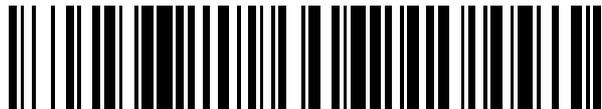


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 463**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2005 E 11154213 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2336330**

54 Título: **Polinucleótidos y polipéptidos implicados en el desarrollo de fibra vegetal y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

14.06.2004 US 578833 P

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

25.04.2018

73 Titular/es:

**EVOGENE LTD. (100.0%)
Gad Finstein Street 13
76121 Rechovot, IL**

72 Inventor/es:

**RONEN, GIL;
MEISSNER, RAFAEL;
KARCHI, HAGAI;
GOLD, EVGENIA;
YELIN, RODRIGO y
AYAL, SHARON**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 665 463 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

Polinucleótidos y polipéptidos implicados en el desarrollo de fibra vegetal y métodos de uso de los mismos

La presente invención se refiere polinucleótidos y polipéptidos implicados en el desarrollo de fibra vegetal y métodos de uso de los mismos.

5 La presente invención se refiere a un nuevo enfoque computacional que utiliza la genómica comparativa para identificar los genes que juegan un papel en el desarrollo de la fibra.

10 El algodón y los subproductos de algodón proporcionan materias primas que se usan para producir una riqueza de productos de consumo además de textiles que incluyen algodón, alimentos, alimentación del ganado, fertilizantes y papel. La producción, la comercialización, el consumo y el comercio de productos a base de algodón generan un exceso de 100 billones de \$ anualmente solo en los EE.UU., lo que hace al algodón el cultivo de valor añadido número uno.

15 Se estima que el uso de algodón como fibra por los seres humanos se remonta a 7000 años en América Central y a 5000 años en India. Incluso con el crecimiento de las fibras sintéticas en los últimos 50 años, el algodón sigue siendo responsable de aproximadamente el 50% de la fibra textil del mundo [Agrow Reports, Mercado Mundial de Semillas DS208, Octubre 2000].

20 A pesar de que el 90% del valor del algodón como un cultivo reside en la fibra (hebra), se ha reducido el rendimiento y calidad de la fibra, especialmente en la última década [Meredith (2000), Proc. World Cotton Research Conference II, Atenas, Grecia pgs. 97-101]. Este descenso se ha atribuido a la erosión general en la diversidad genética de las variedades de algodón, y una aumentada vulnerabilidad del cultivo a las condiciones ambientales [Bowman et al., Crop Sci. 36: 577-581 (1996); Meredith, supra].

25 Hay muchas variedades de planta de algodón, de las que se pueden obtener y usar para diversas aplicaciones fibras de algodón con una gama de características. Las fibras de algodón se pueden caracterizar según una variedad de propiedades, algunas de las cuales se consideran altamente deseables dentro de la industria textil para la producción de productos cada vez de más alta calidad y el óptimo aprovechamiento de las tecnologías modernas de hilado. Propiedades comercialmente deseables incluyen longitud, uniformidad de longitud, finura, relación de madurez, producción de fibra fuzz disminuida, micronaire, fuerza del haz, y fuerza de fibra individual. Se ha puesto mucho esfuerzo en la mejora de las características de las fibras de algodón centrándose principalmente en la longitud de fibra y la finura de fibra. En particular, hay una gran demanda de fibras de algodón de longitudes específicas.

30 Se pueden clasificar los métodos para mejorar las características o rendimiento de fibras de algodón en las tres siguientes categorías:

1. Mejora de la variedad por cruzamiento

35 Este método se ha utilizado ampliamente hasta ahora. En la actualidad, casi todas las variedades cultivadas de planta de algodón se crían por este método. Sin embargo, la mejora del rendimiento de fibra de algodón usando cruzamiento tradicional es relativamente lenta e ineficiente y el grado de variabilidad que se puede alcanzar es limitado.

2. Tratamiento con hormonas vegetales.

40 Se han usado ampliamente hormonas vegetales como auxina, giberelina, citoquinina y etileno en cultivos de campo y productos hortícolas. Es conocida la influencia de hormonas vegetales, particularmente giberelina, auxina y brasinolida, sobre las características de las fibras de plantas de algodón [p. ej. la Patente de EE.UU. N° 5880110 produce fibras de algodón con mejoradas características de fibra mediante tratamiento con brasinosteroides]. Sin embargo, no se ha documentado ningún efecto medible, haciendo el uso práctico de estas hormonas a gran escala altamente improbable.

3. Variedad mejorada por ingeniería genética.

45 La amplia aceptación del algodón modificado genéticamente en los principales países productores y el hecho de que es un cultivo no alimentario lo convierte en un atractivo candidato para la ingeniería genética para la mejora del rendimiento y/o calidad de fibra.

50 En los últimos años, se han hecho notables avances en ingeniería genética de plantas como resultado se han informado varios casos exitosos de mejora de variedad de plantas de cultivo comercialmente importantes (p. ej., algodón, soja, maíz, colza, tomate). Por ejemplo, se han desarrollado y puesto en uso práctico métodos de mejora de la resistencia a insectos mediante la introducción de un gen que codifica la toxina BT (es decir, la proteína toxina insecticida producida por Bacillus thuringiensis) en una planta de algodón. Además, se han diseñado genéticamente plantas de algodón con resistencia mejorada a herbicida (Glifosfato) mediante la introducción de un gen que codifica

el ácido 5-enol-piruvil-shiquímico 3-fosfato sintetasa.

La disponibilidad y el éxito de la ingeniería genética de plantas combinado con el hecho de que el algodón es un candidato excelente para la manipulación genética a través de técnicas recombinantes han llevado a los investigadores a postular que si se puede identificar un gen asociado con una propiedad mejorada de fibra de algodón, se puede regular a la alza usando técnicas recombinantes mejorando así las características o rendimiento de las fibras de algodón. Por el contrario, si se puede identificar un gen asociado con una disminución en una propiedad de la fibra de algodón, se podría regular a la baja usando métodos de silenciamiento génico. Para este propósito, se deben esclarecer los mecanismos de alargamiento y de formación de la fibra a nivel genético y se deben identificar genes estrechamente asociados con estos mecanismos.

5 Una fibra de algodón se compone de una única célula que se ha diferenciado a partir de una célula epidérmica de la cubierta de la semilla, desarrollándose a través de cuatro etapas, es decir, iniciación, alargamiento, engrosamiento de la pared celular secundaria y etapas de maduración. Más específicamente, el alargamiento de una fibra de algodón comienza en la célula epidérmica del óvulo inmediatamente después de la floración, después de lo cual la fibra de algodón se alarga rápidamente durante aproximadamente 21 días. El alargamiento de la fibra se termina entonces, y se forma una pared celular secundaria y crece a través de la maduración para convertirse en una fibra de algodón madura.

10 Se han aislados varios genes candidatos que están asociados con el alargamiento y formación de las fibras de algodón. Por ejemplo, se han identificado cinco genes de plantas de algodón que se expresan específicamente en la etapa de alargamiento de la fibra de algodón mediante el método de cribado diferencial y el método de visualización diferencial, [Patente de EE.UU. N° 5.880.100 y solicitudes de patente de EE.UU. N°s de Serie 08/580.545, 08/867.484 y 09/262.653].

15 WO0245485 describe métodos y medios para modular la calidad de la fibra en plantas productoras de fibra, como algodón, modulando la actividad y/o expresión de la sacarosa sintasa (un azúcar importante para la síntesis de la pared celular) en dichas plantas.

25 La Patente de EE.UU. N° 6.472.588 y WO0117333 proporcionan métodos para aumentar la calidad de la fibra de algodón producida a partir de una planta de algodón mediante transformación con un ADN que codifica sacarosa fosfato sintasa. Las cualidades de fibra incluyen resistencia, longitud, relación de madurez de fibra, contenido de fibra inmadura, uniformidad de fibra y micronaire.

30 WO9508914 describe una planta productora de fibra que comprende en su genoma un constructo genético heterólogo. El constructo genético comprende un promotor específico de fibra y una secuencia codificadora que codifica una peroxidasa vegetal, como una peroxidasa de algodón.

35 WO9626639 proporciona métodos en los que se utiliza una secuencia promotora específica de ovario para expresar hormonas que modifican el crecimiento vegetal en el tejido del óvulo de algodón. Los métodos permiten la modificación de las características del conjunto de cápsula en plantas de algodón y proporcionan un mecanismo para alterar las características de calidad de la fibra como dimensión y resistencia de la fibra.

40 La Patente de EE.UU. N° 5.981.834, la Patente de EE.UU. N° 5.597.718, la Patente de EE.UU. N° 5.620.882, la Patente de EE.UU. N° 5.521.708 y la Patente de EE.UU. N° 5.495.070 describen todas un método para modificar mediante ingeniería genética una planta productora de fibra y la identificación de clones de cDNA útiles para identificar genes de fibra en el algodón. Los clones de cDNA son útiles en el desarrollo de clones genómicos correspondientes de plantas productoras de fibra para llevar a cabo la ingeniería genética del algodón y otras plantas usando estos genes. Las secuencias codificadoras de estos genes aislados se usan en orientación sentido o anti-sentido para alterar las características de fibra de plantas productoras de fibra transgénicas.

45 Las solicitudes de patente de EE.UU. 2002049999 y EE.UU. 2003074697 describen ambas plantas de algodón del género *Gossypium* con características de fibra de algodón mejoradas. La planta de algodón tiene un casete de expresión que contiene un gen que codifica una enzima seleccionada del grupo que consiste en endoxiloglucan transferasa, catalasa y peroxidasa de modo que el gen se expresa en células de fibra de algodón para mejorar las características de la fibra de algodón.

WO 01/40250 proporciona métodos para mejorar la calidad de la fibra de algodón modulando la expresión génica del factor de transcripción.

50 WO 96/40924 proporciona nuevos constructos de ADN que se pueden usar como sondas moleculares o insertadas alternativamente en una planta huésped para proporcionar la modificación de la transcripción de una secuencia de ADN de interés durante varias etapas del desarrollo de la fibra de algodón. Los constructos de ADN comprenden una región reguladora de iniciación transcripcional de la fibra de algodón asociada con un gen, que se expresa en la fibra de algodón. También se proporciona un algodón nuevo que tiene una fibra de algodón que tiene un color natural. El color se logra mediante la introducción y expresión en la célula de fibra de algodón de un constructo génico de pigmento.

EP0834566 proporciona un gen que controla el mecanismo de formación de fibra en la planta de algodón y que se puede usar para la mejora industrialmente útil.

Sin embargo, junto a la Sacrosa Sintasa, no hay evidencia hasta la fecha de que la expresión de cualquier gen particular juegue un papel esencial en la formación de la fibra de algodón o características mejoradas de fibra.

5 Así, sigue habiendo una necesidad para identificar otros genes asociados con características de fibra de plantas de algodón y se requiere una búsqueda más exhaustiva para los genes relacionados con la calidad.

10 La US 2004031072 se refiere a polinucleótidos útiles para la mejora de plantas. En particular, se proporcionan secuencias de polinucleótidos de fuentes vegetales. También se proporcionan los polipéptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos. Los polinucleótidos y polipéptidos descritos encuentran uso en la producción de plantas transgénicas para producir plantas que tienen propiedades mejoradas.

15 La WO 03098186 proporciona genes de expansión (FE) de la fibra vegetal que codifican polipéptidos FE, como fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPcase), expansina, endoglucanasa, xiloglucan endoglicosiltransferasa (XET), y pectin metil esterasa (PME). Proporciona además promotores específicos de fibra. Aún más, la invención proporciona estrategias moleculares para modular la calidad y el rendimiento de la fibra en plantas productoras de fibra modulando la expresión de genes FE o formas mutantes de genes FE.

20 La US5495070 describe un método para modificar genéticamente una planta productora de fibra. Este método comprende primero la etapa de construir un vector de expresión en plantas que comprende una secuencia que codifica una proteína y una secuencia de ADN capaz de promover la expresión génica en células de fibra, en donde la secuencia de ADN es homóloga a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en 12 secuencias genómicas diferentes. Después el método implica introducir el vector de expresión dentro de una planta productora de fibra en donde la secuencia que codifica la proteína se expresa en las células de fibra de la planta productora de fibra. También se describe un método de obtención de una secuencia de ADN capaz de promover la expresión génica en células de fibra.

25 La WO 9508914 se refiere a una planta productora de fibra que comprende en su genoma un constructo genético heterólogo. Este constructo genético comprende un promotor específico de fibra y una secuencia codificadora que codifica una peroxidasa vegetal. Preferiblemente, la secuencia codificadora es de peroxidasa de algodón. También se describen las semillas de la planta que contiene este constructo genético y células vegetales que contienen este constructo.

30 La WO 0117333 se refiere a un método para controlar la síntesis de celulosa en plantas para optimizar el nivel de producción y calidad de los productos derivados de la planta. En particular, proporciona una planta de algodón transgénica que tiene altos rendimientos de fibra y semilla de algodón. También proporciona métodos para aumentar la calidad de la fibra de algodón producida a partir de una planta de algodón. También proporciona métodos generales para cambiar la relación de celulosa con otros componentes de la planta en peso seco, para cambiar el grosor de las paredes celulares, para aumentar el rendimiento y cambiar la calidad de otras fibras vegetales, para aumentar el rendimiento de semilla, y para aumentar la tolerancia de eficacia fotosintética a temperaturas nocturnas frías.

35 La WO 9626639 se refiere a métodos Novedosos a través de los cuales las secuencias codificadoras que dirigen preferencialmente la expresión génica en tejido de ovario, particularmente en el desarrollo temprano de la fruta, se utilizan para expresar hormonas que modifican el crecimiento vegetal en tejido de óvulo de algodón. Estos métodos permiten la modificación de las características del conjunto de vainas y en plantas de algodón y proporcionan un mecanismo para alterar las características de calidad de fibra como dimensión y fuerza de fibra.

40 La US 2002049999 tiene que ver con plantas de Algodón del género *Gossypium* con características de fibra de algodón mejoradas. La planta de algodón tiene un casete de expresión que contiene un gen que codifica una enzima seleccionada del grupo que consiste en endoxiloglucan transferasa, catalasa y peroxidasa para que el gen se exprese en células de fibra de algodón para mejorar las características de la fibra de algodón. También se describe un método para producir fibras de algodón con características de fibra mejoradas a partir de estas plantas de algodón.

45 La WO 9640924 se refiere a constructos de ADN novedosos que se pueden usar como sondas moleculares o insertarse en un huésped vegetal para proporcionar modificación de la transcripción de una secuencia de ADN de interés durante varias etapas del desarrollo de la fibra de algodón. Los constructos de ADN comprenden una región reguladora de iniciación transcripcional de la fibra de algodón asociada con un gen que se expresa en fibra de algodón. También se proporciona un algodón novedoso que tiene una fibra de algodón que tiene un color natural introducido mediante la expresión en la célula de fibra de algodón, que usa tal constructo, de genes de síntesis de pigmento. Se incluyen células de fibra de algodón que tienen un color generado mediante ingeniería genética y células de algodón que comprenden melanina y pigmentos añil.

55 "mRNA de proteína desconocida de *Arabidopsis thaliana* (At3g52610), cds completa", DATABASE EMBL, (20010613), Nº de acceso a la base de datos AY034915.

“ADN del cromosoma 3 de Arabidopsis thaliana, BAC clon F3C22”, DATABASE EMBL, (20000427), N° de acceso a la base de datos AL353912.

“GA_Eb0026P18f de Gossypium arboreum 7-10 dpa librería de cDNA de fibra de Gossypium arboreum clon GA_Eb0026P18f, secuencia de mRNA”, DATABASE EMBL, (20001120), N° de acceso a la base de datos BF277249.

5 “mRNA de expansina de Gossypium hirsutum, cds completa”, DATABASE EMBL, (20030520), N° de acceso a la base de datos AY189969.

Ji Sheng-Jian et al., se refiere a “Aislamiento y análisis de genes expresados preferencialmente durante el desarrollo temprano de la fibra de algodón mediante PCR sustractiva y arrays de cDNA.”, Nucleic Acids Research 15 May 2003, vol. 31, n° 10, ISSN 1362-4962, pags. 2534-2543.

10 Pero reduciendo la presente invención a la práctica, los presentes inventores idearon y emplearon un nuevo enfoque computacional que utiliza la genómica comparativa para identificar genes que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la fibra. Como se ha demostrado en esta memoria, la expresión de dichos genes se correlaciona con la longitud de fibra y su sobre-expresión es suficiente para modificar el pelo de la semilla de tomate, un modelo reciente para fibras de algodón. Estos resultados sugieren que los polinucleótidos descritos en el presente documento se pueden usar para generar plantas de algodón transgénicas que se caracterizan por fibras de longitud deseada.

Compendio de la invención

20 La presente invención se refiere a un método de mejora del alargamiento de fibra de una planta, método que comprende expresar en la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7, en donde dicho polinucleótido es capaz de regular el desarrollo de la fibra de algodón, mejorando de este modo el alargamiento de la fibra de la planta, en donde dicha mejora de dicho alargamiento de la fibra se realiza en una planta productora de fibra.

25 La presente invención también se refiere a un método de mejora del alargamiento de fibra de una planta, método que comprende expresar en la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 112, mejorando de este modo el alargamiento de la fibra de la planta, en donde dicha mejora de dicho alargamiento de la fibra se realiza en una planta productora de fibra.

30 La presente invención aún se refiere a una célula vegetal transgénica que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7, y un promotor capaz de regular la expresión de dicho polinucleótido en la célula vegetal transgénica, en donde dicho promotor es heterólogo a la célula vegetal transgénica, en donde dicho polinucleótido y célula vegetal transgénica mejora el alargamiento de la fibra de una planta productora de fibra de una planta.

35 Preferiblemente, dicho polinucleótido es al menos 90% idéntico al polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7.

Preferiblemente, dicho polinucleótido tiene al menos 95% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7.

Preferiblemente, dicho promotor se expone en SEQ ID NO: 74, 75, 85 o 91 de un equivalente funcional del mismo.

40 Preferiblemente, dicho promotor es un promotor constitutivo.

Preferiblemente, dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor inducible, un promotor de desarrollo específico de etapa y un promotor específico de tejido.

La presente invención se refiere a una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica.

45 La presente invención se refiere a un método de generar una planta transgénica, que comprende expresar dentro de la planta un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7, y un promotor capaz de regular la expresión de dicho polinucleótido en una célula vegetal, en donde dicho promotor es heterólogo a la célula vegetal transgénica, en donde dicho polinucleótido mejora el alargamiento de la fibra de una planta productora de fibra, generando de este modo la planta transgénica.

50 Preferiblemente, dicha planta es algodón.

La presente invención se refiere a un método para producir fibras de algodón, método que comprende:

- (a) generar una planta de algodón transgénica de acuerdo con el método de la reivindicación 11, y
- (b) recoger las fibras de la planta de algodón transgénica,

produciendo de este modo las fibras de algodón.

Preferiblemente, la planta es una planta monocotiledónea.

- 5 Preferiblemente, la planta es una planta dicotiledónea.

Preferiblemente, dicho polinucleótido se expone en SEQ ID NO: 7.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

- 10 La FIG. 1 es una ilustración que representa la metodología bioinformática de la presente descripción llevada a cabo para identificar genes que se pueden usar para mejorar el rendimiento y calidad de la fibra de algodón.

Las FIGs. 2a-d son gráficos de barras que muestran los patrones de expresión de los genes específicos de fibra (CT_11 Figura 2b), genes asociados con el alargamiento (CT_1, Figura 2c) y genes asociados con la iniciación (CT_22, Figura 2d).

- 15 La FIG. 3 es un gráfico que representa la expresión de CT_76 en variedades de plantas de algodón (*G. hirsutum* var Tamcot, Coker y Acala, y *G. barbadense* var Prima S5), como se determina por RT-PCR.

La FIG. 4 es una ilustración esquemática del plásmido binario pPi.

- 20 Las FIGs. 5a-1 son fotografías de plantas de *arabidopsis* salvajes y transgénicas que sobre-expresan genes de la presente descripción. La Figura 5a muestra roseta de dos semanas de plantas wt; la Figura 5b muestra roseta de dos semanas de plantas de *arabidopsis* que sobre-expresan CT11; la Figura 5c muestra raíces de dos semanas de CT11; la Figura 5d muestra *arabidopsis* salvaje de tres semanas; la Figura 5e muestra CT_20 de tres semanas; la Figura 5f muestra CT_22 de tres semanas; la Figura 5g muestra rosetas de 30 días de wt y de CT_9; la Figura 5h muestra la fluorescencia de 30 días de wt y de CT_9; la Figura 5i muestra raíces de dos semanas de CT9; la Figura 5j muestra rosetas de 30 días de wt y de CT_40; la Figura 5k muestra roseta de 5 semanas de plantas wt y que sobre-expresan CT81; la Figura 5l muestra una hoja de plantas de *arabidopsis* wt y que sobre-expresan CT81.

