgaatgtct
901 ctaaatcaga atcaggatta gaaacgacgc acacttctgt tgcccgattg
951 ccgaccccaa tgacacgtgt ttaggttta gccatctta tgaagataa
1001 tgtttctgt ttataagta agcaactata ggggtttact tgggtacgca
1051 aatttttagg ttaactatt tgggaagggc cattaatgatt caattgaaag
1101 aaagtggca cacacaaaat cactacatct gtttgacag agacacagcc
1151 taaaaacagc agcaacaag cctaaaggaa tcacccaaaa acaacaacca
1201 aaagtacaga ggaaaacaaa agaatccctg ctaccaccaa gctgaaaaaa
1251 agaaaataaa aactcaact ttggctataa aaaccctcct accctcaacc
1301 cctaaccacg caacaatcag caatactcca agcaaccatt ttcttaca
1351 gttgtttt cttgtgatta atccat
```

SEQ ID NO: 1

- 5 Un fragmento de 1376 pb del promotor (SEQ ID NO: 1) en dirección 5' desde el codón ATG se amplificó a partir de ADN de BAC de 3P22 usando los cebadores Gateway gwFS18Pro_F ggggacaagttgtacaaaaagcaggctaatggatcgggcctcgagta (SEQ ID NO: 9) y gwFS18Pro_R ggggaccattgtacaagaaagctgggtatggattaatcacaagaaaaa (SEQ ID NO: 10) (las secuencias específicas del gen

están en negrita), que contienen los sitios de recombinación attB1 y attB2 para la recombinación *in vitro* usando el sistema de clonación Gateway (Invitrogen). La amplificación mediante PCR a partir de ADN de BAC, seguido de la limpieza mediante PEG según las instrucciones del fabricante, y la recombinación *in vitro* usando la reacción de BP con el vector intermedio pDONR201 (Invitrogen) y la transformación en células DH5 α dieron como resultado la producción de pDONR/FS18pro(3P22). El vector intermedio se secuenció con los cebadores pDONR-F y pDONR-R (Invitrogen), y entonces se recombinó en un vector de destino del gen informador de GUS pSirogateIV-GUS usando la reacción de LR como se recomienda. El vector pSirogateIV-GUS contenía los bordes izquierdo y derecho del T-DNA, un gen GUS sin promotor en dirección 3' desde el casete de recombinación de Gateway de attR, una secuencia terminadora de la transcripción/de poliadenilación procedente de una enzima málica de *Flavaria bidentis*, y un gen de resistencia a kanamicina expresable en planta con un promotor del ARN subgenómico del segmento 1 y un terminador del segmento 3 del virus del retraso del crecimiento del trébol, como se describe en Schunmann et al. (2003) *Funct Plant Biol* 30: 443-452.

El plásmido resultante pSirogateIV-FS18-GUS se secuenció con un cebador en el gen informador de GUS (GUSRev: 5'-tccagactgaatgccacagg-3', SEQ ID NO: 18) para confirmar la recombinación correcta del promotor, y entonces se transfirió a la cepa AGL1 de *Agrobacterium* (Lazo et al (1991) *Biotechnol.* 9: 963-967) mediante electroporación.

En una primera etapa, la funcionalidad del promotor se evaluó en un ensayo de expresión transitoria mediante bombardeo con partículas de ADN de pSirogateIV-FS18(3P22)-GUS en óvulos de algodón cultivado, y tiñendo para la actividad de la enzima GUS según Jefferson et al (1987) *EMBO J.* 6: 3901-3907.

En este experimento, se usó como control un vector de expresión que comprende un casete de promotor 35S-GUS. La actividad del promotor se monitorizó contando el número de manchas de GUS/número de óvulos analizados (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Número de manchas de GUS/número de óvulos analizados. El promotor FS18 fue capaz de conducir la expresión de GUS entre 16 dpa y 29 dpa

promotor	7dpa	16 dpa	29 dpa
35S	10/40	1/10	no ensayado
FS18	no ensayado	2/30	5/28

En la siguiente etapa, se llevó a cabo la transformación del algodón con la cepa de *Agrobacterium* que porta pSirogateIV-FS18-GUS, esencialmente como se describe en Murray et al. (1999) *Mol. Breed.* 5: 219-232 usando segmentos de cotiledones de plántulas de la variedad de cultivo Coker315-11 de algodón (una selección CSIRO procedente de la variedad de cultivo Coker 315 regenerable), y se llevó a cabo la selección para la resistencia a sulfato de kanamicina.

Se generó un total de 19 transformantes primarios, que representan 14 sucesos de transformación independientes. Las plantas se transfirieron a suelo y se dejaron florecer. Las flores se etiquetaron en la antesis y se recogieron capullos tanto a 10 como a 20 dpa, y las semillas que se desarrollan completamente con fibras se tiñeron para la enzima GUS usando tinciones histoquímicas de X-gluc como se describe por Jefferson et al. (1987) *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Las hojas inmaduras, segmentos de pecíolos, raíces y secciones de tallos procedentes tanto de ramas jóvenes como más viejas también se tiñeron para GUS. Los patrones de tinción observados se resumen en la Tabla 2, y las imágenes representativas se muestran en la Figura 2.

Tabla 2: Tejidos en los que se detectó actividad de la enzima GUS en diferentes plantas de algodón transgénicas transformadas con el constructo de SirogateIV-promotor FS18-GUS. +, expresión débil o localizada, ++ expresión media, +++ expresión muy fuerte, - sin tinción.

Línea transformante	Hoja	Pecíolo	Tallo	Raíz	Fibra a 10 dpa	Fibra a 20 dpa
T420-48	-	+ Cierta tinción débil en unas pocas glándulas de la superficie, sin tinción en tricomas	-	-	+++	+++
T420-2	-	-	-	-	+++	+++
T420-37	-	+ Cierta tinción débil en unas pocas glándulas de la	+ cierta tinción débil en unas pocas glándulas de la	-	+++	+++

		superficie, sin tinción en tricomas	superficie, sin tinción en tricomas			
--	--	-------------------------------------	-------------------------------------	--	--	--

Se puede observar en la Figura 2 que el promotor FS18 es muy selectivo de la fibra, aunque hay una pequeña cantidad de expresión en un pequeño tricoma glandular en pecíolos y tallos.

3. Aislamiento del promotor de SCW-PRP (para referencia solamente)

5 Ji et al (2003), Nucleic Acids Res. 31: 2534-43, identificaron un clon de ADNc de 230 pb corto P2G01 (CB350474) mediante PCR sustractiva usando como conductor ADNc obtenido de fibras de 10 dpa y ADNc obtenido de un mutante sin fibras, seguido del cribado diferencial en una macromatriz de nailon frente a los ADNc de fibras de diferentes edades. El clon fue uno de alrededor de 30 genes de fibra expresados diferencialmente. Parece que la expresión del gen comenzó a alrededor de 5 días post-antesis (dpa), y continuó expresándose hasta la etapa de 20 dpa ensayada. La proteína codificada por P2G01 se designó en Ji et al (2003) como la subunidad catalítica de (H⁺)-ATPasa vacuolar, pero nuestro análisis sugirió que es más probable que sea una proteína rica en prolina. P2G01 (CB350474) no se expresó a 0 dpa, pero aumentó en expresión hasta niveles moderados en fibras a 5, 10 y 20 dpa. Se identificaron equivalencias con CB350474 a partir de una búsqueda Megablast de ESTs de fibras de algodón de *G. hirsutum* de Genbank, y se obtuvo una secuencia de transcrito de consenso de 659 pb (SEQ ID NO: 11) derivada de un número de ESTs que solapan.

5'-
 cgcggggaactcaaattctcaatctttagatcatctctccaaaaaata**atggcagggtccaacgtttcattttaatagcttg**
cttcattttggtggtttcaagtagggtagcctagcaactcgaatattcagcacgtgctactaattgaagtgt
caccaataacattgctgtattcccaccattgccaccaataagatctcgttcttgccaccaataaccaccaataacat
tgccaccaatgacattggccaccaataacattgacaccaacaggtacaccaatcgaggaaaccaatagatccacca
accgagaaccaacagatccaccaactgaggtaccaacactgacctgaatcccaaagctaccaacaatcccacc
 atcttagcctaagcctatcactgttctccacaagttcccagcaatagctgaccttccatctcttcatgtctccatctccacctcca
 cctccacctccatccagctattgaagacaatttgattcctaattagtagcatatataactgagaatgaactctgtcatcacatt
 ctctatgatgtatttcatgaataagaatgtagttctatttacatttaccatataataaagtggtgttttttaaaaaaaaaa
 aaaaa-3' (SEQ ID NO: 11)

El transcrito de consenso codificó una pequeña proteína de 104 aminoácidos con un péptido señal predicho en el término NH₂ (predicción usando SignalP, Emanuelsson et al., 2007 Nature Protocols 2, 953-971). La existencia del péptido señal predijo la secreción de la proteína madura fuera de la célula a la pared celular. No contenía dominios proteicos conservados en secuencia, pero la proteína madura predicha de 78 AA contenía 28,4% de prolina. Por lo tanto, la hemos denominado una proteína rica en prolina (PRP), aunque la búsqueda de secuencias proteicas usando BlastP, o de las secuencias nucleotídicas usando BLASTx, no reveló equivalencias convincentes con otras proteínas, excepto para una pequeña región en otra PRP de algodón putativa (ABM05951), PRP3.

La secuencia del transcrito de consenso se usó para buscar bibliotecas de EST de algodón usando MegaBlast. Se contaron los resultados con un valor de E de <-100, y entonces se agruparon según la fuente del tejido de la biblioteca de ADNc de la que derivaron. Los transcritos que se asemejan estrechamente a CB350474 fueron ligeramente menos abundantes que aquellos para FS18, pero solamente se encontraron en bibliotecas de ADNc de fibras, con alrededor de dos veces procedentes de fibras de la etapa de SCW temprana de 20-22 dpa que en fibras en elongación de 0-10 dpa. Por lo tanto, el gen se denominó una SCW PRP.

Se diseñaron para q-PCR cebadores que abarcan el extremo 3' del transcrito de consenso, para medir el nivel de expresión del gen que corresponde al ADNc para SCW PRP. Estos fueron SCWPRP_F 5'-caggtacaccaatcgaggaa-3' (SEQ ID NO: 12) y SCWPRP_R 5'-atggtgggattgtggtagc-3' (SEQ ID NO: 13), que produjeron un producto de 110 pb en las amplificaciones. En cuanto a la medida de los niveles de expresión del gen FS18, se usó la ARN helicasa de algodón como gen de referencia en los ensayos de PCR cuantitativa, y se determinó el nivel de expresión en diferentes puntos de tiempo tras la antesis con respecto a 0 dpa. Se puede observar en la Figura 3 que la expresión del gen de SCWPRP fue selectivo de la fibra.

Un fragmento de 330 pb que abarca la región codificante del gen de SCW PRP se amplificó a partir de ADNc de fibra de algodón a 20 dpa, y se usó como sonda para cribar los filtros del inserto grande BAC de Acala Maxxa (Clemson Genomics Institute), como se describió anteriormente. Se aislaron 13 BACs diferentes, y se secuenciaron usando un cebador procedente de cerca del comienzo de la traducción (SCWPRP-hacia abajo: 5'-gcaggtccaacggtttcat-3' - (SEQ ID NO: 14). Esto identificó dos clases de genes que fueron muy similares y estaban representados por los clones de BAC BAC4A23 y BAC10G1. Los genes de SCW PRP en estos BACs se secuenciaron de forma más completa. Ninguno de los genes tuvo un intrón. El gen en BAC4A23 coincidió exactamente con la secuencia de ADNc de consenso, mientras que aquel en BAC10G1 tuvo tres diferencias de nucleótidos con respecto al transcrito de SCW PRP de consenso, de manera que representaron genes muy similares. La secuencia nucleotídica presente en BAC4A23 (SEQ ID NO: 15) se analizó con detalle.

atagatgagatgatctattgattctatactaccgtgaattatgaattttttctatttcttttgagttgattaatgatgactgtat
 ttatatgtttatcgaagaataattttataittaaaatttatttaatctcattagttgatactgtctttttgtctctcacggaaagtgttatat
 ataagttcagtaataataatgaaatataaatttttaattatctagtagtcaataagaagatggagaagttatgtaattatag
 ttataaattattataaatttaataatataatataaagaaaatagttgtataactaataattttttacaatactttatagttatatt
 aaaaaattttaaaataaaatactattttttgtcaatatattatattttatattttatattgaatatgaataaatttttttg
 aaaaataatttttaatttttagaaattttataactttccatatataattctgatttgcaatttcttttgagatttatctaaattgattg
 aatttttttttttaaaaaataaaataaatttttaaaatttctggaattttatataaatttttgatttttcaaaaaaattgagattttttc
 tttttttcgatttttaattttttcaggaaaatataaactaacttttctttgctttgggtataattaatagataaccacaaattag
 atcaataggagctcatgtctaatcccatttaattactttgtgtatcattaatttagtcgacctacatagtagctctatggggca
 aatagttataaattgtaaaattagatttaaatctgaagtttttaatttaagttcagactatagattatacaaaatattaaagggt
 aataatattctaatatcaagctgggtcaaggtttaattaagtagtaactaaactggttttatagttcaaatgatttaataactaa
 gtattaattgaaatagaagcaaagttcaagtagtaactaaactaaactttgctagtaaattgaaacttaagtc
 gagtttagttatctaatggacaaaaaatcttaataccaatttaaacctaaagcaagtttaggtaccaaagtgatattttat
 ctaattttaaattgatccacctaatttaaaattttttgtccaatgcaataagagaattaattaacttacacacatgatagag
 atataccacaacagatacacactacaaaaacattaaaaatagaagatataattcctacaaaatttaaaagcatttaatt
 ttttaactaacattagacaaatggaatggaaagactatttttaagtttatggatgaatctaatttatctaaacattgggttttttt
 tttgtgacgaaataggggtgagagaaggtagtaagctaaagtaggggagtaataatctcaacaaataattaaaaaactccttt
 aatgtggctataaatacctgaaaccaatccttcttctcaactcaaatcttcaatcttttagatcatctctccaaaaaat

SEQ ID NO: 2

5 En una primera etapa, la funcionalidad del promotor en el constructo se evaluó en un ensayo de expresión transitoria mediante bombardeo con partículas de ADN de pSirogateIV-Promotor 4A23-GUS en óvulos de algodón cultivados, y tiñendo en busca de la actividad de la enzima GUS según el método de Jefferson et al (1987) EMBO J. 6: 3901-3907.

En este experimento, se usó como control un vector de expresión que comprende un casete de promotor 35S-GUS. La actividad del promotor se monitorizó contando el número de manchas de GUS/número de óvulos analizados (véase la Tabla 3).