- 25 Las FIGs. 6a-e son fotografías que representan plantas de tomate salvaje y transgénicas que sobre-expresan CT_20. La Figura 6a muestra una hoja de una planta salvaje; la Figura 6b muestra una hoja de un tomate transgénico CT_20; la Figura 6c muestra pelos de semilla de plantas de tomate WT y que sobre-expresan CT_20; la Figura 6d muestra una sección de una semilla de tomate WT; la Figura 6e muestra una sección de una semilla de tomate que sobre-expresa CT_20; la Figura 6f pelos de semilla de WT y de CT_82.

- 30 Las FIGs. 7a-b son fotografías que representan plantas de tomate transgénicas que sobre-expresan GUS bajo la expresión del promotor CT_2. La Figura 7a es un corte transversal de fruto de tomate transgénico, que sobre-expresa GUS bajo el promotor CT2 en la etapa verde madura (aumento 5x). La Figura 7b similar a la Figura 7a muestra aumento 25 x;

- 35 Las FIGs. 8a-b son fotografías que representan varios aumentos de frutos de tomate o semillas de tomate salvaje y transgénico. La Figura 8a es una semilla de tomate salvaje única cubierta con pelos de semilla aumento 10x; la Figura 8b muestra semilla de tomate que sobre-expresa expansina bajo 35S (aumento 10x).

Descripción de los aspectos preferidos

- 40 La presente descripción es de polipéptidos y polinucleótidos que codifican lo mismo que están implicados en el desarrollo de la fibra vegetal y los cuales se pueden usar para mejorar la calidad y/o rendimiento/biomasa de la fibra de una planta productora de fibra.

Los principios y funcionamiento de la presente descripción se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y las descripciones correspondientes.

- 45 Antes de explicar al menos un aspecto de la descripción en detalle, se debe entender que la descripción no está limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La descripción es capaz de otros aspectos o de paracticarse o de llevarse a cabo de varias maneras. También, se debe entender que la fraseología y terminología empleada en esta memoria es para propósito de la descripción. El algodón y los subproductos de algodón proporcionan materias primas que se usan para producir una gran cantidad de productos de consumo; además de textiles, el algodón se usa para producir productos alimenticios, alimentos para el ganado, fertilizantes y papel. La producción, la comercialización, el consumo y el comercio de productos a
- 50 base de algodón generan un exceso de 100 billones de \$ anualmente solo en los EE.UU., lo que hace al algodón el

cultivo de valor añadido número uno.

Durante la pasada década la producción de fibra de algodón ha disminuido drásticamente dando lugar a que los productores e investigadores busquen otros enfoques, que se pueden usar para mejorar el rendimiento y calidad de la fibra.

- 5 El aumento de la calidad y/o rendimiento de la fibra bajo diversas condiciones ambientales aumentará la rentabilidad de la producción de cultivos de algodón y proporcionará un nuevo espectro de propiedades del material para la explotación por las industrias de transformación.

10 Pero reduciendo la presente invención a la práctica, los presentes inventores han configurado un nuevo enfoque informático que utiliza la genómica comparativa para identificar los genes que desempeñan un papel en el desarrollo de la fibra. Los genes identificados usando este enfoque se pueden usar con éxito para generar plantas transgénicas que se caracterizan por fibras de propiedades deseadas.

De esta manera, según un aspecto de la presente descripción se proporciona un método de identificación de genes que están implicados en el desarrollo de la fibra de algodón.

15 Tal como se usa en esta memoria el término "algodón" se refiere a una variedad cultivada de tipo salvaje (p. ej., híbrido) o una planta de algodón transgénico (*Gossypium*).

Tal como se usa en esta memoria la frase "desarrollo de la fibra" se refiere al desarrollo del pelo de la semilla de algodón.

20 Tal como se usa en esta memoria el término "desarrollo" cuando se usa en el contexto de fibras de algodón se refiere a la iniciación de la fibra y/o alargamiento de la misma, así como al engrosamiento y maduración de la pared celular secundaria de la fibra.

El método según este aspecto de la presente descripción se efectúa mediante:

- (a) proporcionar secuencias de ácido nucleico expresadas derivadas de fibras de algodón;
- (b) proporcionar secuencias de ácido nucleico expresadas derivadas de un tejido de óvulo (es decir, un tejido desarrollado a partir de un ovario de una planta de semilla. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, carpelos, cubierta de semilla, embrión, endosperma);
- 25 (c) ensamblar informáticamente las secuencias de ácido nucleico expresadas de (a) y (b) para generar agrupamientos; y
- (d) identificar agrupamientos de tales agrupamientos que comprenden secuencias de ácido nucleico expresadas de (a) y (b), identificando de este modo genes que están implicados en el desarrollo de la fibra de algodón.

30 Secuencias de ácido nucleico expresadas usadas como una fuente potencial para identificar genes implicados en el desarrollo de la fibra de algodón según este aspecto de la presente descripción son preferiblemente bibliotecas de ARN mensajero expresados [es decir, etiquetas de secuencias expresadas (EST), clones de cDNA, contigs, pre-mRNA, etc.] obtenidos a partir de preparaciones de tejido o de línea celular que pueden incluir secuencia genómica o de cDNA.

35 Las secuencias de ácido nucleico expresadas, según este aspecto de la presente descripción, se pueden recuperar a partir de bases de datos pre-existentes disponibles públicamente (véase Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue o bases de datos privadas).

40 Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico expresadas utilizadas por la presente descripción se pueden generar a partir de bibliotecas de secuencias (p. ej., bibliotecas de cDNA, bibliotecas de EST, bibliotecas de mRNA y otras).

Las bibliotecas de cDNA son fuentes adecuadas de información de secuencia expresada.

En tal caso generar una base de datos de secuencia se efectúa típicamente mediante preparación de la muestra de tejido o celular, aislamiento de ARN, construcción de biblioteca de cDNA y secuenciación.

45 Se apreciará que tales bibliotecas de cDNA se puedan construir a partir de ARN aislado de la planta completa, tejidos específicos, o poblaciones celulares.

Una vez que se obtienen los datos de secuencia expresada tanto de de fibras algodón como de tejido de óvulo, se pueden agrupar las secuencias para formar contigs. Véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue.

Tales contigs se ensamblan entonces para identificar secuencias homólogas (de fibras de algodón y tejido de óvulo) presentes en el mismo agrupamiento, se considera que tales contigs están implicados en el desarrollo de la fibra de

algodón.

Están disponibles comercialmente un número de ensambladores de lectura de fragmentos de software informático comúnmente usados capaces de formar agrupamientos de secuencias expresadas. Estos paquetes incluyen pero no se limitan a, El Ensamblador TIGR [Sutton G. et al. (1995) *Genome Science and Technology* 1: 9-19], GAP [Bonfield JK. et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 4992-4999], CAP2 [Huang X. et al. (1996) *Genomics* 33: 21-31], The Genome Construction Manager [Lawrence CB. Et al. (1994) *Genomics* 23: 192-201], Bio Image Sequence Assembly Manager, SeqMan [Swindell SR. y Plasterer JN. (1997) *Methods Mol. Biol.* 70: 75-89], LEADS y GenCarta (Compugen Ltd. Israel).

Una vez que se identifican los genes que están implicados en el desarrollo de la fibra de algodón se puede analizar su patrón de expresión como se describe en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue, para identificar de este modo genes que están expresados diferencialmente en la fibra de algodón (es decir, expresión específica) o durante el desarrollo de la fibra de algodón (es decir, cambio en la expresión durante el desarrollo de la fibra de algodón).

Son bien conocidos en la técnica métodos para identificar genes expresados diferencialmente.

Usando la metodología anterior, los presentes inventores fueron capaces de identificar genes que están implicados en el desarrollo de la fibra de algodón.

Como se ilustra en la sección de Ejemplos que sigue se pueden clasificar los genes identificados usando las enseñanzas de la presente invención en 6 categorías funcionales según su homología de secuencia con proteínas y enzimas conocidas (Tabla 3, a continuación). Los dos genes se clasificaron en una categoría de compromiso de destino celular: homólogo al factor de transcripción MYB y a GL3 que se sabe que están implicados en el desarrollo del tricoma en *arabidopsis*. Los patrones de expresión de ambos genes y el fenotipo del transgen CT20 ambos en plantas de *arabidopsis* y tomate T1 apoyan su implicación principalmente en la fase de iniciación. Los otros dos genes (Tabla 3, más arriba) son factores de transcripción de las familias MYB y MADS BOX. Muchos estudios demostraron la función de estas dos familias de factores de transcripción como genes homeóticos con papel clave en diferentes procesos de desarrollo, entre ellos está la morfogénesis de tricomas y de la fibra (Suo. J. et al. 2003, Ferrario S et al. 2004). Su papel en las primeras etapas de desarrollo de la fibra se apoya también por sus patrones de expresión de ARN, que se inducen antes, y durante el día de antesis. Un gen pertenece a las rutas del metabolismo del almidón y de la sacarosa. Un trabajo reciente demuestra que otro gen (SUS), que pertenece a esta ruta, es un factor limitante tanto en la iniciación de la fibra como en el desarrollo. Otro gen (Tabla 3, más adelante) se clasifica como transporte de lípidos cuya expresión de ARN se induce altamente durante la etapa temprana de alargamiento de la fibra se ajusta al hecho de que los lípidos son componentes clave en la formación de la fibra. Varios genes (Tabla 3, más adelante) se clasificaron ya sea como genes implicados en desecación, respuesta a la salinidad estimulada por ácido abscísico y genes implicados en la transferencia de electrones. De ellos 3 genes se seleccionaron por patrón de expresión de ARN que se inducían en la etapa de alargamiento.

En vista de lo anterior y junto con los resultados experimentales que correlacionan la expresión génica con la longitud de la fibra, se sugiere que los genes de la presente descripción se pueden usar para generar plantas productoras de fibra con calidad de fibra comercialmente deseada.

Por lo tanto, la presente descripción incluye polinucleótidos identificados usando la presente metodología y sus polipéptidos codificados así como equivalentes funcionales de los polipéptidos identificados en la presente memoria (es decir, polipéptidos que son capaces de regular el desarrollo de la fibra de algodón, como se puede determinar según los ensayos descritos en la sección de Ejemplos que sigue) y sus secuencias codificadoras. Tales equivalentes funcionales pueden ser al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 75%, se dice 100% homólogos a la SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 95 o 96.

Polinucleótidos que codifican equivalentes funcionales pueden ser al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 75%, se dice 100% idénticos a la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27.

La homología (p. ej., porcentaje de homología) se puede determinar usando cualquier software de comparación de homología, incluyendo por ejemplo, el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) como usando los parámetros por defecto.

5 La identidad (p. ej., porcentaje de homología) se puede determinar usando cualquier software de comparación de homología, incluyendo por ejemplo, el software BlastN del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) como usando los parámetros por defecto.

10 Como se usa en esta memoria la frase “un polinucleótido aislado” se refiere a unas secuencias de ácido nucleico de cadena sencilla o doble que se aíslan o proporcionan en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (cDNA), una secuencia de polinucleótido genómica y/o unas secuencias de polinucleótido compuestas (p. ej., una combinación de las anteriores).

Como se usa en esta memoria la frase “secuencia de polinucleótido complementaria” se refiere a una secuencia, que resulta de la transcripción inversa de un ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Tal secuencia se puede amplificar posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

15 Como se usa en esta memoria la frase “secuencia de polinucleótido genómica” se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y por lo tanto representa una porción contigua de un cromosoma.

20 Como se usa en esta memoria la frase “secuencia de polinucleótido compuesta” se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas requeridas para codificar el polipéptido de la presente descripción, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre las mismas. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de empalme conservadas. Tales secuencias intrónicas pueden incluir además elementos reguladores de expresión que actúan en *cis*.

Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, la secuencia de ácido nucleico es tal como se expone en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25 o 26.

25 Según otro aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, la secuencia del polinucleótido aislado es tal como se expone en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27.

Según aún otro aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, el polipéptido es tal como se expone en la SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 95 o 96.

30 Según todavía otro aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, la secuencia de aminoácidos es tal como se expone en la SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 95 o 96.

35 Los polinucleótidos aislados de este aspecto de la presente descripción también se pueden calificar usando un ensayo de hibridación incubando los polinucleótidos aislados descritos anteriormente en presencia de sonda o cebador de oligonucleótido en condiciones de hibridación de moderadas a astringentes.

40 Las condiciones de hibridación de moderadas a astringentes se caracterizan por una solución de hibridación como que contiene dextran sulfato al 10%, NaCl 1M, SDS al 1% y sonda marcada con ³²P a 5x10⁶ cpm, a 65°C, con una solución de lavado final de SSC 0,2x y SDS al 0,1% y lavado final a 65°C y sin embargo la hibridación moderada se efectúa usando una solución de hibridación que contiene dextran sulfato al 10%, NaCl 1M, SDS al 1% y sonda marcada con ³²P a 5x10⁶ cpm, a 65°C, con una solución de lavado final de SSC 1x y SDS al 0,1% y lavado final a 50°C.

45 Por lo tanto, la presente descripción incluye secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente en esta memoria; fragmentos de las mismas, secuencias hibridables con las mismas, secuencias homólogas a las mismas, secuencias que codifican polipéptidos similares con diferente uso de codones, secuencias alteradas caracterizadas por mutaciones, como supresión, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, ya sean de origen natural o inducidos por el hombre, ya sea aleatoriamente o de un modo dirigido.

50 Dado que las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción codifican péptidos no identificados previamente, la presente descripción también incluye nuevos polipéptidos o porciones de los mismos, que están codificados por los polinucleótidos aislados y los fragmentos de ácido nucleico respectivos de los mismos descritos anteriormente en esta memoria.

Por lo tanto, la presente descripción también incluye polipéptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción. Las secuencias de aminoácidos de estos nuevos polipéptidos están expuestas en SEQ ID NO: 26, 106, 107, 109, 110, 112, 114, 115, 118, 119, 122, 123, 124, 126, 95 o 96.

La presente descripción también incluye homólogos de estos polipéptidos, tales homólogos pueden ser al menos

- aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos
aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos
aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos
aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos
5 aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos
aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos
aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos
aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o mejor dicho 100% homólogos a la SEQ ID NO: 26, 106,
107, 109, 110, 112, 114, 115, 118, 119, 122, 123, 124, 126, 95 o 96.
- 10 La presente descripción también incluye fragmentos de los polipéptidos descritos anteriormente y polipéptidos que tienen mutaciones, como supresiones, inserciones o sustituciones de uno o más aminoácidos, ya sean de origen natural o inducidos por el hombre, ya sea aleatoriamente o de un modo dirigido.
- La capacidad de los polinucleótidos de la presente descripción y sus productos para regular el desarrollo de la fibra de algodón se puede determinar directamente o al menos un parámetro estructural de una fibra de algodón como
15 longitud de la fibra o finura de la fibra, o velocidad de crecimiento de la fibra (descrito más adelante en esta memoria). Sin embargo, el desarrollo de la fibra de algodón se puede también determinar indirectamente como mediante sistemas modelo de plantas para el desarrollo de la fibra de algodón. Por ejemplo, está bien establecido que las células de tricoma y pelos radiculares comparten características comunes con las células de fibra de algodón, y como tales se pueden usar como modelo para el desarrollo de la fibra de algodón [Revisado en Wagner
20 G.J. et al. (2004)], como se demuestra en los detalles en el Ejemplo 12 de la sección de Ejemplos que sigue.
- Analizando los perfiles de expresión, los presentes inventores fueron capaces de determinar la implicación de las secuencias biomoleculares (es decir, polinucleótidos y polipéptidos) de la presente descripción en la iniciación y/o
alargamiento de la fibra. Estos resultados se fundamentaron además estableciendo una correlación entre la expresión génica y la longitud de fibra (véase Ejemplo 7).
- 25 Estos resultados sugieren que las secuencias biomoleculares de la presente descripción (p. ej., polinucleótidos, polipéptidos, promotores, oligonucleótidos, anticuerpos, referidos también en esta memoria como agentes) se pueden usar para mejorar la calidad y/o el rendimiento de fibra de una planta productora de fibra.
- Por lo tanto, según aún otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para mejorar la calidad y/o
rendimiento de fibra de una planta productora de fibra.
- 30 El método de este aspecto de la presente descripción se efectúa regulando un nivel de expresión o actividad de al menos un polinucleótido o polipéptido de la presente descripción (descrito anteriormente en esta memoria) en la planta productora de fibra, mejorando así la calidad y/o rendimiento de la planta productora de fibra.
- Como se usa aquí la frase “planta productora de fibra” se refiere a plantas que comparten la característica común de
35 tener una forma alargada y abundante celulosa en paredes celulares gruesas, típicamente denominadas como paredes secundarias. Tales paredes pueden o no estar lignificadas, y el protoplasto de tales células puede o no ser viable en madurez. Tales fibras tienen muchos usos industriales, por ejemplo, en madera y productos fabricados de madera, papel, textiles, material de embalaje y de empaquetado, cordelería, cepillos y escobas, llenado y relleno, sellado, refuerzo de otros materiales, y fabricación de derivados de celulosa.
- Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, la planta productora de fibra es algodón.
- 40 El término “fibra” es que incluye normalmente desde células conductoras de pared gruesa como vasos y traqueidas a agregados fibrilares de muchas células de fibra individuales. Por lo tanto, el término “fibra” se refiere a (a) células conductoras y no conductoras de pared gruesa del xilema; (b) fibras de origen extraxilar, que incluyen las del floema, corteza, tejido de tierra, y epidermis; y (c) fibras de tallos, hojas, raíces, semillas, y flores o inflorescencias (como las de *Sorghum vulgare* usadas en la fabricación de cepillos y escobas).
- 45 Ejemplos de plantas productoras de fibra incluyen, pero no se limitan a, cultivos agrícolas como algodón, árbol de algodón de seda (Kapok, Ceiba petandra), sauce del desierto, arbusto de creosota, grasa de invierno, árbol de balsa, kenaf, roselle, yute, sisal de abaca, lino, maíz, caña de azúcar, cáñamo, ramio, kapok, fibra de coco, bambú, musgo español y *Agave spp.* (p. ej. sisal).
- Como se usa en esta memoria la frase “calidad de la fibra” se refiere a al menos un parámetro de fibra que
50 agrícolasmente se desea, o se requiere en la industria de la fibra (descrito más adelante en esta memoria). Ejemplos de tales parámetros, incluyen pero no se limitan a, longitud de fibra, resistencia de fibra, adecuación de la fibra, peso de la fibra por unidad de longitud, relación de madurez y uniformidad (descrito además más adelante en esta memoria).
- La calidad de la fibra (hebra) de algodón se mide típicamente de acuerdo con la longitud de la fibra, resistencia y
55 finura. Por consiguiente, la calidad de hebra se considera mayor cuando la fibra es más larga, más fuerte y más fina.

Como se usa en esta memoria la frase “rendimiento de fibra” se refiere a la cantidad y cantidad de fibras producidas a partir de la planta productora de fibra.

5 Como se usa en esta memoria el término “mejora” se refiere a al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, de cambio en la calidad/rendimiento de fibra en comparación con la planta nativa (es decir, no modificada con las secuencias biomoleculares de la presente descripción).

10 Como se usa en esta memoria el término “regulación” se refiere a regular a la alza, regular a la baja o una combinación de los mismos. Por ejemplo, cuando se desea un aumento en número de fibra, se puede efectuar la presente descripción sobre-regulando al menos un polinucleótido de la presente descripción, que está implicado en la iniciación de la fibra (p. ej., SEQ ID NOs: 4, 10, 9, 12, 16 y 25). Alternativamente, cuando se desean fibras cortas como por ejemplo, en el maíz, entonces se efectúa la presente descripción regulando a la baja al menos un polinucleótido de la presente descripción que está implicado en el alargamiento de fibra (p. ej., SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 27). Alternativamente, se puede efectuar la presente descripción sobre-regulando la expresión de al menos un polinucleótido (como uno implicado en el alargamiento de fibra) y regulando a la baja al menos un polinucleótido (como uno implicado en la iniciación de fibra) de los polinucleótidos de la presente descripción. De esta forma es factible obtener una planta productora de fibra con rendimiento de fibra mejorado de cada una de longitud corta.