Tabla 3: Número de manchas de GUS/número de óvulos analizados.

promotor	7 dpa	16 dpa	29 dpa
35S	10/40	1/10	no ensayado
SCWPRP	no ensayado	5/30	4/28

10 Se observó que el promotor SCWPRP conduce la expresión de GUS entre 16 dpa y 29 dpa.

15 En una etapa siguiente, se llevó a cabo la transformación del algodón con la cepa de *Agrobacterium* que porta pSirogateIV-promotor 4A23-GUS, esencialmente como se describe en Murray et al. (1999) Mol. Breed. 5: 219-232, usando los segmentos de cotiledones de plántulas de la variedad de cultivo de algodón Coker315-11 como fuente de tejido de algodón en la transformación. Coker315-11 es una selección de CSIRO de la variedad de cultivo Coker 315 regenerable. En el experimento de transformación, la selección se llevó a cabo para la resistencia a sulfato de kanamicina.

20 Se generó un total de 17 transformantes primarios, que representan 12 sucesos de transformación independientes. Las plantas transformadas se transfirieron al suelo y se dejaron florecer. Las flores se etiquetaron en la antesis. Se recogieron capullos tanto a 10 como a 20 dpa, y las semillas completas con fibras se tiñeron para la enzima GUS usando tinciones histoquímicas de X-gluc como se describe por Jefferson et al., 1987. Las hojas inmaduras, segmentos de peciolo, raíces y secciones de tallos, procedentes tanto de ramas jóvenes como viejas, también se tiñeron para GUS. En la Tabla 4 se resumen los patrones de tinción, y en la Figura 4 se dan las imágenes representativas.

25 Tabla 4: Tejidos en los que se detectó actividad de la enzima GUS en diferentes plantas de algodón transgénicas T₀ transformadas con el constructo de SirogateIV-promotor SCWPRP-GUS. +, expresión débil o localizada, ++

expresión media, +++ expresión muy fuerte, - sin tinción

Línea de transformante	Hoja	Pecíolo	Tallo	Raíz	Fibra de 10 dpa	Fibra de 20 dpa
T427-26	+ Solamente en pequeñas glándulas superficiales - no en tricomas	+ Solamente en pequeñas glándulas superficiales - no en tricomas; alguna tinción débil en el centro de pecíolos más viejos	+ Solamente en algunas glándulas superficiales - no en tricomas	-	++	+++
T427-6-1	+ Solamente en pequeñas glándulas superficiales - no en tricomas	+ Solamente en pequeñas glándulas superficiales - no en tricomas	+ Solamente en pequeñas glándulas superficiales - no en tricomas	-	++	+++

5 Se observó que el promotor SCWPRP se expresa selectivamente en fibras, particularmente en etapas tardías, de acuerdo con los datos de Q-PCR. También se expresó en algún tipo de un tricoma glandular presente en la mayoría de las superficies epidérmicas verdes de tejidos molidos anteriores.

Materiales y métodos

1. Cultivo de óvulo de algodón y bombardeo con partículas

10 Se cosecharon capullos de algodón procedentes de cada etapa de iniciación de la fibra, se esterilizó la superficie en etanol al 95%, se sometieron a la llama de forma breve, y se disecaron en condiciones estériles. Los óvulos se transfirieron a un medio de cultivo líquido en presencia de ácido indol-3-acético 5 μ M y ácido giberélico 0,5 μ M. Los óvulos se colocaron en 2 papeles de filtro Whatmann prehumedecidos con Medio 100 (sal MS, vitaminas B5, MES 0.5 g/l, MgCl₂·6H₂O 0,94 g/l, gelrita 2 g/l, glucosa 30 g/l, pH 5,8) suplementado con manitol 0,2 M, antes del bombardeo. Se hizo precipitar ADN sobre partículas de oro de 1 μ m mediante el método de cloruro de calcio-espermidina descrito en el manual de instrucciones de BioRad (Richmond, CA) para el Biolistic Particle Delivery System (1000/he). Los óvulos cultivados se bombardearon con una distancia del objetivo de 6, 9 y 12 cm en vacío de Hg de 28 pulgadas (0,948 bares) según la recomendación del fabricante para tejidos vegetales y con diversas presiones de helio (900 y 1350 psi) (62,05 y 93,08 bares). Los óvulos bombardeados se transfirieron inmediatamente a un medio líquido reciente, o se incubaron en un medio sólido durante 2 días antes de transferirlos a un medio líquido. Para cerrar herméticamente cada cápsula, para prevenir que los tejidos se secasen, se usó una monocapa de cinta quirúrgica Micropore (3M Healthcare, St. Paul, MN). Los cultivos se incubaron a 32°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Cada constructo se bombardeó en más de 120 óvulos por réplica, y los experimentos se repitieron al menos 6 veces.

2. Análisis de patrones de expresión de beta-glucuronidasa

25 La localización histoquímica de la actividad de la enzima GUS se llevó a cabo usando el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido (X-Gluc) como se describe por Jefferson RA et al (1987) EMBO J 6: 3901-3907. Para prevenir la difusión del producto de GUS durante la tinción, se añadieron 0,5 mM de ferri/ferrocianuro potásico al amortiguador de la tinción histoquímica. Se realizaron fotografías de los óvulos teñidos histoquímicamente asociados con las fibras con un estereomicroscopio Olympus SZX con una cámara digital Olympus DP11. Se construyeron composiciones de imágenes usando el software de Adobe Photoshop 5.5.

30 **Ejemplo 2: Expresión del promotor FS18 en plantas de algodón**

35 Los transformantes de algodón primarios se generaron como se describió en el ejemplo 1 con un constructo que comprende un gen quimérico para la expresión de GUS bajo el control del promotor FS18 (pSirogateIV-FS18(3P22)GUS). Se recogieron semillas T1 procedentes de cuatro transformantes primarios independientes con expresión elevada en fibra de 10 o 20 dpa, y se plantaron en el invernadero. Estas líneas fueron T420-24, T420-31, T420-37 y T420-48. Secciones de cotiledones se tiñeron con X-Gluc, como se describió previamente. Se observó actividad de Gus en muchas de las plantas en tricomas glandulares pequeños distribuidos a lo largo del cotiledón y en áreas alrededor de bordes de corte que indican una respuesta a la herida. Cuando los cotiledones completos se tiñeron, la actividad de GUS se observó solamente en los tricomas glandulares y en algunas áreas dispersas cerca de los bordes, o internamente en el cotiledón, presumiblemente en áreas que han sido dañadas durante la manipulación antes de la tinción o cuando se regaron las plantas. No todos los cotiledones tuvieron esta tinción difusa en parches.

5 Dos plantas T1 procedentes de cada línea se hicieron crecer hasta madurez, y las flores se etiquetaron para recoger capullos de diferentes edades (0, 10, 20 y 30 dpa), y se cosecharon otros tejidos diversos, incluyendo hoja, peciolo, tallo, raíz, cubierta del capullo (a 10 y 20 dpa), pequeño brote floral y diversas partes florales a 0 dpa (incluyendo bráctea, pétalo, estambres y estigma de las flores). Estos se tiñeron para la actividad de GUS, y material similar se congeló para la extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa para indagar en los niveles relativos de expresión en diferentes tejidos. La tinción de GUS fue en disolución de X-Gluc toda la noche a 37°C como se describe en el ejemplo 1. Los tejidos se aclararon en una serie de etanol hasta que no se extrajo más clorofila, y se fotografiaron. Todas las líneas tuvieron patrones de tinción similares. Como ejemplo, en la Tabla 5, a continuación, se tabulan los resultados para la línea T420-24.

10 Tabla 5: Patrones de tinción de GUS para la línea T420-24.

Tejido	Comentario
Óvulo de 0 dpa	Óvulo teñido en la superficie
Fibra y óvulo de 10 dpa	Fibras fuertemente teñidas
Fibra de 20 dpa	Fibras fuertemente teñidas
Fibra de 30 dpa	Fibras fuertemente teñidas
Cotiledón	Tricomas glandulares pequeños teñidos, cierta tinción irregular de mesófilo y epidermis alrededor de las heridas. Unas pocas glándulas alrededor del néctar se tiñeron fuertemente, pero la mayoría de las glándulas en el néctar no se tiñeron
Hoja	Tricomas glandulares pequeños teñidos, cierta tinción en los bordes del corte o alrededor del daño, ciertos tricomas pilosos teñidos, pero solamente en áreas próximas en las que hay una respuesta a la herida.
Peciolo de la hoja	Tricomas glandulares pequeños teñidos, tricomas pilosos no teñidos
Tallo	Cierta tinción irregular débil en vasculatura, pero probablemente una respuesta a herida en secciones de corte
Raíz	Sin tinción
Cubierta del capullo (0, 10 y 20 dpa)	Tinción de la pared de la cubierta del capullo y del tabique que separa los lóculos, en todas las etapas
Capullo floral	Unos pocos tricomas glandulares pequeños teñidos pero sin tricomas pilosos, tinción ocasional de áreas dañadas.
Bráctea floral	Unos pocos tricomas glandulares pequeños teñidos, pero sin tricomas pilosos.
Pétalo	Tinción de tricomas glandulares pequeños en la base del pétalo, y solamente a lo largo de un borde en el que se solapan los pétalos. Cierta tinción irregular de áreas dañadas del pétalo, particularmente más distante hacia la base del pétalo, donde la tinción podría ser bastante fuerte.
Estambre/antera/polen	Tinción muy fuerte en polen, tinción más débil de la pared de la antera y algunas veces del filamento
Estigma/estilo	Tinción débil de la superficie del estigma y de las papilas estigmáticas

Expresión cuantitativa de GUS en diferentes tejidos

15 Se recogieron muestras, y el ARN se preparó como se describe en Wan y Wilkins (1994) (Anal Biochem 223: 72-12) y se trató con ADNasa. El ARN total se convirtió en ADNc usando transcriptasa inversa Superscript II y cebadores aleatorios, y se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa como se describió previamente. Los cebadores usados fueron Q-GUS (CAGGGAGGCAACAATGAATCAACAACCTCTC) y Q-ME (TGCAACAGCAACAGATCAACTGTCCTTTTCC), específicos para el transgén de GUS introducido, y el gen de ubiquitina de algodón endógeno se usó para la normalización, como se describe previamente. Todas las muestras se ajustaron con respecto a la expresión de GUS en cada planta de fibras de 30 dpa ajustadas como 1,0, y entonces se promediaron a lo largo de dos plantas diferentes en cada una de cuatro líneas independientes diferentes.

20 Q-PCR indica que el promotor FS18 es activo a lo largo del desarrollo de la fibra, pero es expresado más

5 fuertemente más tarde en el desarrollo. Consistente con los datos de tinción de GUS, el promotor parece ser activo en la cubierta del capullo y en la hoja (probablemente en respuesta al daño por insectos, ya que fue bastante variable con la mayoría de las muestras que tienen poca o ninguna expresión de GUS en las hojas). La expresión en otros tejidos fue baja, ya que los tricomas glandulares pequeños en los que GUS se detectó mediante tinción representan una proporción muy pequeña de las células totales extraídas. No se detectaron niveles elevados de transcritos de GUS en los estambres. En la Figura 5 se da un resumen de la expresión en diferentes tejidos, y los datos cuantitativos en este experimento se pueden tomar de la Figura 5E.

Conclusión

10 En conjunto, estos datos apoyan la conclusión de que el promotor FS18 es preferente de la fibra y se expresa a lo largo del desarrollo de la fibra, pero es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular secundaria. Se expresa en otro lugar en la planta, pero habitualmente en células o tejidos relativamente especializados, incluyendo tricomas glandulares pequeños distribuidos a lo largo de la epidermis vegetal en tallos, hojas, brácteas, pecíolos y pétalos. Hay algo de expresión en la cubierta del capullo materna. El promotor también tiene cierta sensibilidad a heridas, pero parece que esto es una actividad menor.

15 **Ejemplo 3: Expresión del promotor SCW-PRP en algodón (para referencia solamente)**

20 Se generaron semillas T1 de cuatro transformantes primarios independientes según el método del ejemplo 1 con un constructo que comprende un gen quimérico para la expresión de GUS bajo el control del promotor SCW_PRP (constructo de SirogateIV-promotor SCWPRP-GUS), y los transformantes con expresión elevada en fibra de 10 o 20 dpa se recogieron de los transformantes primarios generados según el método descrito en el ejemplo 1 y que comprenden un gen quimérico para la expresión de GUS bajo el control del promotor SCW-PRP, y se plantaron en el invernadero. Estas líneas fueron T427-5, T427-6, T427-26-1 (introducida en el ejemplo 1) y T427-31. Secciones de cotiledones se tiñeron con X-Gluc, como se describió previamente. Se observó actividad de Gus en muchas de las plantas en tricomas glandulares pequeños distribuidos a lo largo del cotiledón, y en áreas alrededor de los bordes de corte, indicando una respuesta a heridas. Cuando se tiñeron cotiledones completos, la actividad de GUS solo se observó en los numerosos tricomas glandulares a lo largo del cotiledón y su pecíolo y en algunas áreas irregulares cerca de los bordes o internamente en el cotiledón, presumiblemente en áreas que habían sido dañadas durante la manipulación antes de la tinción o cuando las plantas se regaron. No todos los cotiledones tuvieron esta tinción difusa en parches.

30 Dos plantas de cada línea se hicieron crecer hasta madurez, y las plantas se etiquetaron para recoger capullos de diferentes edades (0, 10, 20 y 30 dpa), y se recolectaron otros tejidos diversos, incluyendo hoja, pecíolo, tallo, raíz, cubierta del capullo (a 10 y 20 dpa), capullo floral pequeño y diversas partes florales a 0 dpa (incluyendo bráctea floral, pétalo, estambres y estigmas). Éstos se tiñeron para la actividad de GUS, y material similar se congeló para la extracción de ARN y la RT-PCR cuantitativa para observar los niveles relativos de la expresión en diferentes tejidos. La tinción de GUS fue en disolución de X-Gluc toda la noche a 37°C, como se describe previamente. Los tejidos se aclararon en una serie de etanol hasta que no se extrajo más clorofila, y se fotografiaron. Todas las líneas tuvieron patrones de tinción similares. Los resultados para la línea T427-5 se representan en la tabla 6, a continuación.

Tabla 6: Patrones de tinción de GUS para la línea T427-5

Tejido	Comentario
Óvulo de 0 dpa	Superficie del óvulo teñida
Fibra y óvulo de 10 dpa	Fibras fuertemente teñidas
Fibra de 20 dpa	Fibras fuertemente teñidas
Fibra de 30 dpa	Fibras fuertemente teñidas
Cotiledón	Numerosos tricomas glandulares pequeños a lo largo de venas pequeñas y grandes y en y alrededor del néctar se tiñeron (más que con FS18GUS), cierta tinción irregular de mesófilo y epidermis alrededor de las heridas (más fuerte que FS18GUS)
Hoja	Numerosos tricomas glandulares pequeños teñidos, cierta tinción en los bordes de corte o alrededor del daño, ciertos tricomas pilosos teñidos pero solamente en áreas cercanas en las que hay una respuesta a la herida
Pecíolo de la hoja	Tricomas glandulares pequeños teñidos, tricomas pilosos no teñidos
Tallo	Cierta tinción irregular débil en vasculatura, pero probablemente una respuesta a herida en secciones de corte
Raíz	Sin tinción

Cubierta del capullo (0, 10 y 20 dpa)	Tinción de la pared de la cubierta del capullo interna y del tabique que separa lóculos, en todas las etapas
Capullo floral	Unos pocos tricomas glandulares pequeños se tiñeron pero no los tricomas pilosos, tinción ocasional de áreas dañadas
Bráctea floral	Unos pocos tricomas glandulares pequeños se tiñeron, pero no los tricomas pilosos
Pétalo	Tinción de tricomas glandulares pequeños en la base del pétalo teñido de forma intensa a lo largo de un borde donde se solapan los pétalos. Tinción irregular ocasional de áreas dañadas del pétalo
Estambre/antera/polen	Tinción muy fuerte en polen, tinción más débil de la pared de la antera, y algunas veces del filamento
Estigma/estilo	Tinción débil de la superficie del estigma y papilas estigmáticas

Se recogieron muestras, y el ARN se preparó como se describe en Wan y Wilkins (1994) (Anal Biochem 223: 72-12) y se trató con ADNasa. El ARN total se convirtió en ADNc usando transcriptasa inversa Superscript II y cebadores aleatorios, y se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa como se describió previamente. Los cebadores usados fueron Q-GUS (CAGGGAGGCAAACAATGAATCAACAACACTCTC) y Q-ME (TGCAAACAGCAACAGATCAACTGTCCTTTTCC), específicos para el transgén de GUS introducido, y el gen de ubiquitina de algodón endógeno se usó para la normalización, como se describe previamente. Todas las muestras se ajustaron con respecto a la expresión de GUS en cada planta de fibras de 30 dpa ajustadas como 1,0, y entonces se promediaron a lo largo de dos plantas diferentes en cada una de cuatro líneas independientes diferentes.

Q-PCR indica que el promotor SCW-PRP es activo a lo largo del desarrollo de la fibra, pero es expresado más fuertemente más tarde en el desarrollo. La expresión en otros tejidos fue baja, ya que los tricomas glandulares pequeños en los que GUS se detectó mediante tinción representan una proporción muy pequeña de las células totales extraídas. El promotor SCW-PRP parece ser más activo en más tricomas glandulares que lo que lo es el promotor FS18. No se detectaron niveles elevados de transcritos de GUS en los estambres. En la Figura 6 se da un resumen de la expresión en diferentes tejidos, y los datos cuantitativos en este experimento se pueden tomar de la Figura 6E.

Conclusión

En conjunto, estos datos apoyan las conclusiones extraídas de los estudios previos de que el promotor SCW-PRP es preferente de la fibra y se expresa a lo largo del desarrollo de la fibra, pero es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular secundaria. Algunas veces se expresa en otro lugar en la planta, pero habitualmente en células o tejidos relativamente especializados, incluyendo tricomas glandulares pequeños distribuidos a lo largo de la epidermis vegetal en cotiledones, tallos, hojas, brácteas, pecíolos y pétalos. Hay algo de expresión en la cubierta del capullo materna. El promotor también tiene cierta sensibilidad a heridas, pero parece que esto es una actividad menor.

25 **Ejemplo 4: Expresión de quitina sintasa bajo el control de los promotores FS18 (según la invención) y promotores SCW-PRP (para referencia solamente) en algodón**

Las quitina sintasas se pueden expresar en plantas de algodón para incrementar las cargas positivas en la fibra de algodón al introducir polímeros de quitina en la pared de la célula de la fibra. Para esto, es importante la expresión preferente de la fibra o específica de la fibra, puesto que las plantas transformadas con un gen de quitina sintasa no muestran mayoritariamente un fenotipo apreciable si el promotor que controla la expresión de la quitina sintasa conduce la expresión en muchos otros tejidos o tipos celulares que las fibras celulares.

Se generaron cuatro vectores que comprenden genes quiméricos:

35 pTIB344: comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el gen de quitina sintasa 2 de *Neurospora crassa* (Din y Yarden, 1994, SEQ ID NO: 19) que comprende una señal dirigida al aparato de Golgi de *Arabidopsis thaliana* (Pagny et al., 2003, SEQ ID NO: 20) bajo el control del promotor FS18 y del gen epsps (mutante doble del gen de 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa de *Zea mays*, Lebrun et al., 1997; SEQ ID NO: 21) como gen marcador seleccionable.

40 pTIB345: comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el gen de quitina sintasa 2 de *Neurospora crassa* que comprende una señal dirigida al aparato de Golgi bajo el control del promotor SCW-PRP y del epsps como gen marcador seleccionable.