20 Sobre-regular un nivel de expresión de al menos uno de los polinucleótidos de la presente descripción se puede efectuar a nivel genómico (p. ej., activación de la transcripción por medio de promotores, potenciadores, y otros elementos reguladores), a nivel de la transcripción, o a nivel de la proteína.

A continuación se presenta una lista no exhaustiva de agentes capaces de sobre-regular el nivel de expresión y/o actividad de las secuencias biomoleculares (es decir, secuencias de ácido nucleico o de proteína) de la presente descripción.

25 Un agente capaz de sobre-regular la expresión de un polinucleótido de interés puede ser una secuencia de polinucleótido exógena diseñada y construida para expresar al menos una porción funcional del mismo (p. ej., mejora de la calidad/rendimiento de fibra, aumento de la biomasa, etc.). Por consiguiente, la secuencia de polinucleótido exógena puede ser una secuencia de ADN o ARN que codifica una molécula de polipéptido, capaz de mejorar el rendimiento o cantidad de fibra. Alternativamente, el polinucleótido exógeno puede ser una región reguladora que actúa en cis (p. ej., SEQ ID NO: 74, 75, 85, 88 o 91) que se puede introducir dentro de la planta para aumentar la expresión de cualquier polinucleótido que está implicado en el desarrollo de la fibra (p. ej., sacarosa fosfato sintasa, como se describe en la Pat. de EE.UU. N° 6.472.588).

35 Para expresar polinucleótidos exógenos en células vegetales, se liga preferiblemente una secuencia de polinucleótido de la presente descripción en un constructo de ácido nucleico adecuado para expresión en célula vegetal. Tal constructo de ácido nucleico incluye una región reguladora que actúa en cis como una secuencia promotora para dirigir la transcripción de la secuencia de polinucleótido en la célula de una manera constitutiva o inducible. El promotor puede ser homólogo o heterólogo a la planta/célula transformada.

Secuencias promotoras preferidas que se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la presente descripción son promotores de célula endotelial.

40 Por ejemplo, se pueden usar preferiblemente secuencias promotoras de cada una de las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción en los constructos de ácido nucleico de la presente descripción.

45 Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, el promotor es al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a la SEQ ID NO. 85 o 91, que es capaz de regular la expresión de al menos una secuencia de polinucleótido ligada operativamente a la misma en una célula endotelial óvulo (es decir, capaz de ejercer un efecto regulador sobre la secuencia codificadora ligada a la misma).

Como se ilustra claramente en la sección de Ejemplos que sigue, tales secuencias promotoras son capaces de regular la expresión de una secuencia de ácido nucleico codificadora (p. ej., GUS) ligada operativamente a la misma.

55 Otros ejemplos de promotores de aumento de fibra de algodón incluyen los genes expresados E6 de fibra de algodón (John et al., Plant Mol. Biol., 30: 297-306 (1996) y John et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 12768-12773 (1996) e), H6 (John et al., Plant Physiol., 108: 669-676, (1995)), FbL2A (Rinehart et al., Plant Physiol., 112: 1331-1341 (1996) y John et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12768-12773 (1996)), rac (Delmer et al., Mol. Gen. Genet.,

248: 43-51 (1995)); *CelA* (Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12637-12642 (1996)); CAP (Kawai et al., Plant Cell Physiol. 39: 1380-1383 (1998)); ACP (Song et al., Biochim. Biophys. Acta 1351: 305-312 (1997)); y LTP (Ma et al., Biochim. Biophys. Acta 1344: 111-114 (1997)). Se describen otros promotores específicos de fibra de algodón en la Pat. de EE.UU. N° 5.495.070.

- 5 Otros promotores que se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la presente descripción son aquellos que aseguran la expresión sólo en órganos específicos, como la hoja, raíz, tubérculo, semilla, tallo, flor o tipos de células específicas como células de parénquima, epidérmicas, de tricoma o vasculares.

Promotores preferidos para potenciar la expresión en células de tricoma se describen en WO 2004/111183, a Evogene Ltd.

- 10 Los promotores preferidos que potencian la expresión en tejido vascular incluyen el promotor CAD 2 (Samaj et al., Planta, 204: 437-443 (1998)), el promotor Pt4C11 (Hu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 5407-5412 (1998)), el promotor C4H (Meyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6619-6623 (1998)), los promotores PtX3H6 y PtX14A9 (Loopstra et al., Plant Mol. Biol., 27: 277-291 (1995)), el promotor RolC (Graham, Plant Mol. Biol., 33: 729-735 (1997)), el promotor Hvhspl7 (Raho et al., J. Expt. Bot., 47: 1587-1594 (1996)), y el promotor COMT (Capellades et al., Plant Mol. Biol., 31: 307-322 (1996)).

- 15 Los promotores preferidos que mejoran la expresión en tejido del tallo incluyen los promotores de médula (Datta, Theor. Appl. Genet., 97: 20-30 (1998) y Ohta et al., Mol. Gen. Genet., 225: 369-378 (1991)), y el promotor de la peroxidasa aniónica (Klotz et al., Plant Mol. Biol., 36: 509-520 (1998)). Los promotores preferidos que mejoran la expresión en el floema, corteza y corcho, pero no en el xilema o la médula, incluyen el promotor Psam-1 (Mijnsbrugge et al., Plant and Cell Physiol., 37: 1108-1115 (1996)).

- 20 Los promotores preferidos que mejoran la expresión en semillas incluyen el promotor phas (Geest et al., Plant Mol. Biol. 32: 579-588 (1996)); el promotor GluB-1 (Takaiwa et al., Plant Mol. Biol. 30: 1207-1221 (1996)); el promotor gamma-zeína (Torrent et al., Plant Mol. Biol. 34: 139-149 (1997)), y el promotor oleosina (Sarmiento et al., The Plant Journal 11: 783-796 (1997)).

- 25 Se describen otras secuencias promotoras que median la expresión constitutiva, inducible, específica de tejido o específica de etapa de desarrollo en WO 2004/081173 a Evogene Ltd.

- Se pueden usar promotores truncados o sintéticos incluyendo regiones de nucleótidos específicas que confieren una expresión mejorada en tejido, como se ejemplifica por la identificación de elementos reguladores dentro de los promotores más grandes que confieren una expresión aumentada en el xilema (Seguin et al., Plant Mol. Biol., 35: 281-291 (1997); Torres-Schumann et al., The Plant Journal, 9: 283-296 (1996); y Leyva et al., The Plant Cell, 4: 263-271 (1992)).

- 30 El constructo de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial. Preferiblemente, el constructo de ácido nucleico de la presente descripción es un vector de plásmido, más preferiblemente un vector binario.

- 35 La frase "vector binario" se refiere a un vector de expresión que lleva una región T modificada de un plásmido Ti, capaz de multiplicarse tanto en células *E. Coli* como en *Agrobacterium*, y que normalmente comprende el(los) gen(es) marcador(es) para la transformación en planta entre las dos regiones huésped. Un vector binario adecuado para la presente descripción incluye pBI2113, pBI121, pGA482, pGAH, pBIG, pBI101 (Clonetech), pPI (véase Ejemplo 5 de la sección de Ejemplos que sigue) o modificaciones de los mismos.

- 40 El constructo de ácido nucleico de la presente descripción se puede utilizar para transformar una célula huésped (p. ej., bacteria, vegetal) o planta.

Como se usa en esta memoria, los términos "transgénico" o "transformado" se usan indistintamente en referencia a una célula o una planta en la que se ha transferido material genético clonado.

- 45 En la transformación estable, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción se integra dentro del genoma de la planta, y como tal representa una característica estable y heredado. En la transformación transitoria, la molécula de ácido nucleico es expresada por la célula transformada pero no se integra dentro del genoma, y como tal representa una característica transitoria.

- 50 Existen varios métodos de introducción de genes extraños dentro de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Potrykus, I. (1991). Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42, 205-225; Shimamoto, K. et al. (1989). Plantas fértiles de arroz transgénico regeneradas de protoplastos transformados. Nature (1989) 338, 274-276).

Los principales métodos de integración estable de ADN exógeno dentro del ADN genómico vegetal incluyen dos abordajes principales:

- (i) Transferencia génica mediada por *Agrobacterium*. Véase: Klee, H. J. et al. (1987). Annu Rev Plant Physiol 38, 467-486; Klee, H. J. y Rogers, S. G. (1989). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of

Plant Nuclear Genes, pg. 2-25, J. Schell y L. K. Vasil, eds., Academic Publishers, San Diego, Cal.; y Gatenby, A. A. (1989). Regulation and Expression of Plant Genes in Microorganisms, pg. 93-112, Plant Biotechnology, S. Kung y C. J. Arntzen, eds., Butterworth Publishers, Boston, Mass.

(ii) Captación directa de ADN. Véase, p. ej.: Paszkowski, J. et al. (1989). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, pg. 52-68, J. Schell y L. K. Vasil, eds., Academic Publishers, San Diego, Cal.; y Toriyama, K. et al. (1988). Bio/Technol 6, 1072-1074 (métodos de captación directa de ADN dentro de protoplastos). Véase también: Zhang et al. (1988). Plant Cell Rep 7, 379-384; y Fromm, M. E. et al. (1986). Transformación estable de maíz después de transferencia génica por electroporación. Nature 319, 791-793 (captación de ADN inducida por choque eléctrico de células vegetales). Véase también: Klein et al. (1988). Bio/Technol 6, 559-563; McCabe, D. E. et al. (1988). Transformación estable de soja (*Glycine max*) por aceleración de partícula. Bio/Technology 6, 923-926; y Sandford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. Physiol Plant 79, 206-209 (Inyección de ADN dentro de células o tejidos vegetales por bombardeo de partícula). Véase también: Neuhaus, J. M. et al. (1987). Theor Appl Genet 75, 30-36; y Neuhaus, J. M. y Spangenberg, G. C. (1990). Physiol Plant 79, 213-217 (uso de sistemas de micropipetas). Véase Pat. de EE.UU. N° 5.464.765 (transformación en bigotes de fibras de vidrio o de carburo de silicio de cultivos celulares, embriones o tejido calloso). Véase también: DeWet, J. M. J. et al. (1985). "Transferencia génica exógena en maíz (*Zea mays*) usando polen tratado con ADN", Experimental Manipulation of Ovule Tissue, G. P. Chapman et al., eds., Longman, New York-London, pg. 197-209; y Otha, Y. (1986). Transformación Genética de Alto Rendimiento de Maíz por una Mezcla de Polen y ADN Exógeno. Proc Natl Acad Sci USA 83, 715-719 (incubación directa de ADN con polen en germinación).

El sistema mediado por *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran dentro del ADN genómico vegetal. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de la especie vegetal y del sistema de suministro del *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente usado es el procedimiento de hoja-disco, que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para la iniciación de la diferenciación de la planta completa (Horsch, R. B. et al. (1988). "Transformación hoja disco." Plant Molecular Biology Manual A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). Un abordaje complementario emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* en combinación con infiltración a vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente útil en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

Existen varios métodos de transferencia directa de ADN dentro de células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un fuerte campo magnético, abriéndose mini-poros para permitir que entre el ADN. En la microinyección, se inyecta mecánicamente el ADN directamente dentro de las células usando micropipetas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe sobre microproyectiles como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y se aceleran físicamente los microproyectiles dentro de las células o tejidos vegetales.

Después de la transformación estable, se produce la propagación de la planta. El método más común de propagación es por semilla. Sin embargo, la desventaja de la regeneración por propagación de semilla es la falta de uniformidad en el cultivo debido a la heterocigosidad, ya que las semillas son producidas por plantas según las varianzas genéticas regidas por las reglas de Mendel. En otras palabras, cada semilla es genéticamente diferente y cada una crecerá con sus propias características específicas. Por lo tanto, se prefiere que la regeneración se efectúe de tal manera que la planta regenerada tiene rasgos y características idénticos a las de la planta transgénica parental. El método preferido de regeneración de una planta transformada es por micropropagación, que proporciona una reproducción rápida, consistente de las plantas transformadas.

La micropropagación es un proceso de cultivo de plantas de segunda generación a partir de una única muestra de tejido extirpada de una planta parental o cultivar seleccionado. Este proceso permite la reproducción en masa de plantas que tienen el tejido preferido y que expresan una proteína de fusión. Las plantas recién generadas son genéticamente idénticas a, y tienen todas las características de la planta original. La micropropagación permite la producción en masa del material vegetal de calidad en un corto periodo de tiempo y ofrece una rápida multiplicación de cultivares seleccionados con la conservación de las características de la planta transformada transgénica o transformada original. Las ventajas de este método de clonación de plantas incluyen la velocidad de multiplicación vegetal y la calidad y uniformidad de las plantas producidas.

La micropropagación es un proceso de múltiples etapas que requiere la alteración de las condiciones del medio de cultivo o de crecimiento entre las etapas. El proceso de micropropagación implica cuatro etapas básicas: etapa uno, cultivo inicial del tejido; etapa dos, multiplicación del cultivo de tejido; etapa tres, diferenciación y formación de la planta; y etapa cuatro, cultivo en invernadero y consolidación. Durante la etapa uno, se establece el cultivo de tejido y se certifica que está libre de contaminantes. Durante la etapa dos, el cultivo de tejido inicial se multiplica hasta que se produce un número suficiente de muestras de tejido para alcanzar los objetivos de producción. Durante la etapa tres, las muestras de tejido recién crecidas se dividen y se crecen en plántulas individuales. En la etapa cuatro, las plántulas transformadas se transfieren a un invernadero para la consolidación en donde la tolerancia de las plantas a la luz se aumenta gradualmente de manera que puedan seguir creciendo en el entorno natural.

Aunque actualmente se prefiere la transformación estable, también se prevé por la presente descripción la transformación transitoria de, por ejemplo, células de hojas, células meristemáticas, o la planta completa.

Se puede efectuar la transformación transitoria por cualquiera de los métodos de transferencia directa de ADN descritos anteriormente o por infección viral usando virus de plantas modificados.

Los virus que se han demostrado útiles para la transformación de plantas huésped incluyen virus mosaico de la coliflor (CaMV), virus mosaico del tabaco (TMV), y baculovirus (BV). La transformación de plantas usando virus de plantas se describe en, por ejemplo: Pat. de EE.UU. N° 4.855.237 (virus mosaico dorado de judía, BGMV); EPA 67.553 (TMV); Solicitud Publicada Japonesa N° 63-14693 (TMV); EPA 194.809 (BV); EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. et al. (1988). Comunicaciones en Biología Molecular: Vectores Virales, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pg. 172-189. El uso de partículas de pseudovirus en la expresión de ADN extraño en muchos huéspedes, que incluyen plantas, se describe en WO 87/06261.

10 La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión de secuencias de ácido nucleico exógenas no virales en plantas se demuestra en las referencias anteriores así como en: Dawson, W. O. et al. (1989). Un virus híbrido mosaico del tabaco expresa y pierde un gen añadido. *Virology* 172, 285-292; French, R. et al. (1986) *Science* 231, 1294-1297; y Takamatsu, N. et al. (1990). Producción de encefalina en protoplastos de tabaco usando un vector ARN de virus mosaico del tabaco. *FEBS Lett* 269, 73-76.

15 Si el virus transformante es un virus de ADN, un experto en la técnica puede hacer modificaciones adecuadas al propio virus. Alternativamente, el virus se puede clonar primero dentro de un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector viral deseado con el ADN extraño. El virus puede ser escindido entonces del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, se puede anclar al ADN viral un origen de replicación bacteriano, que a continuación se replica por la bacteria. La transcripción y la traducción del ADN producirá la proteína de cubierta, que encapsulará el ADN viral. Si el virus es un virus de ARN, normalmente el virus se clona como un cDNA y se inserta dentro de un plásmido. El plásmido se usa entonces para hacer todos los constructos genéticos de plantas. El virus de ARN se transcribe a continuación a partir de la secuencia viral del plásmido, seguido de traducción de los genes virales para producir las proteínas de cubierta que encapsulan el ARN viral.

25 La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión en plantas de secuencias de ácido nucleico exógenas no virales, como los incluidos en el constructo de la presente descripción, se demuestra también en las referencias anteriores así como en la Pat. de EE.UU. N° 5.316.931.

En un aspecto se proporciona para la inserción un ácido nucleico viral vegetal, que comprende una supresión de la secuencia codificadora de la proteína de cubierta nativa del ácido nucleico viral, una secuencia codificadora de la proteína de cubierta viral vegetal no nativa (extraña), y un promotor no nativo, preferiblemente el promotor subgenómico de la secuencia codificadora de la proteína de cubierta no nativa, y capaz de la expresión en la planta huésped, empaquetamiento del ácido nucleico viral vegetal recombinante, y que asegura una infección sistémica del huésped por el ácido nucleico viral vegetal recombinante. Alternativamente, la secuencia codificadora de la proteína de cubierta nativa se puede hacer no transcribible por inserción de la secuencia de ácido nucleico no nativa dentro de ella, de tal manera que se produce una proteína no nativa. El constructo de ácido nucleico viral de la planta recombinante puede contener uno o más promotores subgenómicos no nativos adicionales. Cada promotor subgenómico no nativo es capaz de transcribir o expresar genes o secuencias de ácido nucleico adyacentes en la planta huésped e incapaz de recombinación entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Además, el constructo de ácido nucleico viral de la planta recombinante puede contener uno o más elementos reguladores que actúan en *cis*, como potenciadores, que se unen a un regulador que actúa en *trans* y que regula la transcripción de una secuencia codificadora situada corriente debajo de la misma. Las secuencias de ácido nucleico no nativas se pueden insertar adyacentes al promotor subgenómico viral de la planta nativo o a los promotores subgenómicos virales de la planta no nativos si se incluye más de una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico no nativas se transcriben o expresan en la planta huésped bajo el control de el(los) promotor(es) subgenómico(s) para producir los productos deseados.

45 En un segundo aspecto, se proporciona un constructo de ácido nucleico viral de planta recombinante como en el primer aspecto excepto que la secuencia codificadora de la proteína de cubierta nativa se localiza adyacente a uno de los promotores subgenómicos de la proteína de cubierta no nativa en lugar de a la secuencia codificadora de la proteína de cubierta no nativa.

50 En un tercer aspecto, se proporciona un constructo de ácido nucleico viral de planta recombinante que comprende un gen de proteína de cubierta nativa situado adyacente a su promotor subgenómico y a uno o más promotores subgenómicos no nativos insertados dentro del constructo de ácido nucleico viral. Los promotores subgenómicos no nativos insertados son capaces de transcribir o expresar genes adyacentes en una planta huésped y son incapaces de recombinación entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Se pueden insertar secuencias de ácido nucleico no nativas adyacentes a promotores virales vegetales subgenómicos no nativos de tal forma que dichas secuencias se transcriben o expresan en la planta huésped bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

55 En un cuarto aspecto, se proporciona un constructo de ácido nucleico viral de planta recombinante como en el tercer aspecto excepto que la secuencia que codifica la proteína de cubierta nativa se reemplaza por una secuencia codificadora de la proteína de cubierta no nativa.

Los vectores virales se encapsulan por proteínas de cubierta expresadas codificadas por constructos de ácido nucleico viral de planta recombinante como se describe anteriormente en esta memoria, para producir un virus de planta recombinante. El constructo de ácido nucleico viral de planta recombinante o el virus de planta recombinante se usa para infectar plantas huésped apropiadas. El constructo de ácido nucleico viral de planta recombinante es capaz de replicarse en un huésped, propagación sistémica dentro del huésped, y transcribir o expresar uno o más genes extraños (ácido nucleico aislado) en el huésped para producir la proteína deseada.

Además de lo anterior, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción se puede también introducir dentro del genoma del cloroplasto permitiendo de este modo la expresión en cloroplasto.

Se conoce una técnica para introducir secuencias de ácido nucleico exógeno en el genoma de los cloroplastos. Esta técnica implica los siguientes procedimientos. Primero, las células vegetales se tratan químicamente con el fin de reducir el número de cloroplastos por célula a aproximadamente una. A continuación, se introduce el ácido nucleico exógeno dentro de las células preferiblemente a través del bombardeo de partículas, con el objetivo de introducir al menos una molécula de ácido nucleico exógeno dentro de los cloroplastos. El ácido nucleico exógeno se selecciona por alguien experto en la técnica para que sea capaz de integrarse dentro del genoma del cloroplasto a través de recombinación homóloga, que se efectúa fácilmente por enzimas inherentes al cloroplasto. Con este fin, el ácido nucleico comprende, además del gen de interés, al menos una secuencia de ácido nucleico derivada del genoma del cloroplasto. Además, el ácido nucleico exógeno comprende un marcador seleccionable, que por los procedimientos de selección secuencial sirve para permitir a un artesano comprobar que todas o substancialmente todas las copias del genoma del cloroplasto que siguen tal selección incluyen el ácido nucleico exógeno. Más detalles relativos a esta técnica se encuentran en la Pat. de EE.UU. N°s 4.945.050 y 5.693.507. De este modo se puede producir un polipéptido mediante el sistema de expresión de proteína del cloroplasto y ser integrado dentro de la membrana interna del cloroplasto.