Estos vectores se usaron para transformar la variedad de algodón Coker312-17 usando el método de transformación de hipocotilos conocido en la técnica. Para pTIB344, 17 de 61 plantas, y para pTIB345, 16 de 67 plantas mostraron

buen desarrollo vegetal. 6 (pTIB344) y 1 (pTIB345) plantas tuvieron capullos, indicando hasta cierto punto que la expresión potencial de quitina sintasa en la cubierta del capullo no evita que las plantas presenten capullos.

5 pTIB328: comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la quitina sintasa de *Neurospora crassa* que comprende una señal dirigida al aparato de Golgi bajo el control del promotor FS18 y el gen bar (gen de fosfotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987; SEQ ID NO: 22) como gen marcador seleccionable.

pTIB329: comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la quitina sintasa de *Neurospora crassa* que comprende una señal dirigida al aparato de Golgi bajo el control del promotor SCW-PRP y bar como gen marcador seleccionable.

10 Estos vectores se usaron para transformar la variedad de algodón Coker312-17 en un método de transformación de callo conocido en la técnica. Para pTIB328 1 y para pTIB329, 5 plantas T0 han producido semillas, indicando hasta cierto punto que la expresión potencial de quitina sintasa en la cubierta del capullo no evita que las plantas maduren capullos y produzcan semillas.

15 Todos estos vectores, además de lo que se enumera anteriormente, expresan el gen gfa (glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa) de *E. coli* (Frohberg y Essigmann, 2006; SEQ ID NO: 23) bajo el control del mismo promotor que el gen de quitina sintasa, para incrementar adicionalmente la provisión de quitina a las células.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Bioscience N.V. CSIRO

<120> Promotores selectivos de fibras

20 <130> bcsII-2001

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1376

25 <212> ADN

<213> *Gossypium hirsutum*

<400> 1

ES 2 613 687 T3

aatggatcgg gcctcgagta agaatTTTTT ggtccgagcc caaccagat ttacaaaaa 60
attgtgttg ttgttttct actgtttat tgcatttca ctattatatt gttattgttt 120
tgttgttatt atcacacggc cgtgtgtcac acataggcat gtgccttgag cgtgttgaaa 180
aatagtatag gtgtagtttc cacacggtct gacacacggt cgtgtatctc aagtcaatga 240
gttacacaga tagagacacg ggctgggata cggccatgtg tcccaacttt gaaagtcaca 300
cggcctgggg cattccacac gatcgtgtgt ctctgtttc taggcacttt gagatttcac 360
cctaaacttc tagaattgtt tcaaattagc ccctatttgt tcttaaatca ttttagggcc 420
ctgtaaaactc atatttagga ctaaattgggt aatTTTTact atgatttgaa tgaattagct 480
tgcattttta ttatgattga tttgataata atgccctga ccctaaccg ttggcggaga 540
ggggttaggg gttttattgt tattttttag atattgtata gctcttgttt ttttgtaat 600
tttgtatta ttttaaaggc atttgtttgt taagttacac ctatctaat gttatttctg 660
gtaggtttta tgggtgaata acccttgacc accaaatcaa tcacaagagt tcaatatttt 720
atTTatttta aaatgtattg aaaatcgtta atctatatat ttgcctatta ttggattaaa 780
tattcataag agtttagacc gtcgtgagac aagttagttt tatctaactg atggtcatcg 840
cacttagtta aaaagttagt ggcgcaaagc taccatgagg ttgattatga ttgaatgtct 900
ctaaatcaga atcaggatta gaaacgacgc aacttctgt tgcccgattg ccgaccccaa 960
tgacacgtgt ttaggttta gccatcttta tgaagataa tgttttctgt tttataagta 1020
agcaactata ggggtttact tcggtacgca aatTTTTtagg ttaactattt tgggaagggc 1080
cattatgatt caattgaaag aaagttggca cacacaaaat cactacatct gttttgacag 1140
agacacagcc taaaaacagc agcaaaacaag cctaaaggaa tcacccaaaa acaacaacca 1200
aaagtacaga ggaaaacaaa agaatccctg ctaccaccaa gctgaaaaaa agaaaataaa 1260
aactcaactt ttggctataa aaaccctoct accctcaacc cctaaccacg caacaatcag 1320
caatactcca agcaaccatt ttccttacia gtttgtttt cttgtgatta atccat 1376

<210> 2

<211> 1610

5 <212> ADN

<213> *Gossypium hirsutum*

<400> 2

ES 2 613 687 T3

atagtatgag atgatctatt gattctatat tcttaccggt gaatttatga attttttttc 60
 ttatttcttt tgagtttgat taatgatgta ctgtatttat atgtttatcg aagaatattt 120
 tataattaaa atttatttaa tctcattagt tgatacttgt cttttttggt cttcacggaa 180
 agttgttata tataagttca gtaaataata atgaaatata aattttaatt atatctagta 240
 ctcaataaga agatggagaa agttatgta attatagtta taaattattt ataaatttaa 300
 tataatatata taaagaaaat agttgtataa ctaataatta tttttacaat actttatata 360
 gttatattta aaaaaatttt aaaattaaaa tactattatt ttgttcaata tattaatatt 420
 tatattattt aatttattat tgaatatgaa taaatttttt ttgaaaatta tatttttaat 480
 ttttagaaat tttatataac tttccatata tatatttctg atttgtcaat ttcttttgag 540
 atttatctaa attgatttga atttttttta tttttaaaa ataaaataat tttaaaattt 600
 cttggaattt tatataaatt tttggatttt tcaaaaaaaaa ttgagatttt tttctttttt 660
 ttcgattttt taaatttatt tcaggaaaat ataaactaac ttttctttgc tttgggtata 720
 attaataata gataaccac aaattagatc aataggagct tcatgtccta atcccattta 780
 attacttttg ttgtatcatt aatttagtgc acctacata gtagctctat gggcaaata 840
 gttataaatg ttaaattagt atttaaatct tgaagttttt aatttaaagt tcagactatt 900
 agtattatat caaatattta agggtaaata tatattctaa tatctaagct tgggtcaagg 960
 tttaaattaa gtacttaaac ttggttttat agttcaaatt gatttaaata actaagtatt 1020
 aatttgaatt aagaagcaaa gttcaagtac ctaattagac tataaaaaa acttttgcta 1080
 gtaaattgaa cottaagtc gagtttagtt atctaattgg acaaaaaaat cttaaatacc 1140
 aatttaaacc ctaaagtcaa gtttaggtac caaagtgtat atttatctaa tatttaaatt 1200
 tgatccacct aatttaaatt tttttggtcc aatgcaataa gagaattaat taatacttac 1260
 acacatgata gagatatacc cacacagat acacactaca aaaaacatta aaaaatagaa 1320
 agatatattt cctacaaaat ttaaaagcat ttaatttttt aactaacatt agacaaatgg 1380
 aatggaaag acttattttt aagtttatgg atgaatctaa tttatctaaa cattgggttt 1440
 tttttttttg tgacgaaata tgggtgagag aaggtagtaa gctaagtagg ggagtaatat 1500
 ctcaaaaaa taattaaaa actcctttaa atgtggctat aaatacctga acccaatcct 1560
 tctttcctca actcaaatct tcaatcttta gatcatctct ccaaaaaaat 1610

<210> 3

<211> 137

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de FS18

<400> 3

ES 2 613 687 T3

gatggcttag tcggcctccc acgctgcctt ccttttttgt cagggaatgg tgatggtgct 60
gatgccacag gttgctgtgc catcgtcatg aatgccttgg gatcgctctg tggatgataca 120
taggaaccga tctagct 137
<210> 4
<211> 152
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> secuencia de FS18A
<400> 4
gatggcgtag tcacccttcc acgctgcctt cctttattga tagggaatgg taatggtgct 60
gatgctgatg ttgatgccc agcttgcctgc gacatcgtca ggggtctctt gagctcgtg 120
ctctgtggtg gtgttttagga accgatctag ct 152
10 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> cebador FS18_F
<400> 5
ctagcttgaa atcgggttcg 20
<210> 6
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador FS18_R
<400> 6
25 ttgatccca cccttaaca 20
<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <220>
<223> cebador RNAHel_F
<400> 7

agcctgatcg atatgtggag ggat 24
<210> 8
<211> 24
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador RNAHel_R
<400> 8

tcaggaaggt ttggccatct tgga 24

10 <210> 9
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

15 <223> cebador gwFS18Pro_F
<400> 9

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta atggatcggg cctcgagta 49
<210> 10
<211> 52

20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador gwFS18Pro_R
<400> 10

25 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta tggattaatc acaagaaaa ca 52
<210> 11
<211> 659
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> transcrito de consenso de 659 pb
<400> 11

ES 2 613 687 T3

cgcggggaac tcaaattcttc aatctttaga tcatctctcc aaaaaaatat ggcaggttcc 60
aacgttttca ttttaatagc ttgcttcatt ttggtgggtt tttcaagtat ggaggttagc 120
ctagcaactc gaaatattca gcacgtgtca ctaattgaag tgtcaccaat aacattgtcg 180
ttattcccac cattgccacc aataagatct ccgttcttgc caccaatacc accaataaca 240
ttgtcaccaa tgacattggc accaataaca ttgacaccaa caggtacacc aatcgaggaa 300
ccaatagatc caccaaccga gaaaccaaca gatccaccaa ctgaggtacc aacactgcct 360
tgaatcccaa agctaccaac aatcccacca tcttagccta agcctatcac tgttcttcca 420
caagtcccaa gcaatagctt gccttcatt cctttcatgt ctccatctcc acctccacct 480
ccacctccat ccagctattg aagacaattt gattcctaatt tagtatcaca tatattactg 540
agaatgaact ctgtcatcac attctctatg atgttatttc atgaaataag aatgtagttt 600
ctatttaccat tttacatata taataaagtg tgggtgtttt tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa 659

<210> 12

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador SCWPRP_F

<400> 12

10 caggtacacc aatcgaggaa 20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cebador SCWPRP_R

<400> 13

atgggtgggat tgggttagc 20

<210> 14

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador SCWPRP-hacia abajo

25 <400> 14

gcaggttcca acgttttcat 20

<210> 15

ES 2 613 687 T3

<211> 2846

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de BAC4A23

<400> 15

aactagtgaa acagatacaa acttgtgta gattctacag aagtaaaaat aaattatttg	60
gggtgttaca ttgttaatat tttaaacata atcataagtt taaggaccta tctaaaatta	120
gaccaataaa atttaaaata taaatatgat attgtttctt ggatttatag aataatggat	180
tgttatatac atagtatgag atgatctatt gattctatat tcttaccgtt gaatttatga	240

ES 2 613 687 T3

atTTTTTtC ttatttcttt tgagtttgat taatgatgta ctgtatttat atgtttatcg	300
aagaatattt tatatttaaa atttatttaa tctcattagt tgatacttgt cttttttggt	360
cttcacggaa agttgttata tataagttca gtaaataata atgaaatata aattttaatt	420
atatctagta ctcaataaga agatggagaa agttatgtta attatagtta taaattattt	480
ataaatttaa tatatatata taaagaaaat agttgtataa ctaataatta tttttacaat	540
actttatata gttatattta aaaaaatttt aaaattaaaa tactattatt ttgttcaata	600
tattaatatt tatattattt aatttattat tgaatatgaa taaatttttt ttgaaaatta	660
tatttttaat ttttagaaat tttatataac tttccatata tatatttctg atttgtcaat	720
ttcttttgag atttatctaa attgatttga atttttttta tttttaaaaa ataaaataat	780
tttaaaattt ctgggaattt tatataaatt tttggatttt tcaaaaaaaaa ttgagatttt	840
tttctttttt ttcgattttt taaatttatt tcaggaaaat ataaactaac ttttctttgc	900
tttgggtata attaataatta gataaccac aaattagatc aataggagct tcatgtccta	960
atcccattta attacttttg ttgtatcatt aatttagtgc accttacata gtagctctat	1020
ggggcaaata gttataaatg ttaaattagt atttaaatct tgaagttttt aatttaaagt	1080
tcagactatt agtattatat caaatattta agggtaaata tatattctaa tatctaagct	1140
tgggtcaagg tttaaattaa gtacttaaac ttggttttat agttcaaatt gatttaata	1200
actaagtatt aatttgaatt aagaagcaaa gttcaagtac ctaattagac tataaaaaa	1260
acttttgcta gtaaattgaa ccttaaagtc gagtttagtt atctaattgg acaaaaaaat	1320
cttaaatacc aatttaaaacc cttaaagtc gtttaggtac caaagtgtat atttatctaa	1380
tatttaaatt tgatccacct aatttaaatt tttttggtcc aatgcaataa gagaattaat	1440
taatacttac acacatgata gagatatacc cacacagat acacactaca aaaaacatta	1500
aaaaatagaa agatataatt cctacaaaat ttaaagcat ttaatttttt aactaacatt	1560
agacaaatgg aaatggaaag acttattttt aagtttatgg atgaatctaa ttatctaaa	1620
cattgggttt ttttttttg tgacgaaata tgggtgagag aaggtagtaa gctaagtagg	1680
ggagtaatat ctcaacaaa taattaaaa actccttta atgtggctat aaatacctga	1740
aaccaatcct tctttcctca actcaaatct tcaatcttta gatcatctct ccaaaaaat	1800
atggcaggtt ccaacgtttt cattttaata gcttgcttca ttttggtggg tttttcaagt	1860
atggaggtta gcctagcaac tcgaaatatt cagcacgtgt cactaattga agtgtcacca	1920