La regulación a la baja de un gen de interés se puede efectuar a nivel genómico y/o de transcripción usando una variedad de moléculas que interfieren con la transcripción y/o la traducción (p. ej., antisentido, siRNA), o a nivel de proteína usando p. ej., anticuerpos, técnicas de inmunización y similares.

Por ejemplo, un agente capaz de regular a la baja una actividad de un polipéptido de interés es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un polipéptido de la presente descripción. Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente al menos a un epítipo del polipéptido de interés. Como se usa en esta memoria, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo.

La regulación a la baja a nivel del ARN se puede efectuar mediante estrategias de silenciamiento basadas en ARN que son eficaces en plantas. Véase por ejemplo, Kusaba (2004) RNA interference in crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(2): 139-43; Matzke (2001) RNA based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet.* 11: 221-7.

Por ejemplo, un agente capaz de regular a la baja un polinucleótido de interés es una molécula de ARN pequeño de interferencia (siRNA) en el proceso de interferencia por ARN (RNAi).

Se pueden suministrar dsRNAs en plantas de varias maneras (revisado en Waterhouse P, Helliwell C. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Genet* 4: 29-38): bombardeo por microproyectiles con vectores que expresan dsRNA o ARN en horquilla que contiene intrones (ihpRNA); infiltración de tejido vegetal con una cepa de *Agrobacterium* que lleva un T-DNA que expresa un transgen ihpRNA; silenciamiento génico inducido por virus (VIGS); en el que la secuencia diana se integra dentro de secuencias virales que se usan para infectar la planta, o se expresan a partir de transgenes introducidos en *Agrobacterium*, y mediante transformación estable con transgenes que expresan ihpRNA. Las diversas técnicas de iRNA tienen cada una ventajas y desventajas con respecto a cómo es de persistente su efecto y la gama de plantas a las que se puede aplicar, p. ej. se puede aplicar el bombardeo a cualquier planta, pero solamente produce efectos transitorios. Alternativamente, la transformación con transgenes que expresan ihpRNA proporciona silenciamiento génico estable y heredable, pero requiere de técnicas de transformación de plantas eficientes. Se ha demostrado que los transgenes ihpRNA son muy eficaces para una amplia gama de genes diana en varias especies de plantas (revisado en Waterhouse P, Helliwell C. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Genet* 4: 29-38; Wesley S, Helliwell C, Smith N, et al. 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-590), indicando que el mecanismo de RNAi está probablemente conservado en todas las especies de plantas. Esto es apoyado por un informe reciente de RNAi en el musgo no vascular *Physcomitrella patens* (Bezanilla M, Pan A, Quatrano R. 2003. RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* 133: 470-474).

Se pueden usar construcciones genéticas antisentido para promotores específicos de fibra (p. ej., para SEQ ID NO: 85, 91) para inhibir o disminuir la expresión de uno o más genes de fibra en células de fibra. El uso de constructos antisentido se describe en la Pat. de EE.UU. N° 5.495.070 y en Smith, et al. *Nature* 334: 724-726, 1988; Bird, et al. *Bio/Technology* 9: 635-639, 1991; Van der Krol, et al. *Gene* 72: 45-50, 1988.

Se apreciará que la generación de la planta productora de fibra de características deseadas según la presente descripción se pueda efectuar también mediante el cruce de cada una de las plantas genéticamente modificadas

anteriores con las plantas de tipo salvaje, híbridas o transgénicas, usando métodos que son bien conocidos en la técnica.

Una vez que se generan las plantas transgénicas de la presente descripción, se recogen las fibras (por ejemplo por recolección mecánica y/o arrancado a mano) y se determina el rendimiento y calidad de fibra.

5 A continuación se describen métodos de calificación de fibras de algodón.

Longitud de fibra- Se usan instrumentos como un fibrógrafo y sistemas HVI (instrumentación de de alto volumen) para medir la longitud de la fibra. Los instrumentos HVI calculan la longitud en términos de longitud "media" y "media de la mitad superior" (UHM). La media es la longitud media de todas las fibras mientras que UHM es la longitud media de la mitad más larga de la distribución de fibra.

10 Resistencia de fibra- Como se ha mencionado, la resistencia de fibra se define generalmente como la fuerza requerida para romper un haz de fibras o una única fibra. En la prueba HVI la fuerza de ruptura se convierte a "gramos de fuerza por unidad tex". Esta es la fuerza requerida para romper un haz de fibras que es una unidad tex en tamaño. En la prueba HVI la resistencia se da en gramos por unidades tex (gramos/tex). Las fibras se pueden clasificar como resistencia baja (p. ej., 19-22 grs/tex), resistencia media (p. ej., 23-25 grs/tex), resistencia alta (p. ej., 26-28 grs/tex), y resistencia muy alta (p. ej., 29-36 grs/tex).

15 Micronaire- La lectura micronaire de una fibra se obtiene a partir de un ensayo de porosidad de flujo de aire. La prueba se llevó a cabo como sigue. Una muestra pesada de algodón se comprime hasta un volumen dado y se pasa un flujo de aire controlado a través de la muestra. Se hace la lectura de la resistencia al flujo de aire como unidades micronaire. Las lecturas micronaire reflejan una combinación de madurez y finura. Dado que el diámetro de fibras dentro de una variedad de algodón es bastante consistente, el índice micronaire indicará muy probablemente variación de madurez más que variaciones en finura. Una lectura micronaire de 2,6-2,9 es baja mientras que 3,0-3,4 es inferior a la media, 3,5-4,9 es normal y 5,0 y más son altas. Para la mayoría de las aplicaciones textiles se usa un micronaire de 3,5-4,9. Cualquiera más alto que esto normalmente no es deseable. Se apreciará sin embargo, que diferentes aplicaciones requieren diferentes propiedades de fibra. Por lo tanto, se entiende que una propiedad de fibra que es desventajosa en una aplicación podría ser ventajosa en otra.

20 Como se ilustra en la sección de Ejemplos, que sigue, las secuencias biomoleculares de la presente descripción son capaces de aumentar número y longitud de tricomas/pelo de hoja, así como el pelo de semilla. Como tales secuencias biomoleculares de la presente descripción se pueden usar para generar plantas transgénicas con número/longitud de tricomas aumentado que diasuaden mejor a herbívoros, guían la trayectoria de polinizadores, o afectan a la fotosíntesis, temperatura de la hoja, o pérdida de agua a través de una mayor reflexión de la luz. Además tales plantas transgénicas se pueden usar para la producción compartimentalizada de proteínas recombinantes y sustancias químicas en tricomas, como se describe en detalle en WO 2004/111183 a Evogene Ltd.

25 Interesante e inesperadamente, los presentes inventores encontraron que las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción son capaces de aumentar una biomasa de una planta. Se apreciará que la capacidad de los polipéptidos de la presente descripción de aumentar rendimiento/biomasa/vigor de la planta es inherente a su habilidad de promover el aumento en el tamaño o volumen de la célula vegetal (como se describe en esta memoria).

30 Por lo tanto, la presente descripción también prevé un método para aumentar una biomasa/vigor/rendimiento de una planta (plantas coníferas, musgo, algas, monocotiledónea o dicotiledónea, así como otras plantas que figuran en www.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae). Esto se efectúa regulando la expresión y/o actividad de al menos uno de los polinucleótidos de la presente descripción, como se describe anteriormente.

Como se usa en esta memoria la frase "biomasa de planta" se refiere al montante o cantidad de tejido producido a partir de la planta en una temporada de crecimiento, lo que también podría determinar o afectar al rendimiento de la planta o al rendimiento por área de cultivo.

35 Como se usa en esta memoria la frase "vigor de planta" se refiere al montante o cantidad de tejido producido a partir de la planta en un momento dado. Por lo tanto aumentar el vigor podría determinar o afectar al rendimiento de la planta o al rendimiento por tiempo de crecimiento o área de cultivo.

Como se usa en esta memoria la frase "rendimiento de planta" se refiere al montante o cantidad de tejido producido y recolectado como el producto vegetal producido. Por lo tanto aumentar el rendimiento podría afectar al beneficio económico que uno puede obtener de la planta en una cierta área de crecimiento y/o tiempo de crecimiento.

40 Por lo tanto, la presente descripción es de alto valor agrícola para promover el rendimiento de cultivos comercialmente deseados (p. ej., biomasa de órganos vegetativos como madera de álamo, u órgano reproductivo como número de semillas o biomasa de la semilla).

Como se usa en esta memoria el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Objetivos adicionales, ventajas, y características novedosas de la presente descripción se harán evidentes para un

experto en la materia después del análisis de los siguientes ejemplos. Adicionalmente, cada uno de los diversos aspectos de la presente descripción como se delinearón anteriormente en esta memoria y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 5 Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones ilustran la descripción. Generalmente, la nomenclatura usada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes de ADN. Tales técnicas se explican a fondo en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las Pat. de EE.UU. N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds) "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura de patentes y científica, véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N°s 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 20 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); 25 Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization –A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Los procedimientos en el mismo se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Identificación *in silico* de genes de algodón implicados en la formación de fibra

30 Procedimientos experimentales

Comparación entre especies de secuencias expresadas.- Se usaron dos herramientas principales durante la etapa de extracción de datos. Se consultaron un gran número de perfiles de genes a partir de una base de datos ORACLE que alberga la plataforma GeneCarta de Compugen (Compugen Ltd. Israel). Estos datos se cargaron en hojas de cálculo de MicroSoft Excel para su posterior refinamiento manual. Usando estos datos se llevó a cabo una 35 comparación genómica a través de especies, con el objetivo de definir órganos de otras especies de plantas para las que se pueden usar bibliotecas EST públicamente disponibles como modelos y como nuevas fuentes de información para definir nuevos genes con papel clave en la formación de fibra (Figura 1). Este análisis de comparación usó principalmente las bases de datos de algodón, arabidopsis y tomate.

40 Agrupamiento y agrupamiento entre especies de secuencias EST.- La base de datos genómica del algodón incluía menos de 50.000 ESTs (publicación de Genebank # 135) que se originan principalmente de dos especies *Gossypium arboreum* (~35.000 ESTs) y *Gossypium hirsutum* L. (~9.000 ESTs, Tabla 1, más abajo). Estas ESTs están agrupadas y ensambladas usando la plataforma de software LEADS™ (Compugen Ltd, Israel) en dos enfoques alternativos.

45 En el primer enfoque, las ESTs de dos especies se agruparon y ensamblaron juntas (imitando así el proceso evolutivo ya que *G. arboreum* es un ascendiente de *G. hirsutum*). Este proceso reveló 6.478 agrupamientos entre ellos 3.243 nuevos agrupamientos (sin mRNA en la base de datos pública) que se definieron como agrupamientos de alta calidad (Tabla 1, más abajo).

50 En el segundo enfoque, se agruparon y ensamblaron ESTs de cada especie por separado. La comparación entre los dos enfoques mostró que usar el primer enfoque añade información a los agrupamientos de algodón sin un sesgo significativo en el análisis. La base de datos del tomate contiene 126.156 ESTs que se originan de aproximadamente 30 bibliotecas bien definidas que a través del proceso de agrupamiento y ensamblaje revelaron 14.034 agrupamientos de los cuales un gran grupo de 12.787 agrupamientos eran agrupamientos de alta calidad (Tabla 1). La base de datos genómica de arabidopsis incluye 99.417 ESTs (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/>), 8.573 cDNA de longitud completa (Rikken y genbank mRNAs <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/>) y toda la secuencia de ADN. Usando el 55 software LEADS se revelaron 23.148 agrupamientos y 6.777 singletons (ESTs únicos que no tiene otro EST agrupado dentro del mismo), todos los cuales se apoyaron por secuencias ESTs, en contra del consorcio público (TAIR, www.arabidopsis.org).

Se buscaron bibliotecas EST de otras plantas y órganos que comparten procesos biológicos similares a los de la

fibra de algodón. Se espera que tales ESTs sirvan como modelos y como nuevas fuentes de información para la identificación de genes que están implicados en el desarrollo de la fibra. Con este fin, se generó una lista de genes conocidos que se sospecha que están implicados en el desarrollo de la fibra. Estos genes originados a partir de arábido y se muestran en varios estudios que tienen un papel clave en la formación de tricoma (es decir, GL2, CPC, bHLH, TTG1, GL1, revisado en Larkin J. C. et al. 2003, Schellmann S. et al. 2002). El amplio análisis genómico comparativo reveló que los genes de tomate, con alta homología con los genes de fibra de algodón y con los genes de tricoma de arábido tienen un contenido significativo de EST en cualquiera de las bibliotecas de hoja de tricoma y de desarrollo específico de la flor. Un análisis adicional comparó la base de datos genómica de estas tres especies – algodón, Arábido y tomate (centrándose en las bibliotecas del tomate mencionadas anteriormente) como parámetros clave en la presente búsqueda de base de datos (Figura 1).

Tabla 1

Bases de datos genómicas de Algodón, Tomate y Arábido				
Especie	Descripción Bibl de EST	Recuento de EST	mRNA	Después de LEADS (agrupamientos)
<i>G. arboreum</i>	Fibra 6DPA	37.276	12	16.294 agrupamientos en producción mixta*
<i>G. hirsutum</i>	Fibra 7-10 DPA	7.944	236	
<i>G. hirsutum</i>	Óvulo de flor 1 DPA	1.272	870	
<i>L. esculentum</i>	Todas las bibliotecas	115.859	7	25.678 agrupamientos en producción mixta
<i>L. hirsutum</i>	Bibliotecas de Tricoma	2.409	7	
<i>L. pennellii</i>	Bibliotecas de Tricoma	2.723	24.450	
<i>A. thaliana</i>	Todas las bibliotecas	160.698	mRNA	25.678 agrupamientos
*agrupamientos derivados de especies diferentes, algodón <i>G. arboreum</i> y <i>G. hirsutum</i> , tomate <i>L. esculentum</i> , <i>L. hirsutum</i> y <i>L. pennellii</i>				

Identificación *in silico* de genes de algodón con un papel en el desarrollo de la fibra.- Para buscar si los datos genómicos del tomate se pueden usar como una fuente relevante de datos genómicos para estudiar el desarrollo de la fibra de algodón se efectuó una comparación genómica extensiva para identificar tanto genes de tomate como de algodón que tienen alta homología con genes clave que determinan el desarrollo del tricoma en arábido (p. ej., GL2, CPC, bHLH, TTG1, GL1).

Se identificaron genes homólogos en algodón y tomate. Debido a que casi todas las ESTs de algodón se producen de fibras de algodón, fue imposible realizar la predicción *in-silico* del perfil de expresión de esos genes. Sin embargo, muchas fuentes de tejido usadas para la producción de la base de datos EST del tomate permitieron la identificación de tejidos en los que se expresaban genes específicos de tricoma.

En tomate se reveló que tanto las ESTs de tricoma como de óvulo están enriquecidas en agrupamientos que representan genes específicos de tricoma. De modo interesante, se encontró que las fibras de algodón se producen a partir de células de recubrimiento del óvulo. Como las semillas de tomate se cubren con tejido tipo veloso, de forma similar a las semillas de algodón, se postuló que esos pelos están ligados en términos de desarrollo a la formación del tricoma y de la fibra de algodón.

Se encontraron ~1.100 agrupamientos en tomate que incluyen al menos un EST de bibliotecas de tricoma. Entre ellas aproximadamente 1.000 secuencias incluían secuencias que también se originan de bibliotecas de la flor de tomate (en la que está presente el tejido de óvulo). La comparación de este grupo de genes con los datos de algodón reveló ~2.300 genes de algodón con alta homología con los genes de tricoma de tomate. La extracción de la base de datos usando estos dos grupos de genes junto con otra información bioinformática [homología a través especies, Ontología Génica (OG)] revelaron 80 agrupamientos de algodón que se predice que tienen un papel clave en la formación de fibra. Se seleccionaron esos genes en base a los siguientes criterios:

Agrupamientos de algodón con al menos 2 ESTs;

Homología con agrupamiento de tomate con e-puntuación mayor que $1e^{-5}$;

Homología con agrupamiento de tomate con al menos un EST que proviene de bibliotecas de tricoma o un EST que

proviene de tejidos que contiene el óvulo;

Se consideraron los siguientes criterios como ventajosos aunque no necesarios:

Gran número de ESTs en un agrupamiento;

Factor de transcripción/proteínas de transducción de señal;

- 5 Anotación de genes relacionados con la expansión celular, presión de turgencia, síntesis de pared celular.

Se analizaron adicionalmente los nuevos genes junto con los genes de control de algodón conocidos por estar implicados en la formación de fibra mediante su perfil de expresión de ARN en plantas de algodón.

Ejemplo 2

Análisis de expresión de mRNA de genes identificados según las enseñanzas de la presente invención

- 10 Para estudiar el perfil de expresión de ARN de genes candidatos identificados como se describe en el Ejemplo 1 anterior, se efectuó una transcripción inversa seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Procedimientos experimentales

- 15 Análisis cuantitativo por PCR en Tiempo Real (qRT PCR).- Para verificar los niveles de expresión específica y asociada a la característica se efectuó una Transcripción Inversa seguida de PCR cuantitativa (en Tiempo Real) (RTqPCR). Se extrajo el ARN total en diferentes etapas de desarrollo de la fibra (desde el día de antesis hasta el día 20 post-antesis). Para estudiar la especificidad de expresión, se recogió ARN de otros tejidos de plantas de algodón y se analizaron para expresión control (es decir, hojas jóvenes, tallos jóvenes, tallos maduros, raíces jóvenes, sépalos, pétalos, y estambre). Para este propósito, se extrajo ARN de tejido de algodón usando el protocolo de Extracción de Borato Caliente según www.eeob.iastate.edu/faculty/WendelJ/ultramicroRNA.html. Se efectuó la
- 20 transcripción inversa usando 1,5 µg de ARN total, usando 300 U de enzima Transcriptasa Reversa Super Script II (Invitrogen), 225 ng de hexámeros aleatorios de deoxinucleótidos (Invitrogen), mezcla de dNTPs (Takara, Japón) 500 µM, 0,2 volúmenes de tampón RT 5x (Invitrogen), DTT 0,01 M, 60 U de RNAsin (Promega), se añadió DEPC tratado con agua doblemente destilada hasta 37,5 µl. Las reacciones de RT se incubaron durante 50 min a 42°C, seguido de 70°C durante 15 min. Se diluyó el cDNA a 1:20 en Tris EDTA, pH=8. Se usaron 5 ml de cDNA diluido para la qRT-PCR.
- 25

- Se realizó la RT-PCR cuantitativa sobre el cDNA (5 µl), usando mezcla patrón SYBR GREEN PCR 1x (Applied Biosystems), cebadores directo e inverso 0,3 µM de cada uno. Se usó la máquina de PCR ABI7000real-time con las siguientes condiciones 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 veces de 95°C durante 15 seg y 1 min a 60°C, seguido de 95°C durante 15 seg, 60°C durante 60 seg, y 70 veces de 60°C durante 10 seg + 0,5°C de incremento en
- 30 cada ciclo. Para cada gen, se preparó una curva estándar a partir de un grupo de RTs de todas las muestras, en 5 diluciones (diluciones – 1:60, 1:200, 1:600, 1:2000, 1:10000). El gráfico de curva estándar [ct (ciclo umbral) vs. log (concentración)] debe tener $R \geq 0,98$ con una eficiencia en el intervalo de 100% +/- 5%. Se calcularon los niveles de expresión (Qty) medidos en la qPCR usando la eficiencia (E) de la reacción de amplificación y el correspondiente C.T. (el ciclo al que las muestras cruzan el umbral) $Qty = E^{-C.T.}$. Se examinaron las curvas de disociación obtenidas
- 35 para la ausencia de productos de PCR adicionales o dímeros de cebador no deseados. Las reacciones se repitieron al menos dos veces. El método se basa en el hecho de que las eficiencias de las reacciones del GOI (gen de interés) y de los genes constitutivos son similares.

- Para normalizar el nivel de expresión entre los diferentes tejidos, se diseñaron cebadores específicos para hibridar específicamente con los siguientes genes constitutivos: Actina (Nº Acceso GenBank D88414 SEQ ID NO: 28, cebadores directo e inverso se exponen en SEQ ID NO: 68 y 69, respectivamente), GAPDH (Nº Acceso GenBank COTCWPPR, secuencia parcial, SEQ ID NO: 29, cebadores directo e inverso se exponen en SEQ ID NO: 97 y 98, respectivamente), y RPL19 (Nº Acceso GenBank A1729179, SEQ ID NO: 30, cebadores directo e inverso se exponen en SEQ ID NO: 99 y 100, respectivamente).
- 40

- Usando esta metodología fue posible identificar genes que presentaban una expresión elevada durante el alargamiento de la fibra, así como genes que presentaban especificidad única de fibra de algodón. Los genes que presentaban expresión elevada durante la antesis que disminuían durante el alargamiento de la fibra se consideraron buenos candidatos de estar implicados en la diferenciación e iniciación de la fibra. La metodología de cuantificación descrita anteriormente no proporcionó de modo notable niveles de expresión absolutos, pero proporcionó buenos parámetros para evaluar la expresión génica relativa a lo largo del desarrollo de la fibra a pesar
- 45 de que se detectaron diferencias tan altas como más de 1000 veces en los máximos niveles de expresión alcanzados por diferentes genes (Tabla 2, a continuación).
- 50

Resultados

Se evaluaron 88 genes de algodón por perfil de expresión en diferentes tejidos de algodón (*Gossypium hirsutum*, var

Acala). Según los resultados de la expresión de genes, se predijeron 23 genes que mejoraban el rendimiento y calidad de fibra. Se presentan los perfiles de expresión de todos los genes candidatos en la Tabla 2.

Tabla 2

Gen ID/SEQ ID NO.	-DPA*	0-1 dpa	12-14 dpa	15-17 dpa	18-20 dpa	2-3 dpa	4-5 dpa	6-8 dpa	9-11 dpa	hojas maduras	tallos maduros	pétalos	sépalos	estambre	hojas jóvenes	raíces jóvenes	tallos jóvenes
CT1/1	0,053*	0,049	2,034	2,138	2,477	0,295	0,976	1,347	1,118	0,53	0,029	9,368	0,336	0,277	0,347	0,002	0,202
CT2/2	0,025	0,040	0,870	0,735	0,819	0,060	0,183	0,238	0,267	0,014	0,000	0,001	0,008	0,01	0,021	0,068	0,025
CT3/3	0,082	0,070	0,511	0,632	0,819	0,057	0,084	0,116	0,092	0,109	0,032	0,038	0,086	0,020	0,142	0,037	0,063
CT4/4	1,313	0,719	0,389	0,561	0,419	0,622	0,666	0,757	0,774	0,001	0,001	0,004	0,000	0,044	0,001	0,003	0,003
CT6/5	0,093	0,075	0,580	0,732	0,916	0,066	0,095	0,104	0,110	0,113	0,028	0,037	0,085	0,026	0,148	0,037	0,044
CT7/6	0,074	0,055	0,362	0,297	0,197	0,112	0,219	0,228	0,263	0,066	0,001	0,125	0,007	0,001	0,055	0,000	0,049
CT9/7	0,276	0,980	1,166	0,715	0,960	0,980	1,265	1,103	2,095	0,012	0,000	0,019	0,032	0,004	0,008	0,000	0,012
CT11/8	0,148	0,163	0,132	0,163	0,121	0,142	0,131	0,163	0,097	0,000	0,000	0,000	0,000	0,068	0,000	0,000	0,000
CT20/9	0,074	0,035	0,021	0,013	0,016	0,045	0,042	0,032	0,033	0,051	0,051	0,459	0,076	0,572	0,037	0,069	0,067
CT22/10	2,989	1,631	0,870	0,838	0,749	1,693	1,268	1,017	1,589	0,541	0,636	0,168	0,408	0,521	0,463	1,308	0,762
CT26/11	0,022	0,001	0,017	0,001	0,018	0,017	0,028	0,039	0,017	-	-	0,006	-	0,001	-	-	0,000
CT27/12	0,010	0,009	0,009	0,009	0,010	0,008	0,005	0,005	0,003	-	0,007	0,008	0,005	0,001	0,001	0,001	0,007
CT40/16	0,016	0,016	0,014	0,023	0,024	0,012	0,013	0,016	0,017	0,007	0,000	0,002	0,022	0,005	0,005	0,001	0,004
CT49/17	0,056	0,114	0,156	0,131	0,111	0,161	0,283	0,315	0,332	0,031	0,002	0,011	0,007	0,007	0,060	0,005	0,047
CT70/18	1,406	2,247	8,460	7,782	10,709	2,152	5,313	7,361	4,796	1,065	0,492	9,976	0,671	1,207	1,904	1,177	1,294
CT71/19	0,095	0,403	1,736	2,079	2,670	0,338	0,685	1,139	0,809	0,627	1,708	1,258	1,268	6,599	1,301	0,004	0,480
CT74/20	2,971	2,555	3,474	4,398	5,859	3,135	4,301	4,272	6,983	0,017	0,002	0,203	0,015	0,136	0,030	0,003	0,464
CT75/21	1,727	0,282	16,012	15,856	20,171	3,812	8,935	-	20,295	4,473	3,644	83,72	6,317	28,659	8,534	0,872	2,759
CT76/22	0,000	0,002	0,041	0,039	0,080	0,007	0,020	0,015	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000
CT77/23	0,005	0,011	0,555	0,892	1,434	0,057	0,161	0,166	0,123	0,016	0,026	0,020	0,009	-	0,023	0,001	0,003
CT81/24	0,161	0,196	3,455	4,880	14,028	0,210	0,354	0,515	1,153	9,477	26,444	1,165	0,913	0,021	6,614	0,004	1,089
CT82/25	0,024	0,022	0,005	0,004	0,006	0,018	0,016	0,014	0,011	0,053	0,034	0,017	0,045	0,036	0,004	-	0,000
CT84/27	0,007	0,005	0,136	0,167	0,371	0,004	0,014	0,027	0,031	0,036	0,346	0,034	0,196	0,101	0,061	0,071	0,035
CT88/13	0,002	0,371	0,841	2,978	3,045	4,947	14,725	17,514	28,290	0,001	0,034	0,005	0,000	-	0,005	0,004	0,007

Se realizó transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa usando PCR en tiempo real, en tejidos ya sea de plantas de algodón joven o de maduro (G. hirsutum var Acala). Se presentan las cantidades relativas de mRNA de cada gen en todos los tejidos examinados. dpa= días post antesis, de tejidos de óvulo y fibras (hasta 10 dpa) o sólo de tejido de fibra (después de 10 dpa).

Se usaron dos criterios principales para seleccionar genes de algodón como candidatos que pueden estar implicados en el desarrollo de la fibra según su perfil de ARN. Los genes que presentan un alto grado de especificidad de expresión de fibra y los genes que muestran niveles de expresión que cambian de forma concomitante con el desarrollo de la fibra (Tabla 3, a continuación).

5 Veintitrés genes cumplen estos criterios de selección:

10 CT-1 (SEQ ID NOs. 1 y 106), CT_2 (SEQ ID NOs. 2 y 107), CT_3 (SEQ ID NOs. 3 y 108), CT_4 (SEQ ID NOs. 4 y 109) CT_6 (SEQ ID NOs. 5 y 110), CT_7 (SEQ ID NOs. 6 y 111), CT_9 (SEQ ID NOs. 7 y 112), CT_11 (SEQ ID NOs. 8 y 113), CT_20 (SEQ ID NOs. 9 y 114), CT_22 (10 y 115), CT_26 (SEQ ID NOs. 11 y 116), CT_27 (SEQ ID NOs. 12 y 117), CT_40 (SEQ ID NOs. 16 y 118), CT_49 (SEQ ID NOs. 17 y 119), CT_70 (SEQ ID NOs. 18 y 120), CT_71 (SEQ ID NOs. 19 y 121), CT_74 (SEQ ID NOs. 20 y 122), CT_75 (SEQ ID NOs. 21 y 123), CT_76 (SEQ ID NOs. 22 y 124), CT_77 (SEQ ID NOs. 23 y 125), CT_81 (SEQ ID NOs. 24 y 126), CT_82 (SEQ ID NOs. 25 y 95), CT_84 (SEQ ID NOs. 27 y 96) and CT_88 (SEQ ID NOs. 13 y 26).

15 Se eligieron CT-4, 22, 20, 27, 40, 82 (SEQ ID Nos: 4, 10, 9, 12, 16 y 25, respectivamente) principalmente como genes candidatos que pueden tener un papel en la iniciación de la fibra (Tabla 3) mientras CT 27 (SEQ ID NO: 12), que es un gen homólogo de GL3, se usó también como un control (en la Figura 2d se muestra CT 22, SEQ ID NO: 10).

20 Se predijo que CT-1, 2, 3, 6, 7, 9, 49, 70, 71, 74, 75, 76, 77, 81, 84 (SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 27, respectivamente, véase Figuras 2a, c) estarían implicados en el alargamiento y calidad de fibra (resistencia y finura) según sus patrones de expresión (Tabla 3, se muestra CT 1 en la Figura 2C).

25 CT11, 40, 74 y CT 26 (SEQ ID NOs. 8, 16, 20 y 11, respectivamente, véase Figuras 2a, b) que son homólogos a Glabrous1 de Arabidopsis (Nº de acceso a GeneBank AB006078) son genes específicos de fibra que mostraron expresión uniforme y específica de fibra durante todas las etapas del desarrollo de la fibra (Tabla 3, se muestra CT 11 como un ejemplo en la Figura 2B). Se muestran los perfiles de expresión de todos los genes elegidos en la Tabla 2, más arriba.

Tabla 3

CT#	Anotación de gen	Iniciación	Calidad & Alargamiento de Fibra	Expresión Estable y Específica de Fibra	Específico de Fibra	Proceso Biológico
CT_2	Sacarosa-6-fosfato hidrolasa ácida		v		Si	Metabolismo carbohidratos
CT_7	Supuesta aciltransferasa		v			Desconocido
CT_9	Proteína hipotética		v		Si	Procesamiento de tRNA
CT_49	Proteína hipotética		v			Desconocido
CT_1	Proteína tipo lipasa/hidrolasa con motivo GDSL		v			Desconocido
CT_3	Supuesta proteína mitocondrial		v			Desconocido
CT_6	Aspartil proteasa		v			Proteolisis y peptidolisis
CT_70	Cisteína proteasa		v			Privación de agua
CT_71	Proteína de respuesta a la deshidratación		v			Desección

CT#	Anotación de gen	Iniciación	Calidad & Alargamiento de Fibra	Expresión Estable y Específica de Fibra	Específico de Fibra	Proceso Biológico
CT_75	Supuesta proteína de transferencia de lípidos		v			
CT_76	Supuesto receptor de quinasa		v		Si	Fosforilación de aminoácidos de proteína
CT_77	Proteína hipotética		v		Si	
CT_81	Proteína tipo APETAL2		v			organización y biogénesis de la pared celular
CT_84	Proteína hipotética		v			biosíntesis de la familia de aminoácidos aromáticos
CT_4	Proteína tipo citocromo P450	v			Si	transporte de electrones
CT_20	Proteína homóloga relacionada con MYB	v				regulación de la transcripción
CT_22	Proteína hipotética	v				desconocido
CT_27	Proteína tipo factor de transcripción bHLH	v				regulación de la transcripción
CT_82	Caja MADS tipo proteína	v				regulación de la transcripción
CT_11	Factor de transcripción de caja MADS tipo agamous			v	Si	regulación de la transcripción
CT_26	Proteína homóloga relacionada con MYB			v	Si	compromiso de destino celular
CT_40	Proteína precursora 3 de transferencia de lípidos (LTP 3)			v	Si	transporte de lípidos
CT_74	Proteína del transposón tipo EN/SPM			v	Si	organización y biogénesis de la pared celular

Los genes seleccionados se sobre-expresaron en arabisopsis y tomate transgénicos, usando el promotor constitutivo CaMV de 35S (SEQ ID NO. 31). Se evaluaron adicionalmente las plantas transgénicas para modificaciones epidérmicas, densidad y longitud de tricoma y rendimiento del pelo de semilla (como se describe adicionalmente en esta memoria más adelante).

5 Ejemplo 3

Análisis de la expresión génica usando microchips públicamente disponibles

Se recopiló información adicional sobre la expresión de los genes seleccionados (Ejemplo 2, más arriba) por análisis estadístico de datos de microchips de arabisopsis. Esencialmente, se compararon los mejores homólogos de los nuevos genes candidatos en arabisopsis con un conjunto de 77 microchips experimentales de diferentes tejidos de Arabidopsis (bases de datos AtGenExpress, el investigador principal para AFGN: Prof. Dr. Lutz Nover, 10 Botanisches Institut, Molekulare Zellbiologie, FB Biologie und Informatik der J. W. Goethe Universität Frankfurt; Biozentrum N200 3OG, Marie-Curie-Strasse 9, 60439 Frankfurt am Main, www.arabisopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp).

15 Se seleccionaron secuencias de polinucleótidos que se expresaban altamente en células alargadas o meristemas de inflorescencia para análisis posterior.

La Tabla 4 a continuación enumera los tejidos que exhiben los niveles más altos de expresión.

Tabla 4

	Tejidos con alta expresión	< cambio en veces/especificidad	Relacionado con la fibra
CT_1	Semilla, silicuas	10-20	Células alargadas
CT_11	carpelos, flor, semilla, silicuas	Específico de tejido	Específico de flor
CT_2	raíz, plántula y sépalos	Específico de tejido	Células alargadas
CT_22	carpelos, flor, inflorescencia, brote	4-10	inflorescencia
CT_4	Pétalos, estambre	>10	Células alargadas
CT49	silicuas	>2	Células alargadas
CT_7	carpelos, flor, inflorescencia, pétalos, brote, silicuas	10-30	inflorescencia
CT_70	flor, raíz, estambre	Casi específico de tejido	
CT_76	carpelos, flor, inflorescencia, brote, silicuas	>2	Células alargadas & inflorescencia
CT_77	semillas, polen, estambre, pétalos, sépalos, silicuas	10-50	Células alargadas
CT_82	inflorescencia, brote tallo	3-6	inflorescencia
CT_88	pétalos, estambre		Células alargadas

Ejemplo 4

Establecer una correlación entre la expresión de genes candidatos y longitud de fibra

20 Con el fin de definir las correlaciones entre los niveles de expresión de ARN de los genes seleccionados y la longitud de fibra, se analizaron fibras de 4 líneas de algodón diferentes. Se seleccionaron estas fibras que mostraban una muy buena calidad de fibra y un alto índice de pelusa (tipos Pima, procedentes de otras especies de algodón, esto es *G. barbadense*) y diferentes niveles de calidad e índices de pelusa de varias líneas de *G. hirsutum*: buena calidad y alto índice de pelusa (tipo Acala), índice medio de pelusa (tipo Coker) y pobre calidad y bajo índice de pelusa (tipo 25 Tamcot).

Procedimientos experimentales

Extracción de ARN.- Se tomaron muestras de etapas de desarrollo de la fibra, que representan diferente característica de fibra, a 5, 10, 15 y 20 DPA y se extrajo el ARN como se describe en el Ejemplo 2.

30 Evaluación de la fibra.- Se midió la longitud de fibra de las líneas anteriores usando el fibrógrafo. El sistema de fibrógrafo se usó para calcular la longitud en términos de longitud "Media de la Mitad Superior" (UHM). La media de

la mitad superior (UHM) es la longitud media de la mitad más larga de la distribución de fibra. El fibrógrafo mide longitud en longitudes de tramo en un punto porcentual dado (www.cottoninc.com/ClassificationofCotton/?Pg=4#Length.)

Resultados

- 5 Se crecieron cuatro líneas diferentes de algodón en Rehovot, Israel durante el verano de 2004, y se midieron sus longitudes de fibra. Los valores UHM de las fibras se resumen en la Tabla 5, a continuación:

Tabla 5

	Longitud (UHM)
Prima S5	1,40 ± 0 a
Acala	1,23 ± 0,01 b
Coker 310	1,18 ± 0,01 c
Tamcot	1,15 ± 0,02 c

Se probaron cinco genes para la correlación entre la expresión génica y la longitud de fibra (presentada para CT_76 en la Figura 3). Los resultados se resumen en la Tabla 6 a continuación:

10

Tabla 6

		Día de Muestreo del Tejido (DPA)						
		0	5		10		15	
		Cantidades relativas de mRNA	Cantidades relativas de mRNA	Expresión relativa en relación a T0	Cantidades relativas de mRNA	Expresión relativa en relación a T0	Cantidades relativas de mRNA	Expresión relativa en relación a T0
CT_1	Tamcot	0,75	2,99	4,0	4,71			
	Coker 310	0,51	4,80	9,3	7,56			
	Acala	0,64	5,08	7,9	8,01			
CT_2	Tamcot	0,03	0,19	7,6	8,17			
	Coker 310	0,03	0,35	11,4	15,04			
	Acala	0,02	0,36	17,7	15,28			
	Pima S5	0,02	0,41	23,6	17,58			
CT_40	Tamcot	0,28				0,47	1,67	
	Coker 310	0,37				0,46	1,24	
	Acala	0,30				0,67	2,25	
	Pima S5	0,37				1,03	2,75	
CT_76	Tamcot	0,01	0,03	5,4	0,01	2,3	0,00	0,10
	Coker 310	0,01	0,08	8,9	0,04	5,1	0,00	0,10
	Acala	0,01	0,12	16,6	0,06	9,1	0,00	0,12
	Pima S5	0,01	0,13	122,4	0,18	177,9	0,12	99,51
CT_81	Tamcot	0,50	1,33	2,68	5,03	10,15	1,11	2,24
	Coker 310	0,31	2,64	8,65	4,51	14,76	0,84	2,75
	Acala	0,49	4,38	8,98	6,36	13,05	3,65	7,49

Se llevó a cabo transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa usando PCR en tiempo real, en tejidos de 0, 5, 10 y 15 DPA de plantas de algodón (*G. hirsutum* var Tamcot, Coker y Acala, y *G. barbadense* var Pima S5). Se presentan las cantidades relativas de mRNA y la expresión relativa relacionada con T0 de cada gen en todos los tejidos examinados.

Ejemplo 5

Clonación de los genes seleccionados en un vector binario bajo regulación constitutiva y expresión recombinante del mismo

5 Análisis ORF.- Se analizaron las secuencias génicas de la presente invención por ORFs usando software Gene Runner versión 3.05 (Hasting Software, Inc: www.generunner.com/). Se compararon las ORFs de cada gen con la base de datos del Genbank, usando Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se determinó la posición del codón de iniciación ATG, comparando con ORFs de más alta homología. Todas las secuencias descritas en esta memoria mostraron tener una ORF de longitud completa predicha e incluir el codón de iniciación ATG predicho.