ataacattgt cgttattccc accattgcca ccaataagat ctccgttctt gccaccaata	1980
ccaccaataa cattgtcacc aatgacattg gcaccaataa cattgacacc aacaggtaca	2040
ccaatcgagg aaccaataga tccaccaacc gagaaaccaa cagatccacc aactgaggt	2100

ES 2 613 687 T3

ccaacactgc cttgaatccc aaagctacca acaatcccac catcttagcc taagcctatc 2160
 actgttcttc cacaagttcc cagcaatagc ttgccttcca ttcctttcat gtctccatct 2220
 ccacctccac ctccacctcc atccagctat tgaagacaat ttgattccta attagatca 2280
 catatattac tgagaatgaa ctctgtcatc acattctcta tgatgttatt tcatgaaata 2340
 agaatgtagt ttctatttac attttacata tataataaag tgtggtgttt tttttaagtt 2400
 attaaattat taaaattata tatccaaaaa tataaacatg attaaatggt atacaatcat 2460
 ttataaaggt attataattg atgctatcaa ctccaacata gttatacttc aggaaaaaaaa 2520
 aacataacat aatcacttgc caatgaatga tgtgattatt ttaggtataa ttgcaaaaaa 2580
 atcctcaacg tttggggact tttggttttg tgcctttgac ctttttttta ttgacaccct 2640
 caacattata attttttttc agaaattagc ctaattttta caataaatgt gagttaaccg 2700
 ttaatcaagc gccgatcaac gaaataagtc tatgtggcat accacataag cacgatgaca 2760
 tcatctaaaa aattgtttaa caattttttt ttttcatttt gtttccttct ttcttcttct 2820
 ctctttctct ctctctgcta ttacag 2846

<210> 16

<211> 64

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador gwSCWPRP_F

<400> 16

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tagtatgaga tgatctattg attctatatt 60

ctta 64

10 <210> 17

<211> 63

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador gwSCWPRP_R

<400> 17

gggaccactt tgtacaagaa agctgggtat ttttttgag agatgatcta aagattgaag 60

att 63

<210> 18

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador GUSRev

ES 2 613 687 T3

<400> 18

tccagactga atgccacag g 21

<210> 19

<211> 2831

5 <212> ADN

<213> *Neurospora crassa*

<400> 19

```

agtccagaat cagcaaccgg ttatcgagtt ccgccacaag gacggtacga gccttcagaa      60
atcgatgtca tgccaggcca gggacaccgg gatcagagtta cggaaatgcg aggcgaccgc      120
ttccctcggc accagcgcct ttacactaca atagcccaag tcgcgccagcg agtcattatc      180
cacggtacca tggaggttat gcggacgacg tgacagttag catgggaccg gacgacgac      240
gtacagatat ctttggcccc gaaaccgatc tcagcgaaac gcgccacctc aacgacgcat      300
acgggtttcg gtcaccccag atcacctca gcgaagatcc ccacggcacc cacgcgcggt      360
cccgttacga cgacgaagac gatgtgagca ccacttattc ctccaacacg ggcaccagcg      420
cttcagtggt cgacaagttc gagcattacg gtcccattcc ggaggaaggc aagcacgagc      480
ggcgcggcgt gcgaccacca cagatgtcga ggaaggaagt ccagctcatc aacggcgaac      540
tcgttctcga gtgcaagatt ccgactatat tgtattcgtt tttgccccagg agagacgaag      600
tggagtttac gcacatgcgg tacacagccg tcaactgtga ccctgatgac tttgttgcca      660
ggggttaciaa gttgcgccag aatatcggtc gtaccgccag ggagacggag ctgttcatct      720
gcgtagccat gtacaacgag gacgagttcg gattcacacg gactatgcac gcagtgatga      780
agaacatttc gcatttttgt tcccgaaca agagtaggac gtggggagcg gatgggtggc      840
agaagattgt ggtctgtgtg gtttcggatg gacgagagat cattcacccc cggacottgg      900
acgccctcgc agccatgggc gtttaccagc acggtatcgc caagaacttt gtcaaccaga      960
aggcggtgca gcccacggt tacgagtaca cgacacaagt gtctctggac agcgacctca     1020
agttcaaggg cgccgagaag ggcacgtgac cctgccagat gattttttgc ttgaaggaga     1080
agaacaaaaa gaaactcaac tcgcatagat ggttcttcaa cgcctttggc aaagccttga     1140
accogaatgt gtgtatcctc ctagacgtcg gcacccgcc cggcggcaca agtctctacc     1200
atctctggaa agccttcgac acggattcca acgtggcggg ggcctgcggg gaaatcaaag     1260
cgatgaaggg gcggtttggc gggaaattgc tcaaccctct ggtggctagt cagaactttg     1320
agtacaagat gagcaatatt ctggacaaac cgttggagtc ggtgtttggg tacatcacgg     1380
tgttgccggg cgccttgtcg gcgtatcggg accatgcgct gcagaacgat gagacgggcc     1440
atgggccggt gagtcagtat ttcaagggcg agacgctcca tgggcagcac gcggatgtgt     1500
ttacggcgaa catgtacttg gccgaggacc gaattctgtg ttgggagttg gtggccaaga     1560
ggggtgagag gtgggtgttg aagtatgtga aggggtgtac ggggtgagacg gatgtgcctg     1620

```


ES 2 613 687 T3

acaccgtccc ggaattcgtc tcgcaacgtc gtcggtggct caacggtgcc ttcttcgccg 1680
 ccgtctactc cctcgtccac tttcgacaaa tctggaaaac cgaccacacc tttatgcgca 1740
 aagcccttct ccacgtcgaa ttctctacc acctcctgca actcctcttc acctacttct 1800
 ccctggccaa cttctacctc gccttctact ttatcgccgg cggactcgcc gatccccacg 1860
 tcgacccttt taactcggac ggccacgtcg cgcgcatcat cttcaacatc ctccgctacg 1920
 tctgcgtcct gctgatctgc acacaattca tcttgtccct cggcaaccgt ccgcagggtg 1980
 ccaaaagaat gtatctcgca tccatgatca tctacgccgt catcatgggtg tacaccacct 2040
 tcgccaccat cttcatcgtc gtgcgacaaa tccaaccctc tcaaaaatcc gacgacaagc 2100
 ccgacctcga actcggcaac aacgtcttca ccaacctgat cgtctccgtg gctagtacct 2160
 tcgggtctta cttcgtcatg tcctttctct atctcgacc cttggcacatg ttcacctcgg 2220
 ccatccagta ctttgtcctg ctgccttctc acatctgcac gctccagatc tacgcctttt 2280
 gcaacaccca cgacgtcaca tggggcacca aaggcgacaa cgtgatgcgc accgatctcg 2340
 gaggcgccat tggcaaggga agcaccgtcg aactggaaat gccttcggac caactcgaca 2400
 tcgactcggg atacgacgaa tgtctacgaa atctccggga tcgcgtcatg gtccctgccg 2460
 ttcccgtgtc cgaggaccag ctgcagcagg attactaaa gtcggtgcgc acgtacatgg 2520
 tgggtgctgt gatggtggcc aacgcgacgc tggccatggc ggtgtcggaa gcgtatggcg 2580
 attcggaaat tggggataat ttttacttgc ggtttatcct gtgggcgggtg gcggccctgg 2640
 cgctgtttag agcgttgggg tcgacgacgt ttgcggcgat taatctgggtg agtgcctcgc 2700
 tggagggcag ggtcaggctg aggttgaata tgaagggtt taggtggatt aaggagaagt 2760
 ggggggatgc ggatgtgaag ggcaagtttg aggggttggg ggatcgggcg agggggttgg 2820
 cgaggcgggtg a 2831

<210> 20

<211> 105

<212> ADN

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 20

atgagtaaac ggaatccgaa gattctgaag atttttctgt atatgttact tctcaactct 60