10 Clonación dentro del vector de expresión pPI.- Para clonar genes de la presente invención, se extrajeron los ARNs totales de las varias etapas de desarrollo de células productoras de fibra usando Extracción de ARN con Borato Caliente de tejido de algodón según www.eeob.iastate.edu/faculty/WendelJ/rnaextraction.html. Se produjeron moléculas de ADN complementario (cDNA) de mRNA usando la enzima de transcripción inversa (RT) M-MuLV (Roche) y el cebador de ADN T₁₆NN, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se realizó la
15 amplificación de cDNA de 19 genes, de las secuencias anteriores, es decir los clones CT números 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 20, 22, 27, 40, 71, 74, 75, 76, 81, 82, 84 y 88, por PCR usando la enzima ADN polimerasa correctora PFU (Promega www.promega.com/pnotes/68/7381_07/7381_07.html) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Se diseñaron cebadores para cada gen para abarcar la ORF completa. Se añadieron sitios de restricción de endonucleasa adicionales al extremo 5' de cada cebador para facilitar la clonación adicional de los CTs al vector binario (pPI). La Tabla 7 a continuación enumera los cebadores usados para la clonación de cada uno de los genes:

Tabla 7

Nº de CT	Cebador directo / SEQ ID NO:	Cebador inverso / SEQ ID NO:	Sitio de restricción corriente arriba	Sitio de restricción corriente abajo
CT_1	ACCCGGGATGGATGGTTATTGTAGCAGAAGG/32	GCCGAGCTCGAATCAAAATGAGGGCAATGCC/33	SmaI	SacI
CT_2	AATCTAGACAAGTACAGAAGCTCAATTC/34	TGATAATCATGTGGAAGCAACC/35	XbaI	
CT_3	CAGCCGGGTGATGGAATGAGCATTCAG/36	CGTGAGCTCTGATTAGAGTTTCAAGTGCATG/37	SmaI	SacI
CT_6	TTTTCCGGGTTGTGTTCATGGCTTCTCTGC/38	ATGGAGCTCATATTCATGGCCAAAACAC/39	SmaI	SacI
CT_7	G CACCCGGGAAAAGAAATGGCAGGGCTC/40	TTTCGATATCCACAGTACCCCTACTTCCATGC/41	SmaI	EcoRV
CT_9	TACCCGGGTACCATTTACTCTACTACAGCTGC/42	GAGAGCTCAACAGACAAAGACCAGACTGG/43	SmaI	SacI
CT_11	ACCCCGGGCAAGTGTATCAAGAGAAATGG/44	CATGAGCTCTTTTCCCAACTCCTCTACCC/45	SmaI	SacI
CT_20	CCCCCGGTCCTATTGCATGGCTTTC/46	TTGAGCTCACTCGATCTTACTCATCC/47	SmaI	SacI
CT_22	AGCCCGGGAGATAGAGATGGGAGGTCC/48	TCGAGCTCTGGGGCAACAATCATTTACC/49	SmaI	SacI
CT_27	TCCCGGGCATCTGATCTAATTTGTTGGTGG/50	TTGGATATCGCACCTTAAGACATGGGATC/51	SmaI	EcoRV
CT_40	TTCCCGGGTACAACATGGCTAGTTCCG/52	TCGAGCTCATCAACCTCACTGCACCTTG/53	SmaI	SacI
CT_71	TAGTCACTCCTGTTTAGATGAAG/54	CTGAGCTCCAGGATTTTACTTAGGGACCC/55	XbaI	SacI
CT_74	TACCCGGGCATACAGAGATGGAGAGGC/56	ACGAGCTCAAAGGTGTTTCTTGGTCC/57	SmaI	SacI
CT_75	AGCCCGGGAGAAAGATGATGAAAAGGGG/58	AAGATAUCAAAATCCCATGCCAAAACCCC/59	SmaI	EcoRV
CT_76	AACCCGGGGCAACTTAAAAGAAAACC/60	AAGAGCTCCTTTGTTGGCTTCTCAAG/61	SmaI	SacI
CT_81	GACCCGGACTGTAAAAAGCATAGG/62	GCGAGCTCAGCTTAAAGGATGATGGGGAG/63	SmaI	SacI
CT_82	ATCCCGGGATGGTGAAGAGGCAAAATTC/64	ACGAGCTTAGCAATGGGATAAGCTAC/65	SmaI	SacI
CT_84	ATCCCGGGTTCCATGAAAAGGGTCTCG/66	GTGAGCTCATCGTCTGTTTCTCCTTCAGC/67	SmaI	SacI

- Los productos romos resultantes de la PCR se purificaron usando el Kit de Purificación de PCR (Qiagen, Alemania), digeridos con las endonucleasas de restricción apropiadas (Roche) y se clonaron dentro del vector binario pPI (Figura 4), mientras que se reemplaza el gen marcador GUS existente. pPI es una versión modificada de pBI101.3 (Clontech, N° de Acceso U12640). pPI se construyó insertando una secuencia señal de poli-(A) sintética, que
- 5 provenía del vector plasmídico pGL3 Basic (Promega, N° Acc U47295, donde se localiza la secuencia señal de poli-(A) sintética entre las pares de bases 4658-4811), dentro del sitio de restricción HindIII de pBI101.3 (mientras se reconstruye el sitio HindIII, corriente abajo del inserto de poli-(A)), para evitar la posibilidad de efecto de revisión del promotor Nos corriente arriba. Para reemplazar el gen GUS con cada uno de los genes CT en el vector binario pPI se digirió pPI con las enzimas de restricción apropiadas [la enzima de restricción 5' es o SmaI o XbaI y la enzima de
- 10 restricción 3' es o SacI o EcoRV (Roche- usando el protocolo proporcionado por el fabricante)]. Se purificó el vector binario abierto usando el Kit de Purificación de PCR (Qiagen, Alemania). Se ligaron 5-75 ng de producto de PCR de cada uno de los genes CT y 100 ng del vector plasmídico pPI abierto en 10 µl de volumen de reacción de ligación usando la enzima ADN ligasa T4 (Roche), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los productos de ligación se introdujeron en células de *E. coli*.
- 15 Expresión recombinante en bacteria.- Se transformaron 60 µl de células competentes de *E. coli*, cepa DH5-α (aproximadamente 10⁹ células/ml), usando 1 µl de mezcla de reacción de ligación por electroporación, usando un electroporador MicroPulser (Biorad), cubetas de 0,2 cm (Biorad) y el programa de electroporación EC-2 (Biorad). Se crecieron células de *E. coli* en 0,8 ml de medio líquido LB a 37°C durante 1 h y se plaquearon 0,2 ml de suspensión celular sobre placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico kanamicina a 50 mg/l (Sigma). Las placas se
- 20 incubaron después a 37°C durante 16 h. Crecieron las colonias bacterianas y se confirmó la expresión por amplificación por PCR usando cebadores que se diseñaron para abarcar la secuencia insertada en el vector binario. Los cebadores usados para la amplificación de ADN de los insertos en el vector binario pPI fueron:
- 5'-GGTGGCTCCTACAAATGCCATC-3' (directo, SEQ ID NO. 70) y 5'-AAGTTGGGTAACGCCAGGGT-3' (inverso, SEQ ID NO. 71).
- 25 Se separaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1,5% y se estimaron los tamaños de los productos comparando con una escalera de ADN (MBI Fermentas). Los productos de PCR con los tamaños predichos se secuenciaron usando los mismos cebadores previamente usados para la amplificación por PCR (Véase Tabla 7, más arriba). Se usaron cebadores adicionales, que fueron diseñados en base a la secuencia de cada gen inserto, para completar la secuenciación del inserto de ORF de longitud completa.
- 30 Se realizó la secuenciación de la secuencia insertada para verificar que los clones se introdujeron en la orientación correcta, y para eliminar la posibilidad de que se incluyeran errores de secuencia durante la amplificación por PCR. Se determinaron las secuencias de ADN usando el secuenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc.).
- Se clonó en cada uno de los 19 constructos binarios pPI que albergaban los genes CT el promotor constitutivo 35S del Virus Mosaico de la Coliflor.
- 35 Se clonó la secuencia promotora de 35S del Virus Mosaico de la Coliflor, originada a partir del vector pBI121 (Clontech, N° de Acceso AF485783) digiriendo el vector pBI121 con las endonucleasas de restricción HindIII y BamHI (Roche) y se ligó en los constructos binarios, digeridos con las mismas enzimas (SEQ ID NO. 31).
- Ejemplo 6
- 40 Transformación en *Agrobacterium* de plásmidos binarios que albergan los genes de interés y expresión en plantas de *Arabidopsis* y de tomate.
- Cada uno de los diecinueve constructos binarios, que comprenden el promotor 35S corriente arriba de cada uno de los genes CTs se transformaron en plantas de *Arabidopsis* o de tomate a través de transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 45 Se transformaron 60 µl de células competentes GV301 o LB4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (aproximadamente 10⁹ células/ml) con 20 ng de plásmido binario a través de electroporación, usando un electroporador MicroPulser (Biorad), cubetas de 0,2 cm (Biorad) y programa de electroporación EC-2 (Biorad).
- Se crecieron células de *Agrobacterium* en 0,8ml de medio líquido LB a 28°C durante 3 h y se plaquearon 0,2 ml de la suspensión celular sobre placas de LB-agar suplementadas con los antibióticos gentamicina a 50 mg/l (para cepas de *Agrobacterium* GV301) o estreptomina a 300 mg/l (para cepa de *Agrobacterium* LB4404) y kanamicina a 50
- 50 mg/l (Sigma). Las placas se incubaron después a 28°C durante 48 h. Crecieron las colonias de *Agrobacterium* y se realizó la amplificación por PCR en células de *Agrobacterium*, usando cebadores que se diseñaron para abarcar la secuencia inserta en el vector binario.
- Los cebadores usados para la amplificación por PCR fueron: 5'-GGTGGCTCCTACAAATGCCATC-3' (directo, SEQ ID NO. 70) y 5'-AAGTTGGGTAACGCCAGGGT-3' (inverso, SEQ ID NO. 71).
- 55 Se separaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1,5% y se determinaron los tamaños de los productos

comparando con una escalera de ADN (MBI Fermentas). Los productos de PCR con los tamaños predichos se secuenciaron usando los cebadores que se usaron para la amplificación por PCR. Se realizó la secuenciación de la secuencia insertada para verificar que se introdujeron los clones correctos en las células de *Agrobacterium*.

La secuenciación de ADN se efectuó usando el secuenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc.).

5 Transformación de plantas y cultivo:

Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con presuntos genes de algodón.- Se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (plantas T0) usando el procedimiento Floral Dip descrito por Clough y Bent y por Desfeux et al., con mínimas modificaciones. Brevemente, se sembraron Plantas T0 en macetas de 250 ml llenas con la mezcla de crecimiento basado en turba húmeda. Las macetas se cubrieron con papel de aluminio y una cúpula de plástico, se mantuvieron a 4°C durante 3-4 días, después se descubrieron y se incubaron en una cámara de crecimiento a 18-24°C bajo ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h. Las plantas T0 estaban listas para la transformación seis días antes de la antesis. Se cultivaron colonias individuales de *Agrobacterium* que llevan los constructos binarios en medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/l) y gentamicina (50 mg/l). Los cultivos se incubaron a 28°C durante 48 h bajo agitación vigorosa y después se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 min. Los precipitados que comprenden células de *Agrobacterium* se resuspendieron en un medio de transformación que contiene Murashig-Skoog (Duchefa) de fuerza media (2,15 g/l); bencilamino purina (Sigma) 0,044 µM; 112 µg/l de vitaminas Gambourg B5 (Sigma); sacarosa al 5%; y 0,2 ml/l de Silwet L-77 (OSI Specialists, CT) en agua doblemente destilada, a pH de 5,7. La transformación de plantas T0 se efectuó invirtiendo cada planta en una suspensión de *Agrobacterium*, tal que el tejido de la planta por encima de la tierra se sumergió durante 3-5 seg. Cada planta T0 inoculada se colocó inmediatamente en una bandeja de plástico, luego se cubrió con una cúpula de plástico claro para mantener la humedad y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 18 h, para facilitar la infección y transformación. Se descubrieron entonces las plantas transformadas (es decir, transgénicas) y se transfirieron a un invernadero para su recuperación y maduración.

Se cultivaron las plantas T0 transgénicas en el invernadero durante 3-5 semanas hasta que las silicuas eran marrones y secas. Las semillas se recogieron de las plantas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la siembra. Para generar plantas transgénicas T1 que albergan los genes, se esterilizaron en superficie las semillas recogidas de plantas transgénicas T0 sumergiéndolas en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de inmersión en hipoclorito sódico al 5% y tritón al 0,05% durante 5 minutos. Las semillas esterilizadas en superficie se lavaron a fondo en agua destilada estéril después se colocaron en placas de cultivo que contienen Murashig-Skoog (Duchefa) de fuerza media; sacarosa al 2%; agar de planta al 0,8%; kanamicina 50 mM; y cerbenicilina (Duchefa) 200 mM. Las placas de cultivo se incubaron a 4°C durante 48 h se transfirieron después a una sala de crecimiento a 25°C durante una semana adicional de incubación. Se transfirieron plantas de *Arabidopsis* T1 vitales a unas placas de cultivo fresco durante otra semana de incubación. Después de la incubación se retiraron las plantas T1 de las placas de cultivo y se plantaron en mezcla de crecimiento contenida en macetas de 250 ml. Las plantas transgénicas se dejaron crecer en un invernadero hasta la madurez.

Transformación de plantas de tomate Micro-Tom con presuntos genes de algodón.- La transformación y cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, var MicroTom) de plantas transgénicas se efectuó de acuerdo a Curtis *et al.* 1995, y Meissner *et al.* 2000.

Ejemplo 7

40 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis* transformadas y caracterizaciones de fenotipo

Se crecieron plantas T1 de *Arabidopsis* como se describe anteriormente y se caracterizaron los fenotipos.

Análisis por PCR de plantas transgénicas.- Se sembraron semillas T2 de *Arabidopsis* directamente en mezcla de crecimiento contenida en macetas de 250 ml. Se monitorizaron por PCR las plantas transgénicas positivas para resistencia a kanamicina en hojas viejas de dos semanas. Los cebadores usados para la amplificación por PCR de la kanamicina fueron: 5'-CTATTCGGCTATGACTGGGC-3' (directo, SEQ ID NO. 72) y 5'-ATGTCCTGATAGCGGGTCCGC-3' (inverso, SEQ ID NO. 73).

Funcionamiento de la raíz.- Con el fin de visualizar el funcionamiento de la raíz, se esterilizaron en superficie semillas T2 sumergiéndolas en metanol al 70% durante 1 minuto, seguido de inmersión en hipoclorito sódico al 5% y tritón al 0,05% durante 5 minutos. Las semillas esterilizadas en superficie se lavaron a fondo en agua destilada estéril y después se colocaron en placas de cultivo que contienen Murashig-Skoog (Duchefa) de fuerza media; sacarosa al 2%; agar de planta al 0,8%; kanamicina 50 mM; y cerbenicilina (Duchefa) 200 mM. Las placas de cultivo se incubaron a 4°C durante 48 h después se transfirieron a una sala de crecimiento a 25°C hasta que alcanzan el tamaño correcto para la caracterización fenotípica.

Resultados

Tabla 8- Análisis de plantas T2 de Arabidopsis que cuidan de los supuestos genes de algodón

CT	Función del gen supuesto	Generación de T	Nº de plantas independientes	Fenotipo T2
CT_11	Factor de transcripción de caja MADS tipo agamous	2	5	Hojas curvadas y estrechas, con peciolo largo, raíces más largas y densas (Figuras 5a-c)
CT_9	Proteína hipotética	2	5	Las hojas de roseta y las inflorescencias son más largas y más grandes en comparación con el control. Las raíces son más largas y densas. El fenotipo se asemeja al fenotipo de plantas de Arabidopsis que sobreexpresen expansina como se caracterizó por Hyung-Taeg Cho y Daniel J. Cosgrove en PNAS u Agosto 15, 2000. (Figuras 5g-i)
CT_20	Proteína relacionada con MYB	1	1	Hojas pequeñas irritantes y peludas (Figuras 5d y e)
CT_40	Proteína de transferencia de lípidos 3	2	5	Hojas más largas y curvadas (Figura 5j)
CT_22	Proteína hipotética			Hojas más estrechas, con largos peciolo (Figuras 5d y f)
CT_81	Proteína tipo APETAL2	1	1	Las hojas de roseta son casi dobles que las del tipo salvaje (Figuras 5k y l)
CT_1	Proteína tipo hidrolasa	1	6	Hojas estrechas, con largos peciolo (lo mismo que CT_22, no mostrado)

Ejemplo 8

Crecimiento de plantas transformadas de MicroTom y caracterizaciones de fenotipo

5 Procedimientos experimentales

Plantas transgénicas de tomate.- Se transformaron las plantas como se describe en el Ejemplo 6, anteriormente. Después de la transformación, las plantas de tomate MicroTom T1 se crecieron en mezcla contenida en macetas de 1000 ml.

Resultados

Tabla 9 – Analizando plantas de tomate Micro-Tom T1 y T2 y semillas que cuidan de los supuestos genes de algodón

CT	Función del gen supuesto	Generación de T	Nº de plantas independientes	Longitud de pelo de semilla T1 (wt 0,3 mm)	Fenotipo T2
CT20	Proteína homóloga relacionada con MYB	I	10	0,366±0,006 mm (Figuras 6c-e)	Hojas pequeñas y arrugadas, los tricomas en las hojas son más largos y densos (Figuras 6a-b)
CT75	Supuesta proteína de transferencia de lípidos	I	2	0,347±0,019 mm	Inflorescencia grande
CT_6	Aspartil proteasa	1	1	0,343±0,019	
CT_82	Caja MADS tipo proteína	1	3	0,423±0,013 mm (Figura 5f)	Plantas normales

Discusión

5 (Ejemplos 1-8)

Identificación *in silico* de genes implicados en el desarrollo de la fibra de algodón.- Poco se conoce sobre el control genético de la iniciación y alargamiento de la fibra de algodón. Desde que tanto la fibra de algodón y los tricomas de Arabidopsis se desarrollan a partir de células epidérmicas únicas se asume que comparten una regulación genética similar (revisado en Wagner G. J. *et al.* 2004). En Arabidopsis, un gran número de estudios han puesto de manifiesto una amplia información sobre los mecanismos genéticos que regulan la iniciación y alargamiento del tricoma. Varios estudios demostraron las similitudes entre el tricoma y la fibra mostrando que promotores específicos de la fibra de algodón en plantas de arábido y tabaco confieren expresión específica de tricoma (Kim y Triplett, 2001; Hsu *et al.* 1999; Liu *et al.* 2000, Wang *et al.* 2004). La mayor parte de la investigación que estudia el desarrollo de la fibra usa el tricoma de arábido como un sistema modelo para identificar genes de algodón de un modo a pequeña escala (Kim y Triplett, 2001; Wang *et al.* 2004).

En este estudio los presentes inventores han usado bibliotecas EST de tricoma y de flor de tomate como sistemas modelo para estudiar el desarrollo de la fibra de algodón. El análisis del perfil de las bibliotecas EST de los agrupamientos homólogos del tomate con genes conocidos de tricoma de arábido mostraron que las bibliotecas EST de tricoma y de flor de tomate contribuyeron significativamente a este conjunto de agrupamientos.

Este resultado se confirmó mientras se analizaba el perfil de las bibliotecas EST de los nuevos agrupamientos de algodón que se seleccionaron por su patrón de expresión de ARN como genes de fibra de algodón. 9 y 10 agrupamientos contenían ESTs que provenían de bibliotecas de flor y de tricoma, respectivamente. Además, el grupo de agrupamientos de tricoma de tomate (ESTs de tricoma /ESTs totales > 0,1) comprende gran parte de los genes de tomate que presentan alto grado de homología con algodón (~50%) a pesar de que su porcentaje en la población total es solamente ~5%. Esto puede indicar que ambos órganos comparten procesos de desarrollo comunes. A pesar de que hay un gran grupo de estudios sobre el control genético del desarrollo del fruto y tricoma del tomate no se encuentran publicaciones que usen estos órganos como una fuente de datos genómicos para estudiar el desarrollo de la fibra de algodón. Se compararon todos los 23 genes de algodón con datos únicos EST producidos por separado a partir de embrión y suspensores de semillas en desarrollo de la judía Scarlet Runner (www.mcdb.ucla.edu/Research/Goldberg/ests/intro-index.htm). Todas las secuencias, excepto una, comparten altas homologías con secuencias procedentes del suspensor, que es un tejido maternal. Este resultado apoya los resultados *in silico* e identifica el papel de estos agrupamientos de algodón en el desarrollo de la fibra, que se originó también a partir de células maternales.

Identificar genes de algodón con un papel en el desarrollo de la fibra a través del análisis del perfil de expresión de ARN.- La fase de diferenciación/iniciación se representa mediante expresión génica en o antes de la antesis. La fase de alargamiento principalmente en cultivares de hirsutum se representa por un crecimiento muy rápido durante 5 a 20 DPA. Un patrón se representa por genes como CT 1, 2, 3 expresados a sus más altos niveles, ligeramente antes y durante el periodo de pico de expansión de fibra aproximadamente a 20 DPA. Otro patrón de expresión génica se muestra por el CT40, 11 o 70 que tienen el mismo nivel de expresión a través de todo el desarrollo de la fibra. Del mismo modo, genes conocidos que codifican actina, endoxiloglucan transferasa o Suc sintasa también muestran

niveles de ARN invariables a lo largo del desarrollo de la fibra (Shimizu et al., 1997).

Ya que la iniciación se produce principalmente antes de la antesis hasta 1 DPA, sugiere que genes con un pico de expresión durante este tiempo pueden tener un papel en la iniciación de la fibra. CT 4, 20, 22 y 11 tienen patrones de expresión que indican su implicación en esta etapa.

- 5 Una limitación de la base de datos EST actual del algodón es la ausencia de ESTs que se extrajeron a partir de la flor en la etapa de iniciación (hay una biblioteca que se sacó de ovario 1DPA pero de pobre calidad) la mayoría de ESTs se tomaron sólo más tarde, entre 6 y 10 DPA. Esta composición EST puede explicar porqué la mayoría de los genes elegidos tienen un patrón de expresión que indica su asociación con la etapa de alargamiento.