 ctctttctca tcatctactt cgtttttcac tcatcgtcgt tttca 105

<210> 21

<211> 1338

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> (mutante doble del gen de 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa de Zea mays

<400> 21

ES 2 613 687 T3

atggccggcg ccgaggagat cgtgctgcag cccatcaagg agatctccgg caccgtcaag 60
ctgccgggggt ccaagtcgct ttccaaccgg atcctcctac tcgccgccct gtccgagggg 120
acaacagtgg ttgataacct gctgaacagt gaggatgtcc actacatgct cggggccttg 180
aggactcttg gtctctctgt cgaagcggac aaagctgcc aagagctgt agttgttggc 240
tgtggtggaa agttcccagt tgaggatgct aaagaggaag tgcagctctt cttggggaat 300
gctggaatcg caatgcggtc cttgacagca gctgttactg ctgctggtgg aaatgcaact 360
tacgtgcttg atggagtacc aagaatgagg gagagacca ttggcgactt ggttgtcggg 420
ttgaagcagc ttggtgcaga tgttgattgt ttcttggca ctgactgcc acctgttcgt 480
gtcaatggaa tcggagggct acctggtggc aaggtcaagc tgtctggctc catcagcagt 540
cagtacttga gtgccttgct gatggctgct cctttggctc ttgggatgt ggagattgaa 600
atcatgata aattaatctc cattccgtac gtcgaaatga cattgagatt gatggagcgt 660
tttgggtgta aagcagagca ttctgatagc tgggacagat tctacattaa gggagggtcaa 720
aaatacaagt cccctaataaa tgcctatggt gaaggtgatg cctcaagcgc aagctatttc 780
ttggctggtg ctgcaattac tggagggact gtgactgtgg aaggttgtgg caccaccagt 840
ttgcaggggtg atgtgaagtt tgctgaggta ctggagatga tgggagcga ggttacatgg 900
accgagacta gcgtaactgt tactggccca ccgcgggagc catttgggag gaaacacctc 960
aaggcgattg atgtcaacat gaacaagatg cctgatgtcg ccatgactct tgctgtggtt 1020
gccctctttg ccgatggccc gacagccatc agagacgtgg cttcctggag agtaaaggag 1080
accgagagga tggttgcgat ccggacggag ctaaccaagc tgggagcatc tgttgaggaa 1140
gggccggact actgcatcat cagcccgccg gagaagctga acgtgacggc gatcgacacg 1200
tacgacgacc acaggatggc gatggctttc tccttgcgc cctgtgccga ggtccccgtc 1260
accatccggg accctgggtg cacccggaag accttccccg actacttcga tgtgctgagc 1320
actttcgtca agaattaa 1338

<210> 22

<211> 552

<212> ADN

5 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 22

atggaccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcc cggagcgga catgccggcg 60
gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg 120
caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagccta tcctggctc 180
gtcgcggagg tggacggcga ggtcgcggc atcgcctacg cgggccctg gaaggcacgc 240

ES 2 613 687 T3

aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccgccca ccagcgggacg 300
 ggactgggct ccaocgtcta caccacactg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag 360
 agcgtggctg ctgtcatcgg gctgcccac gacccgagcg tgcgcatgca cgaggcgtc 420
 ggatatgccc ccccgggcat gctgcggggc gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac 480
 gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt cctgcccgtc 540
 accgagatct ga 552

<210> 23

<211> 1830

<212> ADN

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 23

atgtgcggaa ttgttgggtc tatcgcccaa agagacgttg ctgagatddd gttagagggt 60
 ctgcgaaggc tagagtatag aggatatgac tccgctggtc tggctgtcgt tgatgctgag 120
 ggtcatatga caaggctaag aaggtagga aaggttcaga tgcttgctca ggcagctgag 180
 gaacatccat tgcattggag tactgttatt gcacatacca ggtgggctac tcatggggag 240
 ccatcagaag ttaatgctca tccacatgtg agtgagcata tcgctttagt tcacaatggg 300
 ataattgaaa accacgaacc attgagggaa gagttaaagg caagaggata tacttttgtg 360
 agtgagactg aactgaggt tattgcacat ttagtgaact gggaaactcaa acaggggggc 420
 acattgcgtg aggctgtgtt aagagctatt cctcaactta gaggtgcata cggtagctgt 480
 attatggatt caagacaccc agatactctc cttgcagcta gatcaggtag tcccttggtc 540
 ataggacttg gaatgggtga aaatattatc gctagcgacc aattggcctt attgccagtt 600
 acaagacgat ttattttcct tgaagagggc gatattgctg agattactag aaggtctgtg 660
 aacatctttg ataagactgg cgctgaggtt aaacgtcagg atatcgagtc taaccttcaa 720
 tacgatgctg gtgataaagg aatttacagg cattatatgc aaaaggaaat ttatgaacaa 780
 ccaaatgcta tcaaaaacac acttactggc cgtatttctc atggacaggt cgatttaagc 840
 gagcttggtc ctaatgcaga cgaactgcta tcaaaagttg agcacatata gatactggca 900
 tgcggaacta gttataattc aggaatgggt tctagatact ggttcgaaag cttggcaggt 960
 ataccttgtg atgtagagat cgcttctgag tttaggtata gaaagtctgc tgtgcgtaga 1020
 aattcattaa tgattacatt atctcaatcc ggagaaacag cagatacact ggctggattg 1080
 aggctttcta aggaactcgg atatctgggt tcaacttgcta tttgtaatgt accaggttcc 1140
 tcattggttc gtgaatcaga tctagcactt atgacaaatg caggaactga aataggtgtg 1200
 gcaagtacca aggctttcac aaccacactg accgtacttt taatgttggg agcaaaactc 1260
 agtcgattaa aggggctaga tgcattctatc gaacatgata ttgttcacgg gcttcaagct 1320

ES 2 613 687 T3

ctcccttcaa gaattgaaca aatgctttca caagataaga gaatagaggc attggctgaa	1380
gatttttccg acaaacatca cgcattgttt cttggacgtg gcgatcaata tccaattgca	1440
ttggaaggag ctttgaagtt gaaagaata agttacattc acgcagaagc atatgcagct	1500
ggagaactca agcatggtcc tttggcactc atcgacgtg acatgcccgat gatcgtagtg	1560
gctcctaata acgaactgct cgaaaagctt aatcaaata tcgaagaggt tcgagctaga	1620
ggaggtcagc tttacgtttt cgctgaacaa gatgctggat tcgtgtcaag cgataaatg	1680
catataattg aatgcctca cgttgaagaa gtgattgcac ctatatttta tacagtcca	1740
ttgcaacttc tagcttacca tgttgcaact attaaaggaa ctgatgttga tcagcctaga	1800
aacctagcaa aatctgtaac agtcgaataa	1830

REIVINDICACIONES

1. Un método para expresar un ARN biológicamente activo preferentemente en una célula fibrosa de una planta productora de fibra a lo largo del desarrollo de las fibras y que es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular secundaria, comprendiendo dicho método:
- 5 a. proporcionar las células de dicha planta con un gen quimérico, comprendiendo dicho gen quimérico las siguientes regiones de ADN enlazadas operablemente:
- i. un promotor preferente de la célula fibrosa, seleccionado del siguiente grupo de secuencias nucleotídicas:
- 10 1. una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID No.: 1; y
2. una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID No.: 1;
- ii. una región de ADN heteróloga; y
- iii. opcionalmente una región de terminación de la transcripción y de poliadenilación; y
- b. hacer crecer dicha planta de manera que dicha planta produce fibras.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha región de ADN heteróloga codifica una proteína de interés o una ribozima, microARN, ARN de horquilla bicatenario o ARN antisentido.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha planta es una planta de algodón.
4. Uso de un promotor preferente de fibras, seleccionado del siguiente grupo de secuencias nucleotídicas:
- a) una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1; y
- 20 b) una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1
- para la expresión preferente de un ARN biológicamente activo, a partir de un fragmento de ADN heterólogo enlazado operablemente, en células fibrosas de una planta productora de fibra a lo largo del desarrollo de la fibra que es más activo durante las etapas tardías de la deposición de la pared celular secundaria.
- 25 5. El uso de la reivindicación 4, en el que dicha planta productora de fibra es una planta de algodón.

Figura 1:

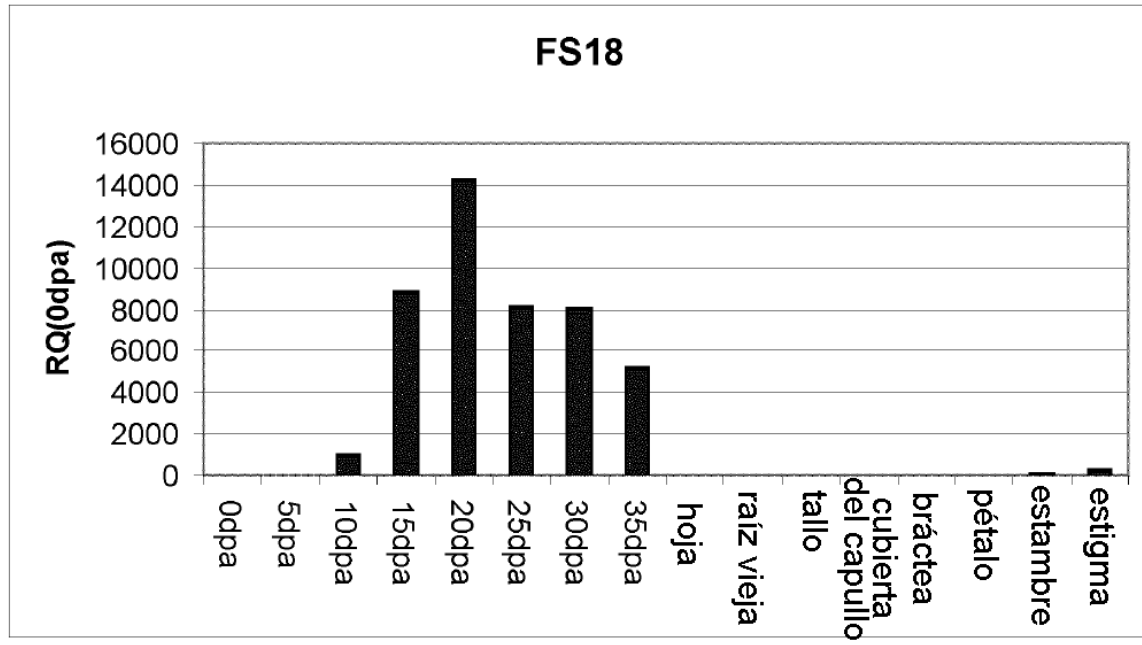
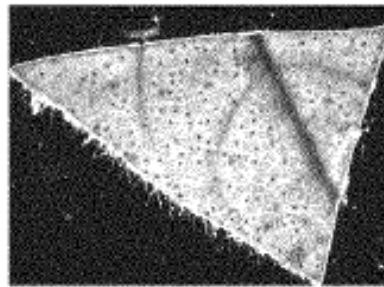
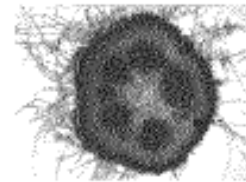


Figura 2:

Transformante de FS18-GUS T420-48



Hoja joven



Pecíolo



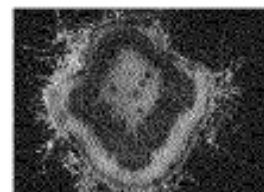
Óvulos de 10 dpa



Óvulos de 20 dpa



Raíz



Tallo

Figura 3:

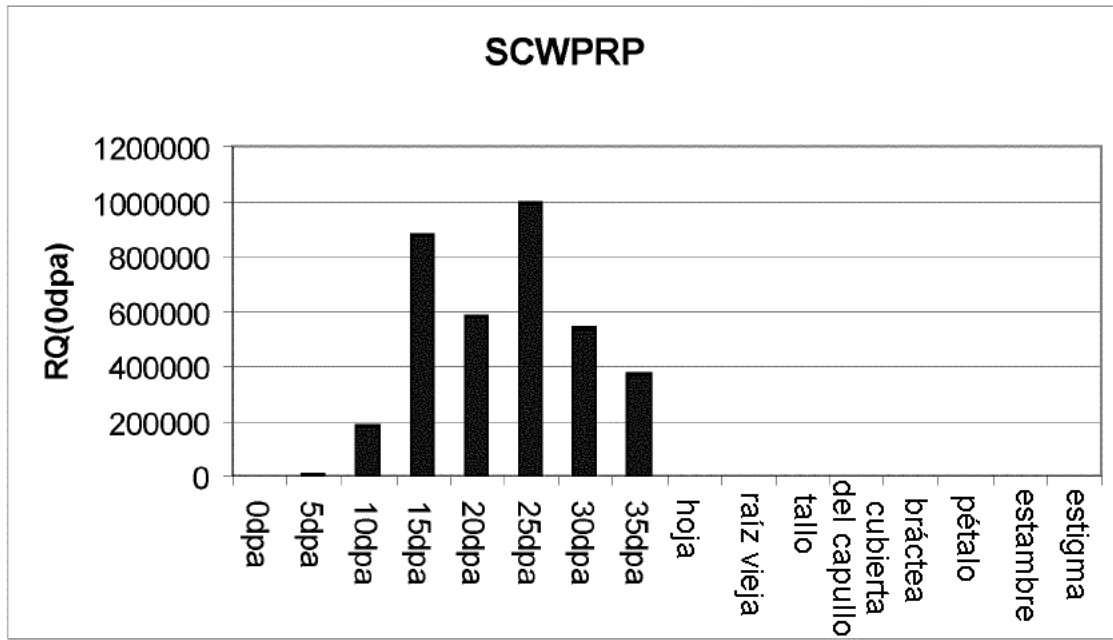
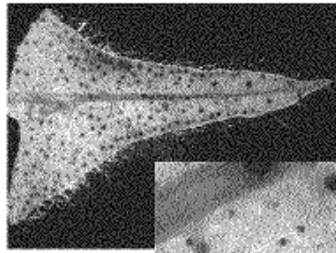
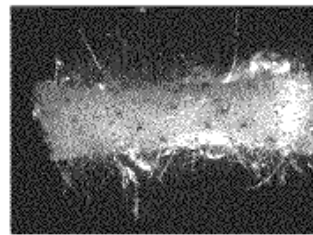
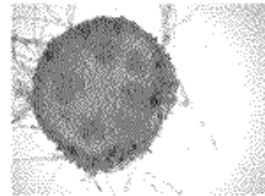


Figura 4:

Transformante de SCWPRP-GUS T427-26



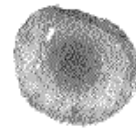
Hoja joven



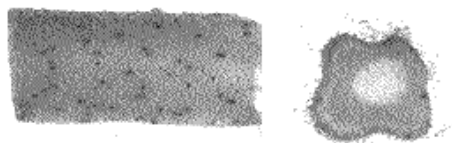
Pecíolo joven



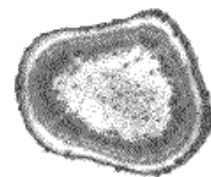
Raíz



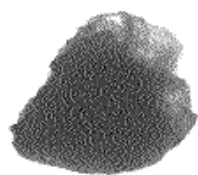
Pecíolo más vieja



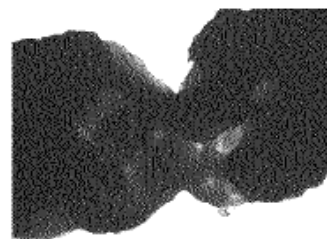
Tallo joven



Tallo más viejo



óvulos de 10 dpa



óvulos de 20 dpa

Figura 5A

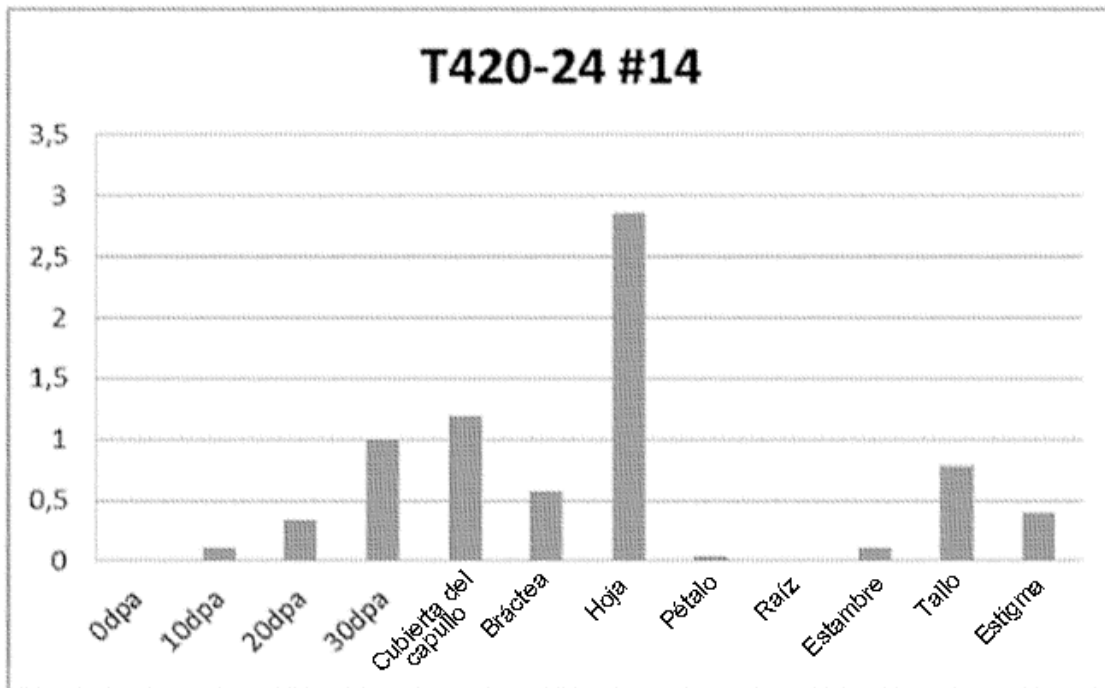
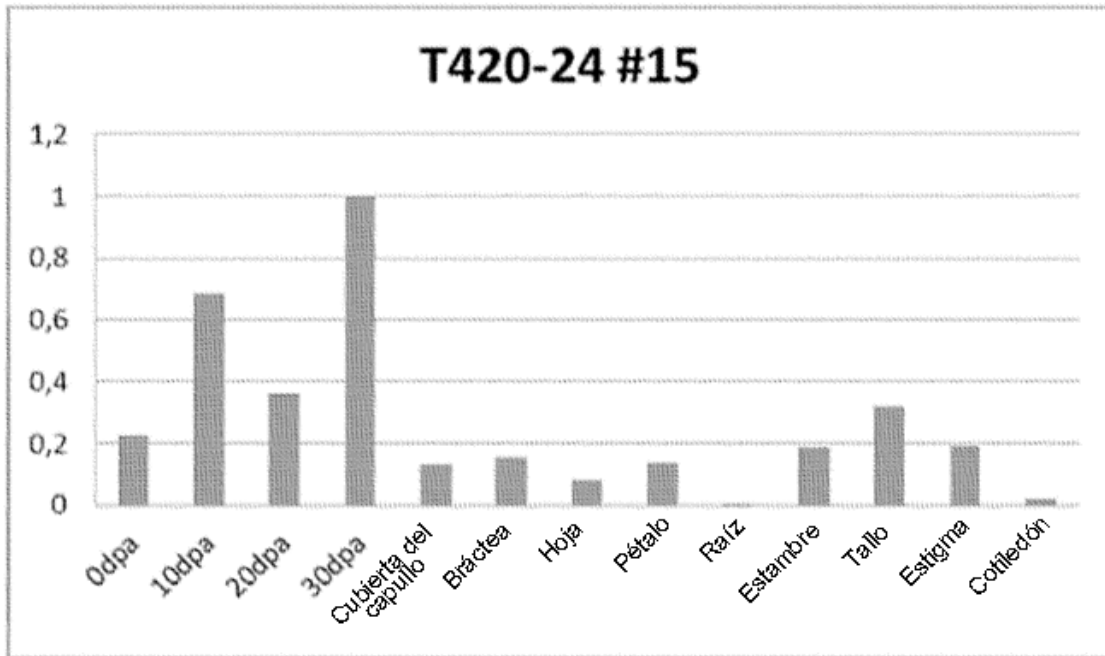


Figura 5B

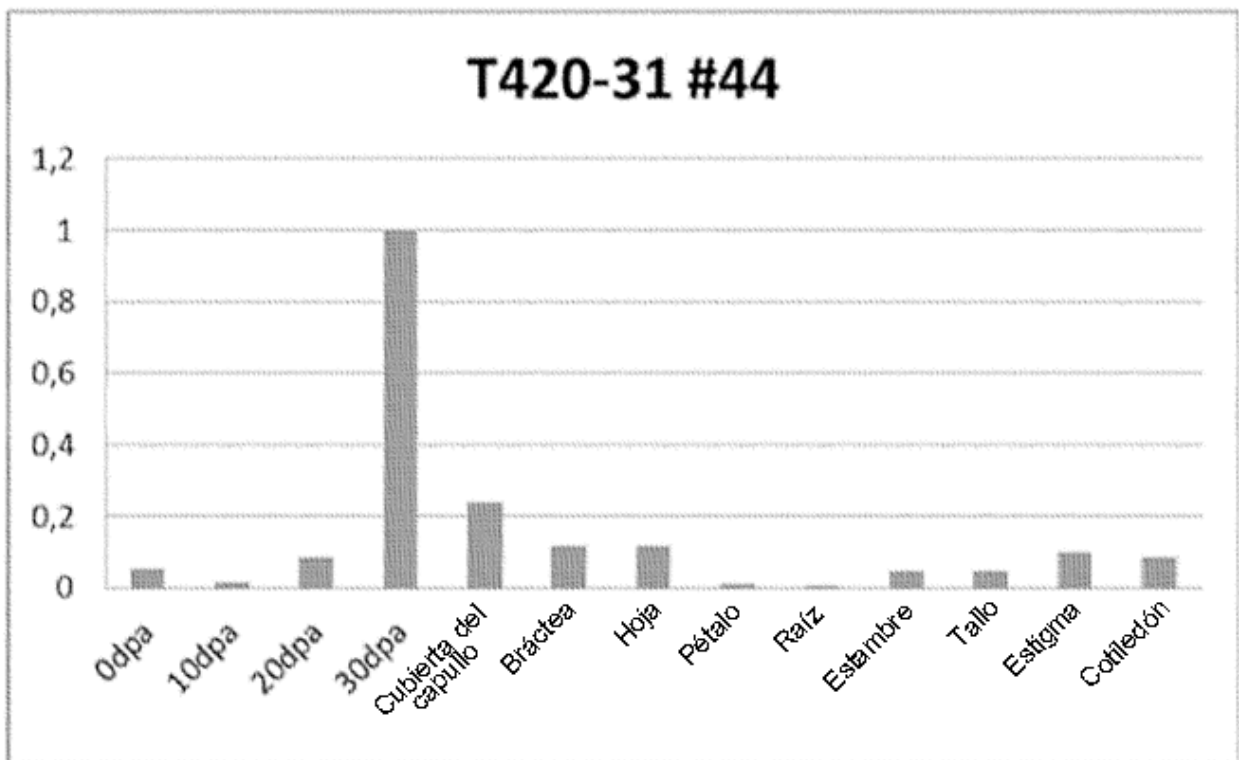
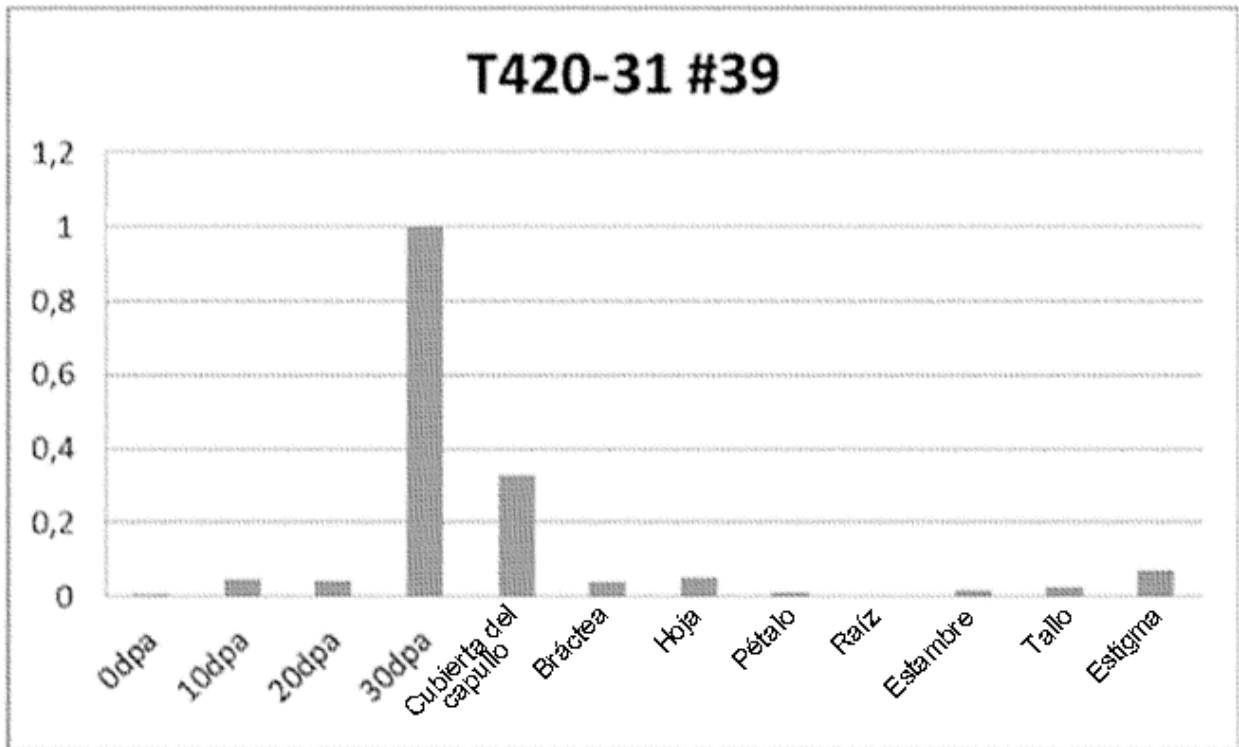


Figura 5C

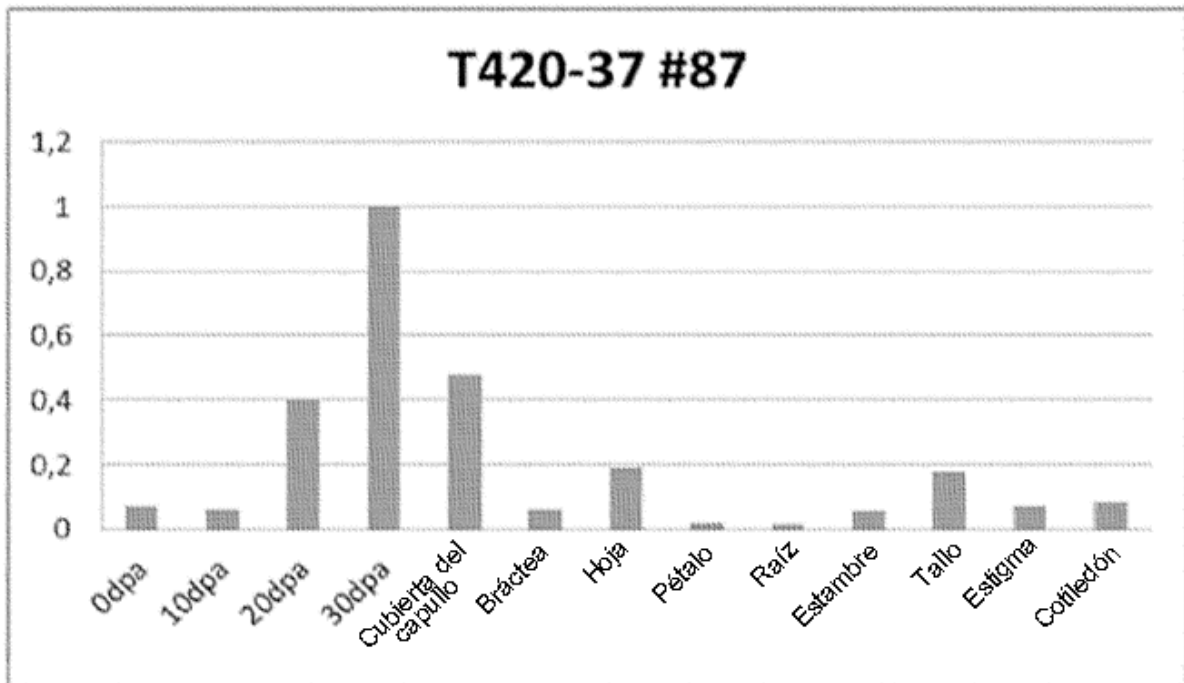
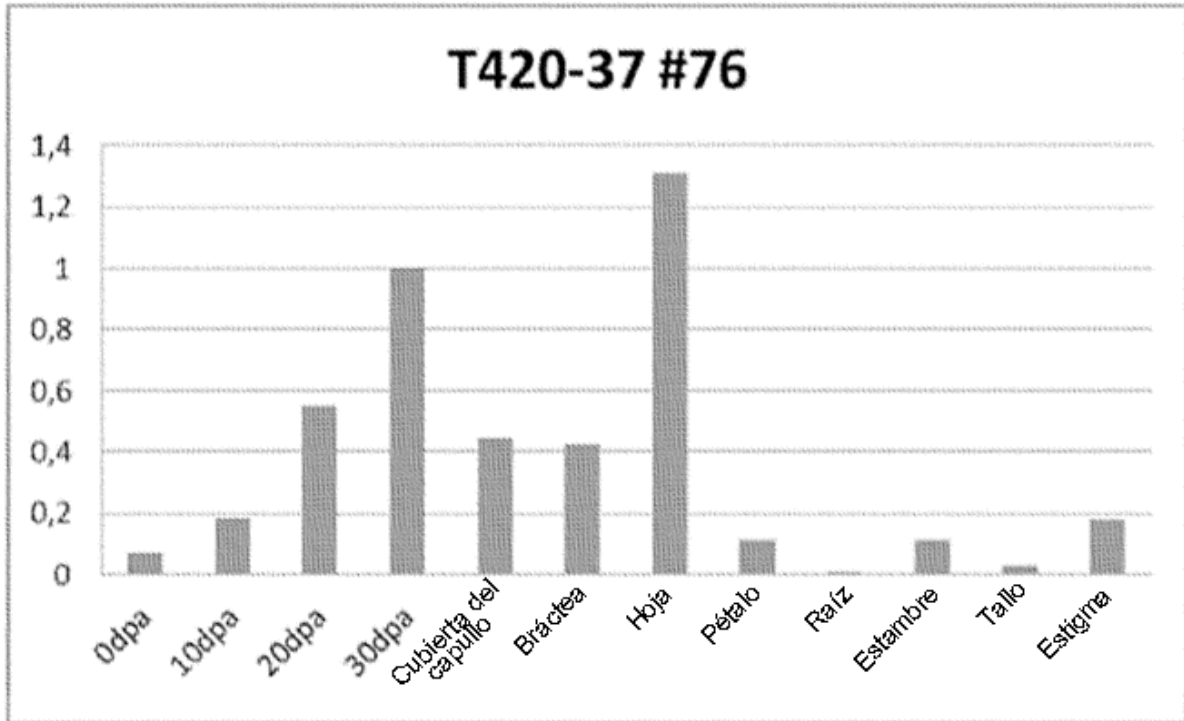


Figura 5D

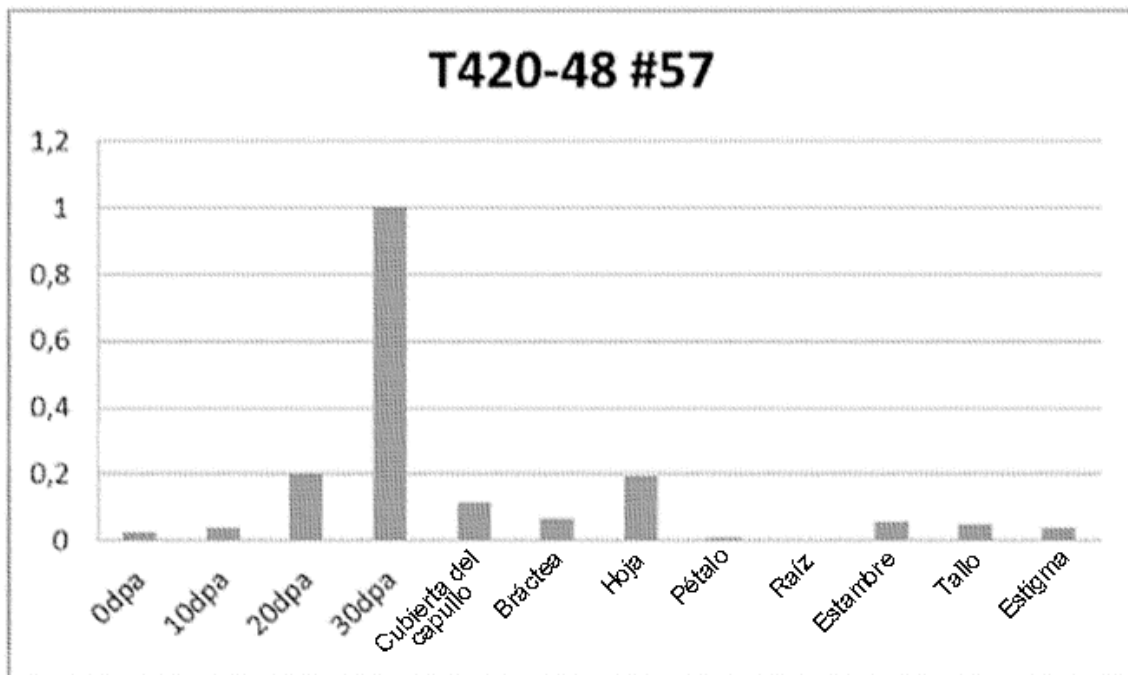
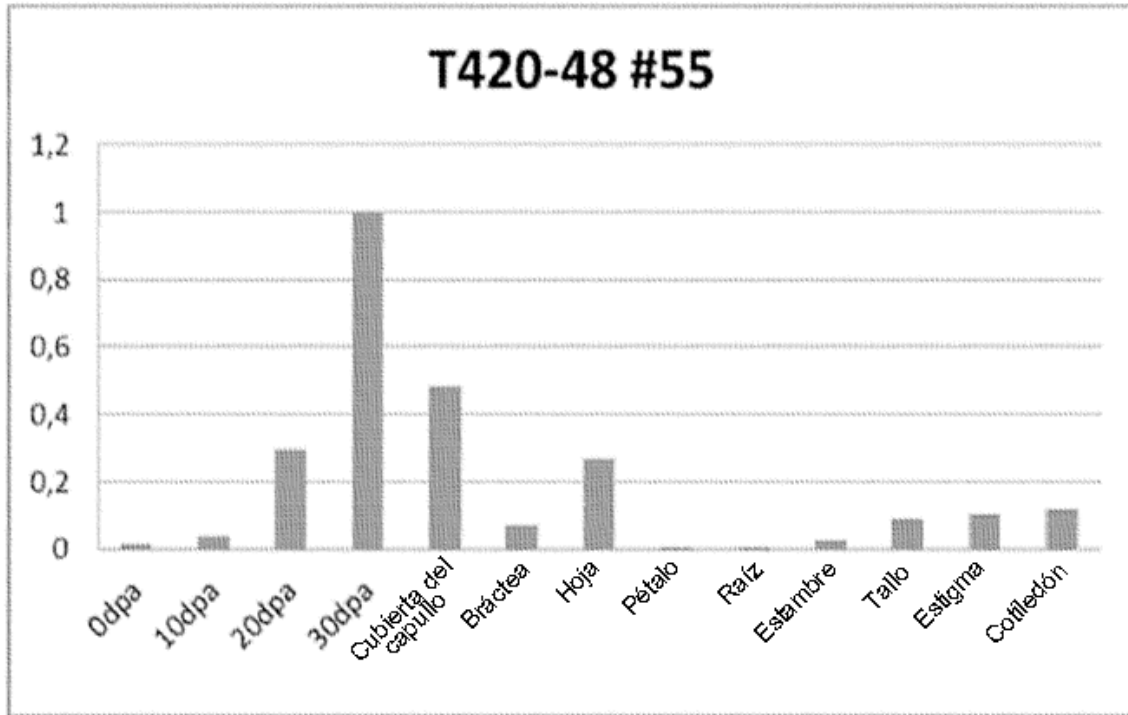


Figura 5E

	T420-24 planta 14	T420-24 planta 15	T420-31 planta 29	T420-31 planta 44	T420-37 planta 76	T420-37 planta 87	T420-48 planta 55	T420-48 planta 57		Media de todas las plantas	SD	SE
0dpa	0,013	0,226	0,007	0,051	0,069	0,072	0,013	0,026		0,060	0,072	0,026
10dpa	0,100	0,682	0,049	0,016	0,187	0,062	0,040	0,039		0,147	0,223	0,080
20dpa	0,337	0,360	0,043	0,085	0,548	0,404	0,293	0,200		0,284	0,168	0,060
30dpa	1,000	1,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,000
Cubierta del capullo a 10 dpa	1,185	0,129	0,329	0,241	0,444	0,478	0,483	0,113		0,425	0,341	0,122
Bráctea	0,570	0,154	0,037	0,116	0,425	0,062	0,071	0,067		0,188	0,198	0,071
Hoja	2,858	0,081	0,054	0,118	1,307	0,193	0,265	0,195		0,634	0,988	0,353
Pétalo	0,031	0,135	0,012	0,012	0,112	0,019	0,004	0,008		0,041	0,052	0,018
Raíz	0,000	0,001	0,005	0,001	0,010	0,013	0,001	0,002		0,004	0,005	0,002
Estambre	0,106	0,190	0,019	0,046	0,115	0,056	0,025	0,057		0,077	0,057	0,020
Tallo	0,776	0,318	0,024	0,049	0,030	0,177	0,089	0,047		0,189	0,257	0,092
Estigma	0,398	0,191	0,072	0,099	0,183	0,070	0,103	0,040		0,144	0,116	0,041
Cotiledón	nd	0,018	nd	0,084	nd	0,086	0,116	nd		0,076	0,041	0,021

Figura 6A

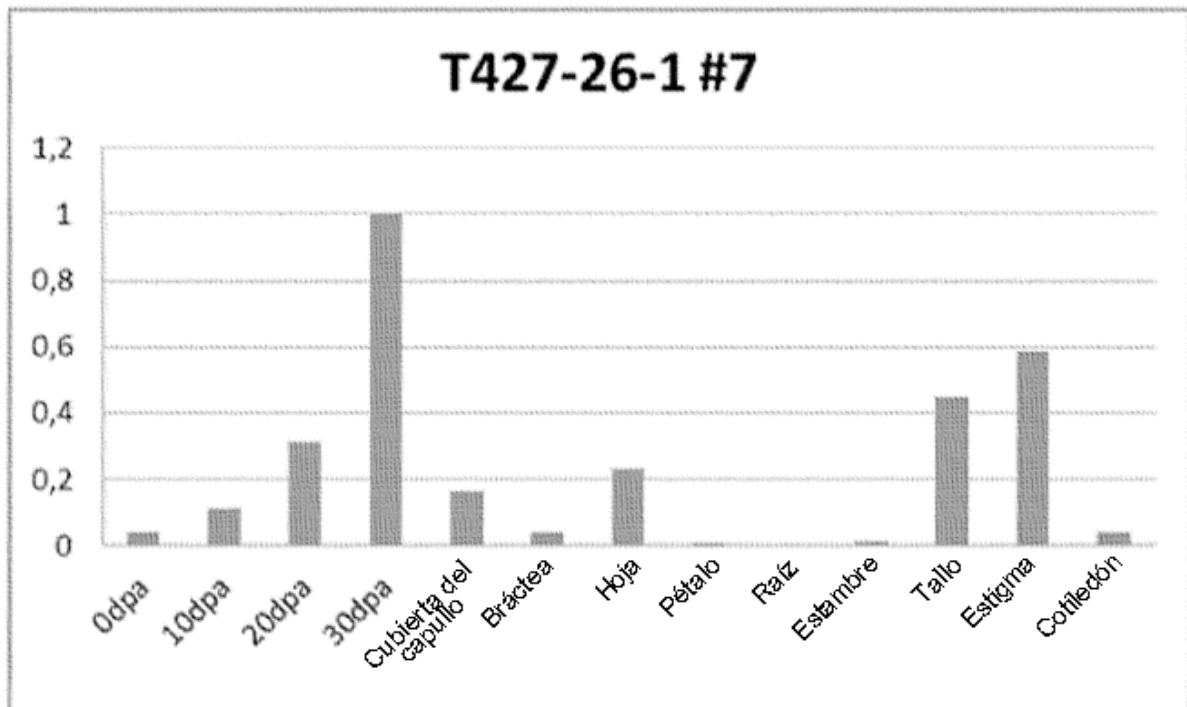
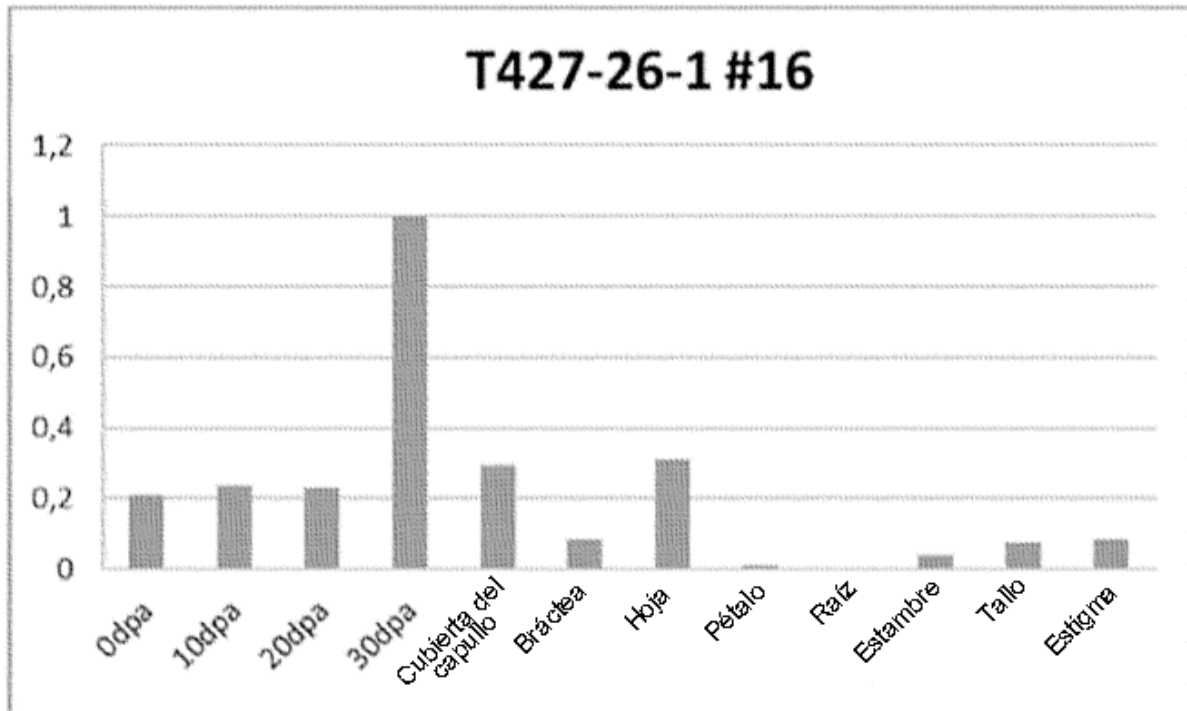


Figura 6B

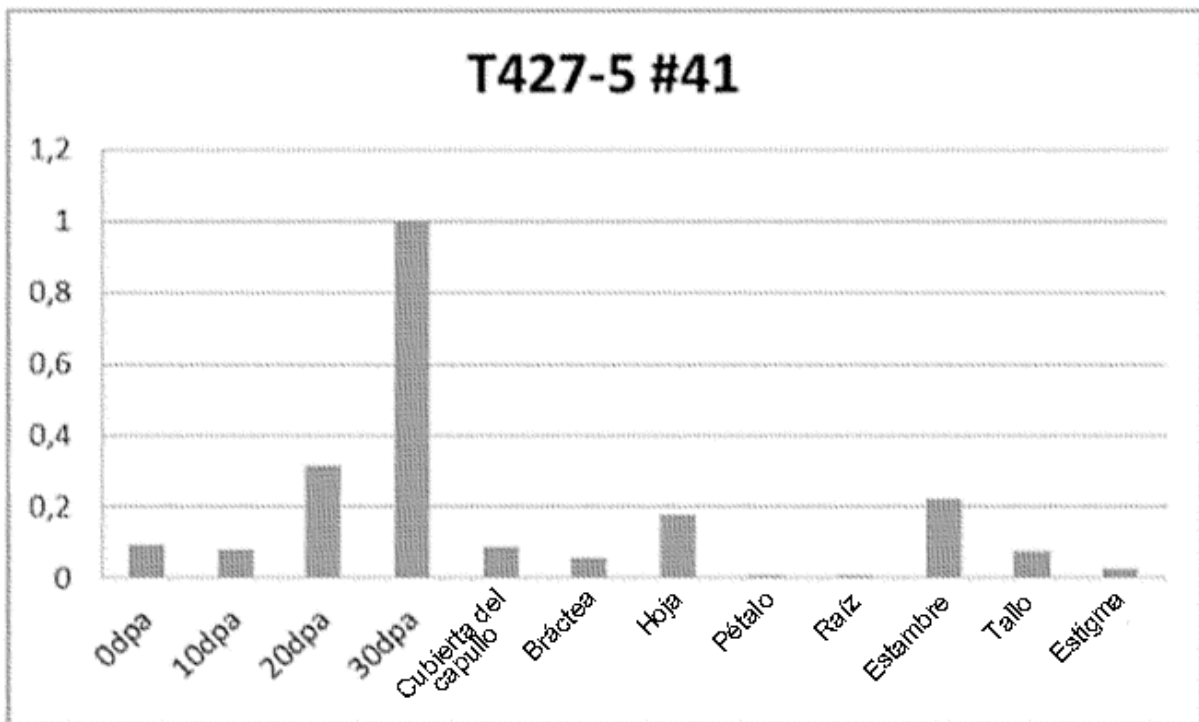
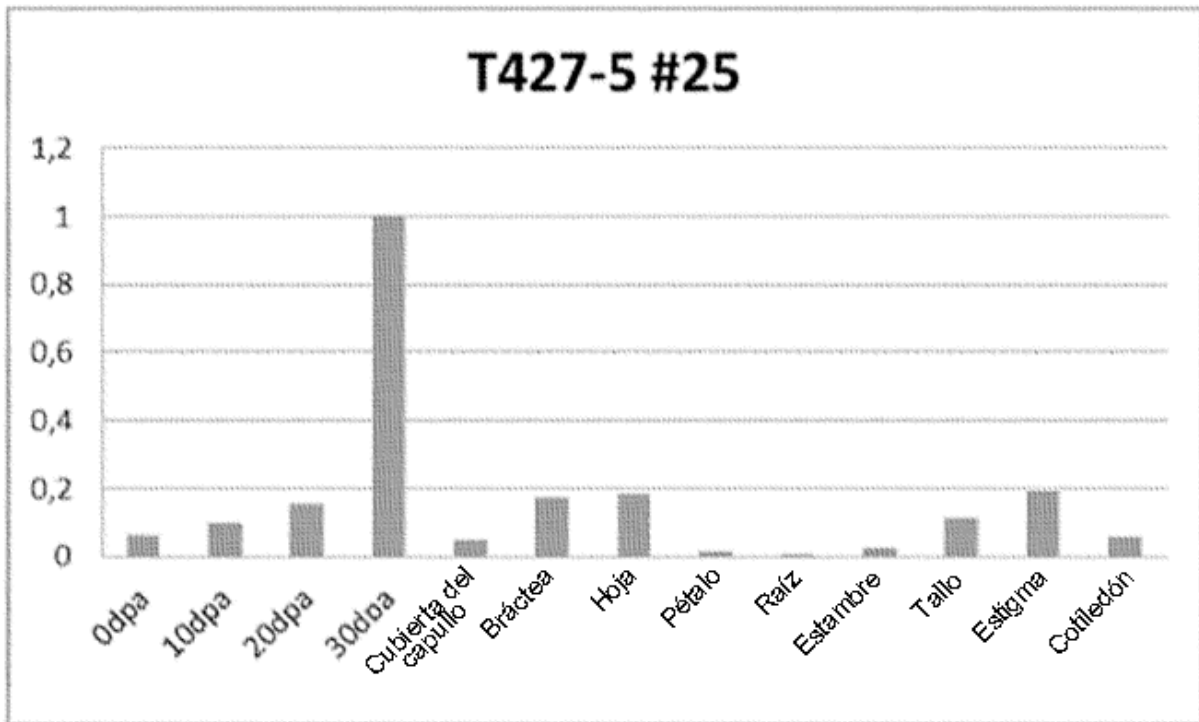


Figura 6C

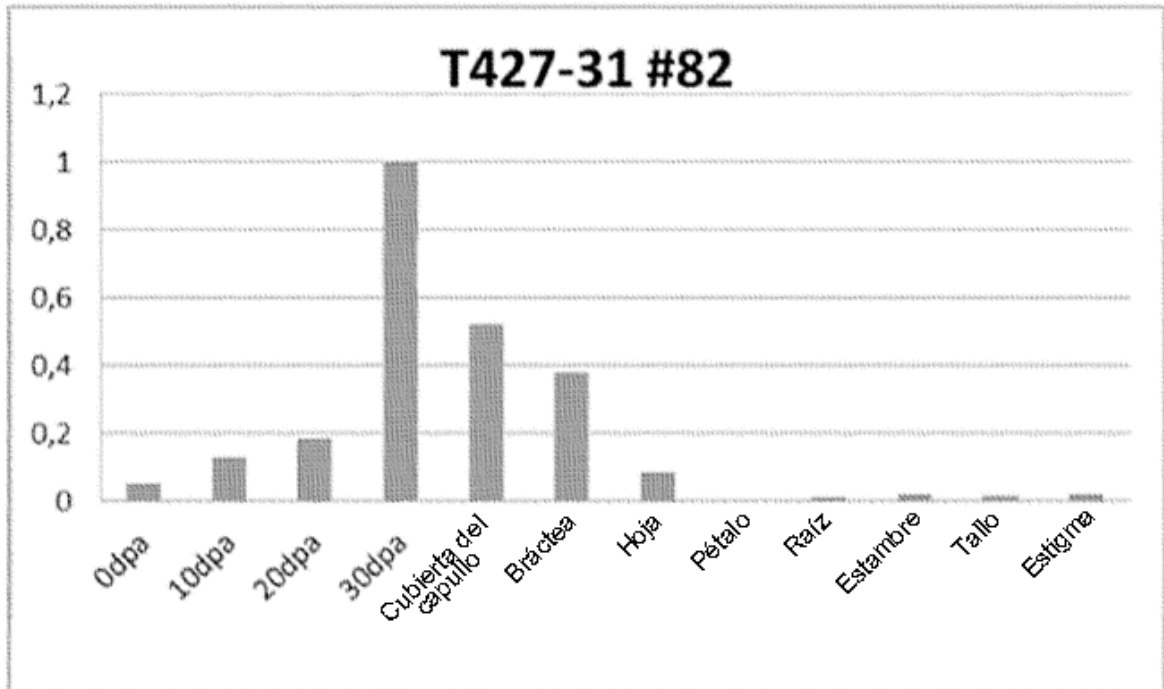
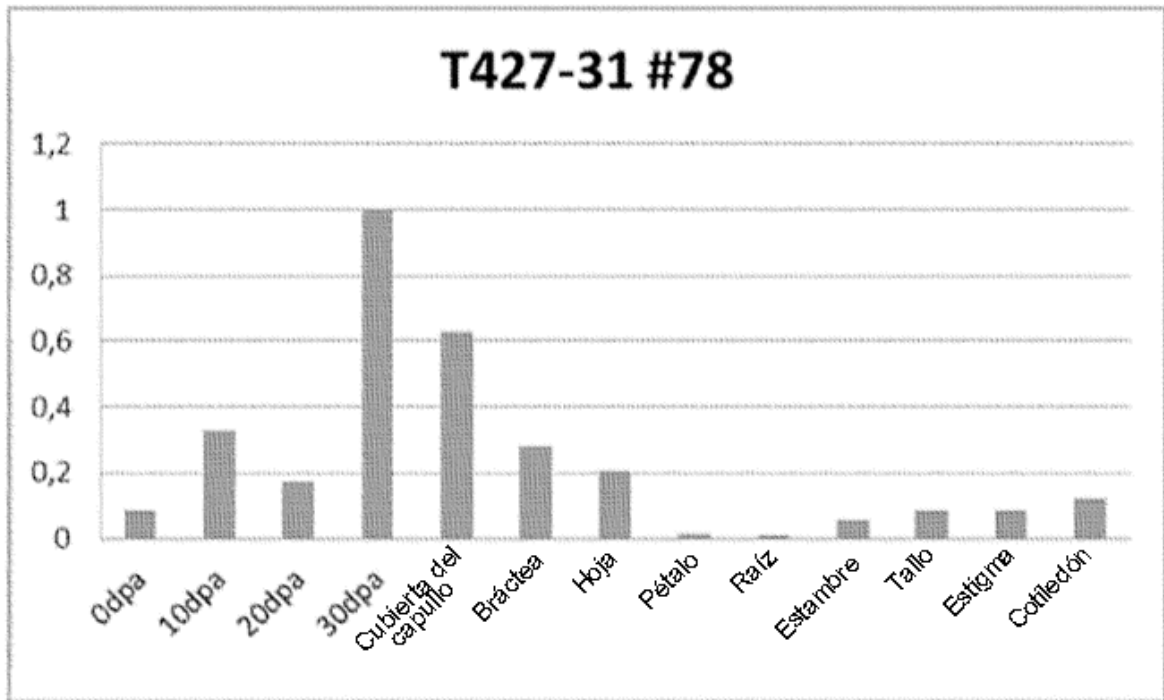


Figura 6D

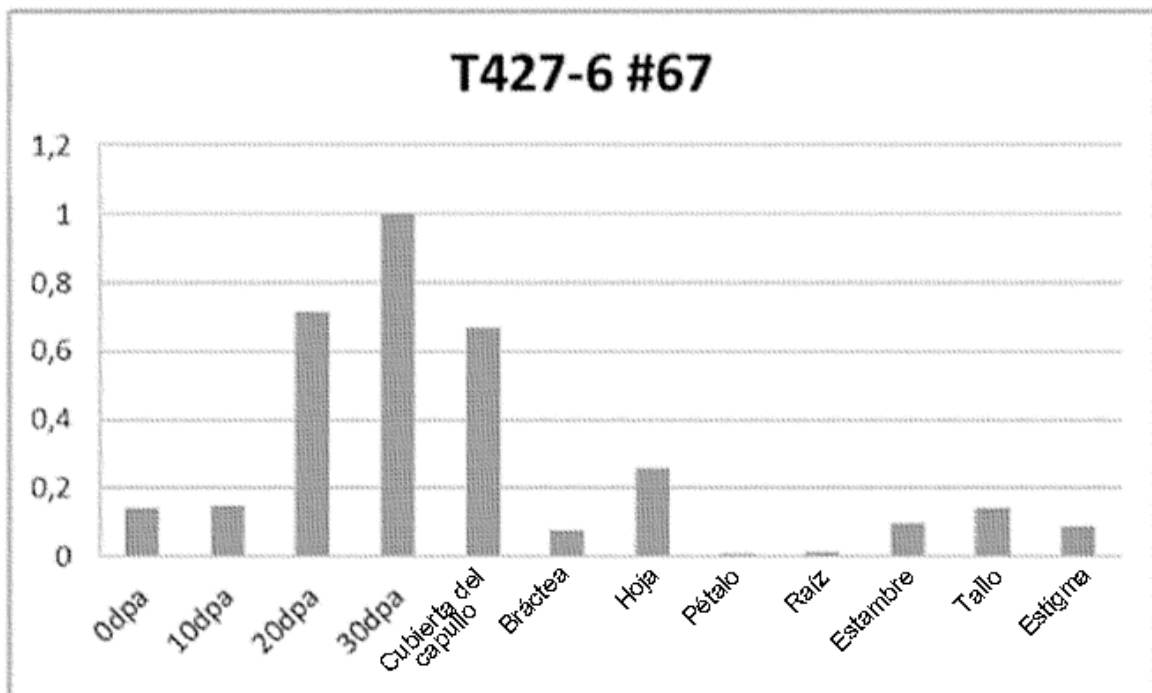
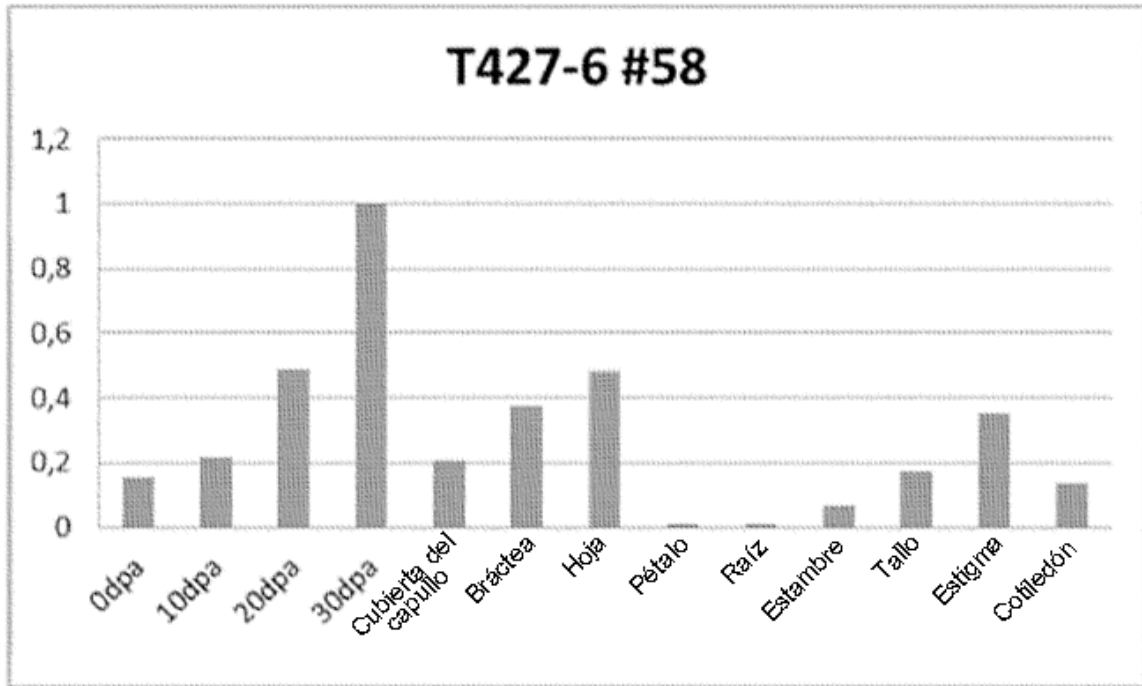


Figura 6E

	T427-26-1 planta 16	T427-26-1 planta 7	T427-5 planta 25	T427-5 planta 41	T427-31 planta 78	T427-31 planta 82	T427-6 planta 58	T427-6 planta 67	Media de todas las plantas	SD	SE
Odpa	0,210	0,041	0,061	0,092	0,085	0,052	0,155	0,141	0,105	0,059	0,021
10dpa	0,235	0,115	0,099	0,080	0,326	0,132	0,217	0,148	0,169	0,083	0,030
20dpa	0,229	0,311	0,155	0,317	0,173	0,185	0,487	0,711	0,321	0,191	0,068
30dpa	1,000	1,000	1,001	1,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
Cubierta del capullo a 10 dpa	0,293	0,166	0,048	0,089	0,626	0,521	0,207	0,667	0,327	0,244	0,086
Bráctea	0,083	0,042	0,176	0,055	0,283	0,381	0,375	0,075	0,184	0,143	0,051
Hoja	0,310	0,234	0,182	0,175	0,207	0,084	0,483	0,255	0,241	0,118	0,042
Pétalo	0,008	0,008	0,013	0,006	0,015	0,004	0,008	0,007	0,009	0,003	0,001
Raíz	0,003	0,006	0,005	0,009	0,010	0,012	0,008	0,010	0,008	0,003	0,001
Estambre	0,039	0,013	0,023	0,221	0,054	0,024	0,068	0,096	0,067	0,068	0,024
Tallo	0,076	0,448	0,114	0,073	0,086	0,015	0,173	0,141	0,141	0,133	0,047
Estigma	0,082	0,587	0,193	0,027	0,084	0,023	0,353	0,089	0,180	0,197	0,070
Cotiledón	nd	0,044	0,058	nd	0,121	nd	0,135	nd	0,089	0,045	0,022