- 10 Papel de los genes seleccionados en el desarrollo de la fibra, posibles mecanismos.- Los 23 agrupamientos asociados a fibra se pueden clasificar en 6 categorías funcionales de acuerdo a sus homologías de secuencia con proteínas y enzimas conocidas (Tabla 3, más arriba). La clasificación se hizo según el consorcio GO (www.geneontology.org/). El grupo más grande comprende secuencias únicas sin homología con cualquier proteína conocida. El resto de los agrupamientos se clasificaron de acuerdo a categorías conocidas por estar asociadas con el desarrollo de la fibra. Dos genes (Tabla 3, más arriba) se clasificaron dentro de una categoría compromiso de destino celular: un nuevo gen que pertenece al factor de transcripción MYB y un gen de algodón homólogo a GL3 que se sabe que están implicados en el desarrollo de tricoma en *Arabidopsis*. El patrón de expresión de ambos genes y el fenotipo del transgen CT20 tanto en plantas T1 de *Arabidopsis* como en tomate apoyan su implicación principalmente en la fase de iniciación.

- 20 Pruebas acumulativas ligan los genes MYB de algodón con el desarrollo de la fibra (Suo. J. et al. 2003, Cerdoni. M. L. et al. 2003, Loguerico L.L. et al 1999). La sobre-expresión de un número de genes que funcionan en la misma ruta relacionada con la fase de iniciación, puede además inducir la iniciación. Kirik et al. (2004) mostró que sobre-expresando dos o tres genes de la fase de iniciación aumentan el número de tricomas y pelos de raíz. Los genes que se relacionan con la fase de iniciación se pueden usar para uniformidad de la iniciación de la fibra en la semilla de algodón, iniciar más de las células epidérmicas de semillas en fibras. Se puede usar la sobre-expresión de esos genes en meristemas vegetativos como tallos y hojas como protección frente a insectos (como se ha mostrado en la colza, www.westerngrains.com/news/nr_050413.html) y estreses a-bióticos. Sin embargo, no hay evidencia sustancial que pruebe la implicación directa de cualquier gen MYB en el desarrollo de la fibra.

- 25 Otros dos genes (Tabla 3, más arriba) son factores de transcripción de las familias MYB y MADS BOX. Muchos estudios demostraron la función de estas dos familias de factores de transcripción como genes homeóticos con papel clave en diferentes procesos de desarrollo, entre ellos están la morfogénesis del tricoma y de la fibra (Suo. J. et al. 2003, Ferrario. S. et al. 2004). Su papel en etapas tempranas del desarrollo de la fibra se apoya también por su patrón de expresión de ARN, que, se induce antes, y durante el día de antesis. Un gen (CT_2, Tabla 3, más arriba) se clasificó en las rutas del metabolismo del almidón y la sacarosa. Un trabajo reciente demuestra que otro gen (SUS), que, pertenece a esta ruta, es un factor limitante tanto en la iniciación de la fibra como en el desarrollo. 30 CT_40, 75 se clasificaron como de transporte de lípidos cuya expresión de ARN está altamente inducida durante la etapa temprana de alargamiento de la fibra ligado al hecho de que los lípidos son componentes clave en la formación de la fibra. Varios genes (Tabla 3, más arriba, CT_4, 70, 71) se clasificaron o como genes implicados en la a desecación, respuesta a salinidad estimulada por ácido abscísico o como genes implicados en la transferencia de electrones. De ellos, se seleccionaron 3 genes (CT 7, 9 y 49) por patrón de expresión de ARN por ser inducidos en la etapa de alargamiento. Varios estudios consideran cambios en los mecanismos de bomba de protón y potasio como factor clave en la rápida velocidad de crecimiento de la fibra (Smart L. B. et al. 1998). Combinar la sobre-expresión de varios genes que se relacionan con el alargamiento de la fibra como genes relacionados con el metabolismo de almidón y sacarosa que aumentarán la formación de la pared celular, con genes de transporte de lípidos o genes relacionados con la desecación que puedan influir en la presión de la célula, podría dar como resultado fibras más largas que sobre-expresar un solo gen. 40 45

Ejemplo 9

Clonación y análisis de secuencias promotoras corriente arriba de los genes de la presente invención

- 50 La expresión génica diferencial en tejidos de fibra frente a otros tejidos en algodón es el resultado de una regulación génica complicada. Las regiones genómicas corriente arriba de los 23 genes seleccionados se predijo que poseían actividades promotoras que dirigen la expresión génica en células de fibra de forma cuantitativa y cualitativa únicas. Una expresión génica precisa, dirigida a células de fibra, es crucial para el desarrollo de plantas de algodón con un rendimiento mejorado de fibra, sin afectar negativamente a otros tejidos de la planta.

Procedimientos experimentales

- 55 Clonación de secuencias promotoras.- La secuencia genómica corriente arriba de CT2 y CT6 se clonaron a partir de ADN genómico de algodón (*Gossypium hirsutum* L. var Acala), como sigue. Se extrajo el ADN genómico total de tejidos de las hojas de la planta de 4 semanas de edad de plantas de algodón cultivadas (*Gossypium hirsutum* L. var Acala), usando el Kit de extracción de ADN (Dneasy plant mini kit, Qiagen, Alemania). Se realizaron PCR inversa (IPCR), digestión de ADN, auto-ligación, y reacción de PCR sobre ADN genómico, siguiendo el protocolo común

(www.pnci.unimelb.edu.au/core_facilities/manual/mb390.asp) con las siguientes modificaciones. Para evitar errores en la IPCR, se identificó primero la secuencia genómica de la secuencia 5' de un cDNA relevante (es decir, incluyendo intrones) para producir Genomic Island (GI). La región deseada del ADN genómico se amplificó por PCR usando cebadores de oligonucleótidos directos diseñados en base a la secuencia del agrupamiento de cDNA (para CT_2 y CT_6, las secuencias GI son, respectivamente, como se establece en SEQ ID NOs. 74 y 75 para CT_2 y CT_6. Los cebadores son como se establecen en SEQ ID NOs. 14-15 (CT_2) y 101-102 CT_6). La reacción de PCR se realizó en un termociclador de ADN, usando protocolos comunes de PCR. Por ejemplo:

92°C/3 min → 31 x [94°C/30 seg → 56°C/30 seg → 72°C/3 min] → 72°C/10 min).

Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR (Qiagen) y se realizó la secuenciación de los productos de PCR, usando el secuenciador ABI 377 (Amersham Biosciences Inc.).

En algunos casos, se usó una técnica diferente [UP-PCR (Domínguez y López-Larrea 1994)] cuando la IPCR da como resultado una pobre amplificación. Se usó la técnica de UP-PCR con el fin de amplificar una región corriente arriba desconocida de secuencias de agrupamientos conocidas. Normalmente, el procedimiento implica cuatro cebadores de oligonucleótidos: dos cebadores específicos de secuencia (SPs, externo e interno) (enumerados a continuación), ambos con la misma orientación del extremo 3' hacia la desconocida, pero deseada, región 5' del gen, y dos cebadores universales caminantes (WP28 5'-TTTTTTTTTTTGTGGTGGGGGTGT (SEQ ID NO. 76 y sWP 5'-TTTTGTTTGTGGTGGG, SEQ ID NO. 77). Las reacciones se llevaron a cabo usando las siguientes mezclas de reacción: mezcla de la muestra (SM)- Se añadió ADN genómico de especies de algodón (30-40 ng), cebadores WP28 (20 pmol), y agua doblemente destilada hasta un volumen final de 10 µl. Mezcla de la polimerasa (PM)- Se añadieron dNTPs (Roche, Suiza, 10 nmol cada uno), mezcla Expand Long Template Enzyme (Roche, Suiza, 1 U), tampón 10 x suplementado con la enzima y agua doblemente destilada hasta un volumen final de 8 µl.

Las SMs se colocaron en un termociclador (Biometra, EE.UU.), donde se sometieron a un programa de amplificación de 1 minuto a 90°C, se mantuvieron (pausa) a 80°C hasta que se añadió PM, 30 seg a 15°C, 10 minutos a 25°C, 3 minutos a 68°C, se mantuvieron a 90°C hasta que se añadió SP externo (2 µl de concentración 10 µM). El proceso se siguió por reacción de PCR externa de 30 segundos a 92°C, 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 65,5°C, 3 minutos a 68°C, durante 30 ciclos seguido de extensión final de 10 minutos a 68°C.

El producto de la PCR externa diluido 5.000-25.000 veces se usó como un molde, y se efectuó la amplificación por PCR usando cebadores específicos internos sWP y SP (30 pmol de cada uno), 1 U de Ex Taq (Takara), en un volumen de reacción de 50 µl. La reacción de PCR interna se sometió a un programa de amplificación de 2 minutos a 92°C, seguido de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, y 3 minutos a 72°C durante 30 ciclos y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de IPCR/Up-PCR se purificaron (PCR Purification Kit, Qiagen, Alemania) y se secuenciaron (secuenciador ABI 377, Amersham Biosciences Inc.).

Los cebadores para CT_2 fueron como sigue (UP-PCR):

Cebadores externos:

sWP28- 5'-TTTTTTTTTTTGTGGTGGGGGTGT-3' (SEQ ID NO. 78)

SP (Externo)- 5'-CTGGGGTACTTGCTAATGG-3' (SEQ ID NO: 79)

Cebadores internos (anidados):

sWP- 5'-TTTTGTTTGTGGTGGG-3' (SEQ ID NO: 80)

SP (Interno)- 5'-GCTCCGGGCTTTGGTTAACG-3' (SEQ ID NO: 81)

La secuencia genómica interna de CT_2 resultante del procedimiento anterior se proporciona en la SEQ ID NO: 14.

Los cebadores para CT_6 fueron como sigue (UP-PCR):

Cebadores externos:

sWP28- 5'-TTTTTTTTTTTGTGGTGGGGGTGT-3' (SEQ ID NO. 78)

SP (Externo)- 5'-GGCTTTGGGATGTTTGAGGTGG-3' (SEQ ID NO. 82)

Cebadores internos (anidados):

sWP- 5'-TTTTGTTTGTGGTGGG-3' (SEQ ID NO: 83)

SP (Interno)- 5'-GGTGGTGGGCTCTTGCAACAG-3' (SEQ ID NO: 84)

La secuencia genómica interna de CT_2 resultante del procedimiento anterior se proporciona en la SEQ ID NO: 85.

5 Para clonar los promotores y los 5' UTRs supuestos, se llevó a cabo una amplificación por PCR usando un nuevo conjunto de cebadores (debajo) en los que había una extensión de 8-12 pb que incluía un sitio de restricción (*HindIII*, *Sall*, *XbaI*, *BamHI*, o *SmaI*) en el extremo 5'. Para cada promotor, se seleccionaron sitios de restricción que no existían en la secuencia promotora. Además, los sitios de restricción en las secuencias cebadoras se diseñaron de manera que los productos de PCR resultantes fueran clonados en el vector binario pPI en la orientación correcta, corriente arriba del gen marcador GUS.

El plásmido pPI se construyó insertando una secuencia señal de poli-(A) sintética, procedente del vector plasmídico básico pGL3 (Promega, N° Acc. U47295; 4658-4811 pb) en el sitio de restricción *HindIII* del vector binario pBI101.3 (Clontech, N° Acceso U12640).

10 A continuación se presentan los cebadores usados para la amplificación y clonación del promotor y del 5' UTR (P+U) dentro de pPI, y la secuencia amplificada y clonada. Los sitios de restricción dentro de cada cebador se muestran en letras en negrita:

CT_2:

P+U directo (*HindIII*): 5'- ATTCAAGCTTTTTTTTGTGGGGG-3' (SEQ ID NO: 86)

15 P+U inverso (*BamHI*): 5'- TTGGATCCTTGGGCATTGAGCTTCTGTAC-3' (SEQ ID NO: 87)

La secuencia P+U de CT_2 es como se expone en SEQ ID NO: 88.

CT6:

P+U directo (*HindIII*): 5'- TTAAGCTTTGGGCTCTTGCAACAGAGGC-3' (SEQ ID NO: 89)

P+U inverso (*BamHI*): 5'- AAGGATCCGACGACGACAACAACAAC-3' (SEQ ID NO: 90)

20 La secuencia P+U de CT_6 es como se expone en SEQ ID NO: 91.

Se usó ADN genómico o el producto IPCR/UP-PCR como ADN molde para la amplificación por PCR, usando los cebadores de oligonucleótidos nuevamente diseñados. Los productos de PCR se purificaron (PCR Purification Kit, Qiagen, Alemania) y se digirieron con los sitios de restricción existentes en los cebadores (Roche, Suiza). Los productos de PCR digeridos se re-purificaron y se clonaron en el vector binario pPI, que se digirió con las mismas enzimas de restricción. El producto de PCR y el vector plasmídico abierto se ligaron usando la enzima ADN ligasa de T4 (Roche, Suiza).

25 Ejemplo 10

Transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* con vectores binarios que albergan promotores de fibra de algodón

30 Se usó el vector binario pPI, que incluye o el promotor de CT2 o el de CT6, corriente arriba del gen marcador GUS para transformar células de *Agrobacterium*.

Los vectores binarios se introdujeron en células competentes GV301 o LB4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (aproximadamente 10⁹ células/ml) mediante electroporación. La electroporación se realizó usando un electroporador MicroPulser (Biorad), cubetas de 0,2 cm (Biorad) y el programa de electroporación EC-2 (Biorad). Las células tratadas se cultivaron en medio líquido LB a 28°C durante 3 h, después se plaquearon sobre LB agar suplementado con gentamicina (50 mg/l; para cepas de *Agrobacterium* GV301) o estreptomina (300 mg/l; para la cepa de *Agrobacterium* LB4404) y kanamicina (50 mg/l) a 28°C durante 48 h. Se analizaron las colonias de *Agrobacterium* que se desarrollaron en el medio selectivo por PCR usando los cebadores expuestos en las SEQ ID NOs: 70-71, que se diseñaron para abarcar la secuencia insertada en el plásmido pPI. Los productos de PCR resultantes se aislaron y secuenciaron como se describe anteriormente en el Ejemplo 4, para verificar que se introdujeron apropiadamente las secuencias correctas en las células de *Agrobacterium*.

40 Ejemplo 11

Los promotores específicos de fibra de algodón se expresan en hojas de tomate y frutos de tomate

Se efectuó la tinción de GUS para ilustrar la expresión específica en tricomas y frutos de tomate.

45 Procedimientos experimentales

Transformación de plantas de tomate Micro-Tom con el supuesto promotor de algodón.- Como se describe anteriormente.

Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el supuesto promotor de algodón.- Como se describe anteriormente.

Tinción de GUS de Arabidopsis.- La tinción de GUS de plantas de Arabidopsis se efectuó como se describió previamente (Jefferson RA. et. al. 1987, Meissner et. al. 2000).

Tinción de GUS de hojas de tomate. La tinción de GUS de plantas de tomate se efectuó como se describió previamente (Jefferson RA. et. al. 1987, Meissner et. al. 2000).

5 La fijación del tejido se efectuó de la siguiente manera. Las hojas de tomate se sumergieron en acetona al 90%, helada, después se incubaron en hielo durante 15-20 minutos seguido de la eliminación de la acetona. A partir de entonces el tejido se enjuagó dos veces con la Solución de Trabajo [tampón Fosfato Sódico (Sigma. EE.UU.) 100 mM pH=7, Ferricianida (Sigma. EE.UU.) 5 mM, Ferrocianida (Sigma. EE.UU.) 5 mM, EDTA (BioLab) pH=8 1 mM, Triton X-100 (Sigma. EE.UU.) al 1%] durante 15-20 minutos en la oscuridad. A continuación se retiró la solución de lavado y se reemplazó con solución de tinción de X-gluc [Solución de Trabajo + ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico (X-GlcA, Duchefa) solubilizado en N,N-dimetilformamida (BioLab) 0,75 mg/ml, Ditiotreitól (BioLab) 100 mM] y se incubó durante toda la noche a 37°C en la oscuridad (tubos envueltos con papel de aluminio). La destinción se efectuó hundiendo el tejido vegetal en etanol al 70% y calentando a 50°C ~120 minutos. La etapa de destinción se repitió hasta que el tejido vegetal se volvió transparente excluyendo las regiones teñidas de azul. Las plantas desteñidas se almacenaron en etanol (BioLab) al 70% a temperatura ambiente.

20 Tinción de GAS de frutos de tomate.- La tinción de Gus de frutos de tomate se efectuó como se describió previamente (Jefferson RA. et. al. 1987, Meissner et. al. 2000). Brevemente: se sumergieron láminas finas de fruto de tomate en solución de tinción [tampón Fosfato Sódico (Sigma. EE.UU.) 100 mM pH=8, Ferricianida (Sigma. EE.UU.) 5 mM, Ferrocianida (Sigma. EE.UU.) 5 mM, EDTA (BioLab) pH=8 15 mM, Metanol (BioLab) al 20%, ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico (X-GlcA, Duchefa) solubilizado en N,N-dimetilformamida (BioLab) 0,75 mg/ml] en la oscuridad (tubos envueltos con papel de aluminio) e incubados durante toda la noche a 37°C. La destinción se efectuó hundiendo el tejido vegetal en etanol al 70% y calentando a 50°C ~20 minutos. La etapa de destinción se repitió hasta que la lámina de fruto se volvió transparente excepto por las regiones teñidas de azul. Los frutos desteñidos se almacenaron en etanol (BioLab) al 70% a temperatura ambiente.

25 Resultados

Se realizó la tinción de GUS en semillas de plantas de tomate T1.

GUS se expresó bajo la regulación de CT2 y CT6, promotores en las plantas de tomate transformadas genéticamente (Figuras 7a-b).

Los resultados para la generación de tomate T1 se resumen en la Tabla 10, a continuación.

30

Tabla 10

Promotor	Nº de plantas T1 independientes	Hoja	Tricoma de hoja	Cubierta de semilla de fruto joven	Cubierta de semilla de verde maduro	Cubierta de semilla de fruto maduro
CT2	cuatro	0	2	3	5	3
CT6	uno	0	1	1	2,5	1
Los números representan el grado promedio, 0- no expresado, 5-alta expresión						

Ejemplo 12

Pelo de semilla de tomate como un sistema modelo para fibras de algodón

35 La modificación genética del algodón es larga y consume tiempo. Por lo tanto para encontrar genes que son capaces de mejorar el rendimiento y calidad de la fibra de algodón, existe una necesidad de un sistema modelo para el desarrollo de fibra de algodón en otras plantas.

Las células de tricoma y el pelo de raíz comparten características comunes con las células de fibra de algodón, y son ampliamente aceptados como sistemas modelo para el desarrollo de la fibra de algodón [Revisado en Wagner. G. J. et. al. (2004) y Wang et al. 2004].

40 Sin embargo medir cambios en velocidad de crecimiento, longitud y grosor así como otros parámetros estructurales no es una tarea fácil debido al pequeño tamaño, remota accesibilidad y falta de uniformidad en tamaños de las células de tricoma.

Para superar estas limitaciones, se analizaron pelos de semilla de tomate para su posible uso como un tejido modelo para el desarrollo de la fibra de algodón. Para este fin, se sobre-expresó el gen marcador GUS bajo la regulación del elemento promotor específico de fibra de algodón derivado de CT2, como se describe anteriormente.

Se efectuó la transformación en el tomate del constructo primario, la regeneración de la planta y la tinción de GUS como se describe anteriormente.

5 Los pelos de la semilla de tomate (Figura 8a) son células epidérmicas maternas, que cubren la superficie del óvulo de las semillas. En aspectos anatómicos, el pelo de la semilla de tomate está más cerca de las fibras de algodón que cualquiera de las células de tricoma o del pelo de la raíz.

Se produjeron 4 frutos de tomate transgénicos independientes que sobre-expresan el gen GUS bajo el promotor específico de algodón CT_2. Se observó tinción de GUS de frutos en la etapa de maduro-verde (fruto en su tamaño justo antes del proceso de maduración) únicamente en la envoltura de la semilla, donde se está desarrollando el pelo de la semilla (Figuras 7a y b).

10 Se produjeron cinco frutos de tomate transgénico independientes que sobre-expresan 35S-expansina (AF043284), y se midió la longitud del pelo de semilla y se comparó con el wt. El pelo de semilla de plantas transgénicas era significativamente más largo que el del wt (Figuras 8a y b).

Tabla 11

Planta	Número de plantas independientes	Longitud de pelo de semilla (mm)
WT	3	0,300±0,019
35S:expansina	5	0,357±0,017 (Figura 8b)

Referencias citadas por nombre del autor en la solicitud (se citan otras referencias en el documento)

15 Cedroni M.L, Cronn R.C, Adams K.L, Wilkins T.A, and Wendel J.F. 2003. Evolution and expression of MYB genes in diploid and polyploid cotton. *Plant Mol. Biol.* 51,313-25.

Clough S.J, and Bent A.F (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-43.

Curtis I.S, Davey M.R, and Power J.B. 1995. Leaf disk transformation. *Methods Mol. Biol.* 44, 59-70.

20 Desfeux C, Clough S.J, and Bent A.F (2000). Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol.* 123, 895-904.

Dominguez O, and Lopez-Larrea. C. 1994. Gene walking by unpredictably primed PCR. *Nucleic Acids Research.* 22: 3247-3248.

25 Hsu C.Y, Creech R.G, Jenkins J.N, and Ma D.P. 1999. Analysis of promoter activity of cotton lipid transfer protein gene LPT6 in transgenic tobacco plants. *Plant Sci* 143, 63-70.

Kim H.J, and Triplett B.A. 2001. Cotton fiber growth in planta and in vitro. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiol.* 2001 Dec;127(4): 1361-6.

Larkin J.C, Brown M.L, and Schiefelbein J. 2003. How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis*. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 54, 403-430.

30 Liu H.C, Creech R.G, Jenkins J.N, Ma D.P. 2000. Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene Ltp3(1). *Biochim Biophys Acta.* 24): 106-11.

Loguerico L.L, Zhang J.Q, and Wilkins T.A. 1999. Differential regulation of six novel MYB-domain genes defines two distinct expression patterns in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol. Gen. Genet.* 261, 660-71.

35 Meissner R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y, Levy A.A. 2000. Technical advance: a high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant J.* 22, 265-74.

Ruan Y.L, Llewellyn D.J, and Furbank R.T. 2003. Suppression of Sucrose Synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation and seed development. *Plant Cell* 15, 952-964.

Schellmann. S, Schnittger. A, Kirik. V, Wada. T, Okada. K, Beermann. A, Thumfahrt. J, Jurgens. G, and Hulskamp.M. 2002. *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21, 5036-5046.

40 Smart L.B, Vojdani F, Maeshima M, Wilkins T.A. 1998. Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol.* 116, 1539-49.

Suo. J, Liang. X, Pu. Li, Zhang. Y, and Xue. Y. 2003. Identification of *GhMYB109* encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium*

hirsutum L.). *Biochem. Biophys. Acta.* 1630, 25-34.

Wagner. G.J, Wang. E and Shepherd. R.W. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann. Bot.* 93, 3-11.

5 Wang E, Gan S, and Wagner G.J. 2002. Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. *J Exp Bot.* 53(376): 1891-7.

Listado de secuencias

- <110> Evogene Ltd.
 - <120> Polinucleótidos y polipéptidos implicados en el desarrollo de fibra vegetal y métodos de uso de los mismos
 - <130> F-13370/EP-SS
 - 10 <140> 05750089.4
 - <141> 14-Jun-2005
 - <150> 60/578,833
 - <151> 14-Jun-2004
 - <160> 126
 - 15 <170> PatentIn version 3.3
 - <210> 1
 - <211> 1086
 - <212> ADN
 - <213> *Gossypium hirsutum*
 - 20 <400> 1
- ```

cccgggatgg atggttattg tagcagaagg gtaatcatgt ttttggtggt tgcatttgca 60
gcaataagca gaggtatgg acaagaatca accactcttg ttcttgcaat catcaccttt 120
ggtgactctg tggtagatgt gggcaataat gactatctcc ctaccatctt caaggctaac 180
tatacctcctt atggacggga ctttgccaac aaaaagccta ctgggagggt ttgcaatgga 240
aaattagcca ctgacatcac tgctgaaact ctggggttta caacttatcc accagcttac 300
cttagcccag aagcatcagg gaagaacctt ctgcttgag ccaatthtgc ttcagctggc 360
tctggctatg atgacaaagc tgccatggtg aatcatgcca tcacattgac ccagcaatta 420
gagtatttca aggaatacca ggcaaagcta gcaaaggtag caggcagcac caaatcagca 480
tccattacca aggatgcact gtatgtattg agtgcaggaa gcggtgactt cctccagaac 540
tactatgtca accctctact taacctgcc tatactccag accagtacgg ctcatctctt 600
attgatacct tcacaaactt cgtcaagaac ctctatgggt tgggagctag gaaaattggg 660
gttacctcac ttccaccggt aggttgcggt ccattagcaa gaacattggt cggttaccac 720
gagaaaggat gcatctccag gttcaatacc gatgctcaac aattcaataa aaagctcaac 780
gccgcagcag ccaatctcca gaagcagcat cctggtctta agattgtggt tttcgacata 840
ttcaaggcac tttacgacat tgttaaatct ccctetaact atggttttgt tgaagcaaca 900
aaaggggtgt gtggaactgg aacagtagag acaaccgcat ttttgtgcaa tccaaaggca 960
ccaggaactt gttccaatgc cagccaatat gtattttggg acagtgttca tccatctcag 1020

```

ES 2 665 463 T3

gctgctaadc aagtccttgc agatgcattg attgttcagg gcattgccct catttgattc 1080

gagctc 1086

<210> 2  
 <211> 1975  
 <212> ADN  
 5 <213> *Gossypium hirsutum*  
 <400> 2

tctagacaag tacagaagct caattcccaa gatggaggcc agcagcagca cctcccatga 60

cccagcattg ttccatgctc ccttgctata ccaccctcgg agaaggagca gcagaccctt 120

aaagggtttc gcagtgataa ttgggtccgt cgttttccta ctctcactgg tcacattaat 180

cgttaaccaa agcccggagc cattagcaag taaccccagt agtgtaacgg aggcagggtc 240

gtattcaatg gcggcgcagc caagagggat agctgaaggt gtttcagcca agtcaaacc 300

atcacttttt gacaaagttg ggtttaattg gacaaacgct atgttttact ggcaaagaac 360

tgcttaccac tttcagcctc aaaagaattg gatgaatgat cctgacggtc cgttatatca 420

caagggatgg taccatcttt tctatcaata caaccctgat tcagccatat ggggaaacat 480

cacttggggc cacgctgtat caacggacct cattcactgg ttctatctcc cactcgccat 540

ggtcctgat caatggtacg atatcaacgg ttgttgacg gggtcggcca ctctcctgcc 600

agatggccga atcgtaatgc tttacaccgg cagcaccaat gactccgtgc aagtccaaaa 660

ccttgcatat cccgccaacc tatctgatcc cctcctcctt cagtgggtaa aataccggg 720

taaccgggtt gttgttcccc caaccgggat cgaagacgaa gagttccgag acccgacaac 780

agcttggtt ggaccgatg gttcctggcg gattgttgtt ggtacaaggt ttaataccac 840

cataggaaca gcccttgttt ttcaaacgac aaacttttcg gactatgaat tattggatgg 900

ggtcttacat gctgttccgg gtacgggtat gtgggaatgt gtagattttt accccgttgc 960

aataaacggg tcggtcggac tggacacgac ggcaactggg cctggaatta agcatgtcct 1020

gaaggctagt ttggatgata cgaaagttga tcattatgca atagggacct acgacatgat 1080

aacggataaa tggacacctg ataaccggga agaagatgta ggcatcgggt tgaaagtgga 1140

ttatgggaga tactatgcct ccaagacatt ttttgatcag agtaaacaaa ggaggattct 1200

ttatgggttg gttaatgaaa ctgattctga agctgatgac ctcgaaaaag gatgggcttc 1260

cattcagaca attcccagga gtgtgttgta tgacaacaag accggaacct atttactaca 1320

gtggcctgtg gaagaagtgg agagcttgag actgaatgct acagtgttta aggatgttgt 1380

agttgaagca ggatcagttg tgcccctcga cataggcacc gctactcagt tggatatatt 1440

agcagagttt gaaatagaga cgttggtatt gaacagcacg gaggatgaag tcagtgattg 1500

ES 2 665 463 T3

cggatgatggg gcggttgata ggagcactta cgggccattt ggggtcctgg ttattgctga 1560  
 tgattcactt tctgagctca ctctatata tttccgtcca cttatacat ccgatgggag 1620  
 tcttgaaact tacttttgcg ctgacgaaac aaggtcttct aaagctcccg atgtcacaaa 1680  
 acgagtgtat ggaggcaaaa ttccagtget tgacgatgaa aactacaaca tgagggtatt 1740  
 ggtggatcat tcagtagtgg aaagttttgg aggaggaggg aggacggtga taacatcaag 1800  
 agtgtatcca acggaagcca tatatggagc agcacggctg ttcttgttca acaatgcaag 1860  
 tggagtgaat gtgaaggcca cactcaaaat atgggagatg aattctgcct ttattcgtcc 1920  
 tttcccattt gaagaaacat tatttcagga aatggttget tccacatgat tatca 1975

<210> 3  
 <211> 560  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5

<400> 3  
 cccgggtgat ggaactgagc attcagaaaa tagaagcctt gattaggcta agtacgatag 60  
 tgatgttggg tttaacagct tgtttaattg ggttgattc tcaaacaag gtcattctt 120  
 acgttcaaaa gaaagcttct ttcaaggatt tgcgtgctct tgttgattg ctgtatatca 180  
 cttcattggc tgctgcttat aatctacttc aactatgctg ttcttcattc tcagcttctt 240  
 acaaaggaac ctgctgcaa tcttacgcat atctggcttg gcttcgttat attttggatc 300  
 aggcagtagt gtacgcagtg tttgcgggaa acctagcggc tttggagcat tcatttttgg 360  
 tattaaccgg agaagagaac ttccaatggc tcaagtggg caataaatat actcgattct 420  
 gcacccaaat cggaggatcc ttgctctgcg gcttcggtgc aagcttacta atgttttcca 480  
 tgcgttccat ctccgattc aacttgttca ggcgtgattc cccaccaag ttcatgcaact 540  
 tgaaactcta atcagagctc 560

<210> 4  
 <211> 1143  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

10

<220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n es a, c, g, o t

15

<400> 4  
 tgtgtataaaa tatgtagaca cagnagatcc aatatatttt cactttcaca gcaaccttct 60  
 tctccactcc tccatctata tatatagtta gaggcagaag ggaggaagtg acattggcaa 120  
 tatggctttg ctgcattctt acttcttaag cgctgggtgag tatgtttcag ggtccacggt 180

ES 2 665 463 T3

cttggcagtg gcaatgtcca ttgcttccta ttttctgata cctatggtgt ttggtggtcg 240  
 ccataaaaaac tggaagaatg caccaccagg ccctgttggt tggcctatcc ttggcagcct 300  
 tccacacctc tccaatcgtc tccatgaaga tttctttgac atggccaagg tctacgggtcc 360  
 cctttttcagt ctaaacttgg gaataaagcc ggccatagtg gtgtcatcac cggaaatggc 420  
 agcccaagtt ttgaaggaaa aggaagggat gttctccagt cggaccataa ccgagaccat 480  
 tcgagtcatc tcttatgatg ccatttccat cattttctcg ccctatggtc ccaggtggaa 540  
 ggttcttcga aggatcttga tcaccgaact actttctcct aaggcctttg aacaatttga 600  
 gccacttctg acctcacagg ttcattggtt getcaagtat ttgtacttgg tctcaaagtc 660  
 caaactcaa gtgaacatag cagaatatgc ttttacagca ctggccaacc tagtgagtaa 720  
 tttcgtctgc tccaaggacc ttttcgacaa ctcaatgcct gaaggaagaa aatgaaaga 780  
 gaggttctgg gagttgataa aggtgattgg gaccccgat ttttctgata tcattccatt 840  
 tgttaaacca tttgatccac aaggccttga agagaaaaat caacaagatc tycggacagt 900  
 tggatgcttt ctatgagaag tatatcgagg agaagtttgc tgacaagga aaagctcaac 960  
 ttgatgggac gataccctac caacggaaaa atggatatgt tagatggtct gttgagttat 1020  
 gagaagaatt gataaaciaa atggggttgg acccgtttac cacaatccta tcgtccaaag 1080  
 gaatgctttt ctgaaaatgg ttaattggca gcgaactgaa aaacaccct caacgcacct 1140  
 ggg 1143

<210> 5  
 <211> 1464  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5

<400> 5  
 cccgggttgt tgatcatggct tctctgcctt tcattcttctt cttatctttc tttataatct 60  
 ccacaacatt gacgtcagcc ggcgcccgcg ccgccaccat caaactctcc ctctctccct 120  
 tccctcacc ttcttctctc catccttacc aaattctcaa caacttagtc acttcttctg 180  
 ttgcaagagc ccaccacctc aaacatccca aagccaaggc cgataaatac acctcttctc 240  
 ttctcagggc tcccctatth tctcacagtt atgggggcta cactatctcc ctcaaatttg 300  
 gaactccgcc tcaaaccctt ctttctgca tggacaccgg gagcagcctc tcttggttcc 360  
 cttgcacctc tcgttacctt tgttcccaat gcgcattccc caatggtgac cctgcaaaaa 420  
 tccccacttt tgcccctaaa ctttcatctt ccagtaagct cgtagggttg agaaacccca 480  
 agtgtagttg gctttttggc cccgacgttg agtctcgttg ccaagactgt gaaccactt 540  
 ccgaaaactg cactcaaacc tgccctcctt acataattca atacggttta ggttccactg 600

ES 2 665 463 T3

ctgggcttct attagtagaa aaccttgctt tccccagaa aaccttcaa gatttccttg 660  
 tcggatgctc catcctctcc aaccgacagc ccgctggaat agccgggttc ggtcggagcg 720  
 ctgagtctat accctcccaa ttaggcctca agaaattctc ttactgtctc gtttctcgcc 780  
 ggttcgatga cactggcgtc agcagcaaca tggtgttga aaccgggtcg ggttccggtg 840  
 atgccaagac cccaggcctt agctacacac cgttttacag gaaccaagtg gtttcaaacc 900  
 cagttttcaa agagttctac tacgtaactc tacgtaaaat tctgggtggc gataagcagc 960  
 tcaaagttcc gtacagttat ttgggtcccag gatcagacgg taacggtggc accatagtgg 1020  
 actcgggatc aacattcact tttatggaga gaccagtgtt cgaggtagtc tcgaaagagt 1080  
 tcgagaaaca aatgggaaat tatagaagag tgcgtgaaat agaaaacaga tcgggtttag 1140  
 ccccatgctt caacacttcg ggctatactt caatagaaat ccccgattg agtttccagt 1200  
 tcaaaggagg agccaaaatg gcattgcctt tggttaacta tttctcattt gacggtgatg 1260  
 ataaggttgt gtgtttgatg atcgtttcaa acaatgtggt cggccaaggc tcacacagcg 1320  
 gtcttgcaat aatactaggg agctttcagc agcagaatta ttacatcgaa tttgatatcg 1380  
 caaacaatag gtttgatgg gctgaacgaa gctgtgcgtg agctgcactt tgttattttg 1440  
 tgttttgccc atgaatatga gctc 1464

<210> 6

<211> 1402

<212> ADN

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 6

cccgggaaaag gaaatggcag gcgtcgaagc agggaaggag gaggaggcga ccgctgtgag 60  
 aatcaccgga aaaagccagc tcaagccggg taagttgata ggaagaaaag agtgtcagtt 120  
 ggtcacattt gatctcccct acctggcttt ctattataac cagaagctgc tgttttacia 180  
 gaacgacggg ggtggtgagt tcgaggacia ggttgaaaag ctcaaggag ggctgagggt 240  
 ggtgttagag gagttttatc agctaggagg taagctcggg aaagatgacg atggggttct 300  
 tagagttgat tatgacgatg atatggatgg tgttgaagtg gtggaagccg tggcagaggg 360  
 gattaccgtc gatgaattga ccggtgatga tggtacgagc tcatttaagg aattgatacc 420  
 ttttaaatggc gtcttgaact tggagggctt tcacaggcct cttttgtcca tacagttgac 480  
 gaagttgaaa gatggtggtg caatgggggtg tgctttcaac catgccatcc tcgacggaac 540  
 ctccacttg ctttttatga gctcttgggc tcaaactctgt aacgggtactt cgagctccgt 600  
 cgttgtgccc ccgtttcttg atcggaccac agctcgaaac acccgctga agctcgacct 660  
 cagtccggtt gtttctgca acggcgacga cgccacaaa caaggccagc cggcggcgca 720

ES 2 665 463 T3

gatgagggag aaactcttcc gtttttccga agccgccgtc gataagatca aatcgagagt 780  
 taattcaacc ccaccaccgt ccgatggctc taaaccgttc tcgactttcc aatctctagc 840  
 tgtccacatt tggcgacacg tatcccaagc acgtaacctt aaaccogaag actacacggg 900  
 ttttactgtc ttcgccgatt gtcgtaaaag ggttgatcca ccgatgcccg acagttactt 960  
 cggaaaacttg attcaagcca tcttcaccgc cacagcggcc gggttggtat tggaaaaccc 1020  
 accgtcattc ggagcttcag tgatacaaaa agctatagaa tcccacgacg ctaaagccat 1080  
 cgatgaacgt aacaaggcat gggaagcagc gccgaagatt ttccagttca aagacgccgg 1140  
 tgtcaactgc gtagcggctg gaagctcccc gaggtttaa gtttacgaag tggatttcgg 1200  
 gtggggaaaag ccggtagggg tgaggagtgg atccaacaac aggttcgatg gaatggtgta 1260  
 tttgtatcaa gggaagagcg gtggccggag cattgacggt gaaatcacca tggaaagctca 1320  
 agctatggag aaattggaga aggataaaga gtttttaatg gaagtatagt attttgcag 1380  
 gaagtagggg actgtggatc tc 1402

<210> 7

<211> 1480

<212> ADN

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 7

cccgggtacc attactctac tacagctget atcattacta catacatgtc cacccaaagt 60  
 cgagcagttg gcggcaccga gcacaactgg tgccgagcgg tggtcggggg aaccgggata 120  
 gccgtcttgg ctatcatttc ttccaaaaac cccgacgttt cacatcttaa aaatgccctc 180  
 cacaagctcc aaatctccca tcccattctt aggtctcgcc tccattacag tcctactgcc 240  
 aacagttact ccttcgttac ctccccctcc cctttcattc aaatcaagta ctttaacccat 300  
 tctacaactt gtcaaatcct tgaaaacaac caaaacatct cacccttca tttgattctc 360  
 gaacacgagc ttaaccaaaa cgcttgggtt agttcttcat gtaccaccaa acacgacgtg 420  
 tttttcgcca gtgtttatgc cttgcctggt gcaacaaggt ggggtgttgg gctccgccta 480  
 catgcggtg cttgtgaccg gaccacggcg gtgtcgttgc tgagagagtt gttgacgtta 540  
 atggctattg aggaggagga aacagggttt cagcaaggct aaaaagaaat tacgatgaac 600  
 aaaggagaga tcagtttggc catggaagat attcttccaa aaggcattgt taagaaaaca 660  
 ctttgggcac gaggagtgga catgctaagc tactctgtta attctttaag gttcacgaac 720  
 ttgaggttca aagatgccaa atctcctaga tctactcaag tagtgagggt gcttatcaac 780  
 cctgatgaca ctcagaagat cttgactggt tgcaaggcaa gagggattaa gttatgtgga 840  
 gcattaggag ctgccgggct gatttctgca cacagttcta aaagccgttc agatcatcaa 900

ES 2 665 463 T3

aagaagaaat atggcgttgt aacactcaca gattgccgct caattcttga acctccgctc 960  
 tccaatcacc atttcggttt ttaccactca gctattctga acacgcacgc catcaaagga 1020  
 ggagagaagc tttgggagct agcagagaaa gtgtacaccg tatttacaca ctacaagagc 1080  
 tgcaacaagc acttgtcaga catggcagac ctgaatttct taatgtgcag ggccatggag 1140  
 aaccctggct tgactccatc tgcctcattg aggacatggt tgatatcggc cttcgaggat 1200  
 acggtgatag atgagtctag taaccagcaa aatcaagtcg gcgtagagga ctatatggga 1260  
 tgcgcttccg ctcatggcat cgcgccgtcc atcgcgatat tcgacacatc acgagatggg 1320  
 cgactggatt gcatttgcgt ttatccttcg ccgttgcatt caaggaaca aatgcaggag 1380  
 ctggttgata atatgaagtg catacttctg gatgcagggg agaatggtgc tgatgaaact 1440  
 gagagttaag gagccagtct ggtccttctc tgttgagctc 1480

<210> 8  
 <211> 720  
 <212> ADN

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 8

acccccgggc aagtgatcaa agagaatggg aagaggaaaa atagagataa agaggatcga 60  
 aaacacaaca aatcgtcagg ttaccttttg caaacgcagg aatggcctgc tgaagaaagc 120  
 ttacgaactg tcagtcctct gtgatgctga agttgctctc attgtcttct ccagtcgagg 180  
 ccgtctgtat gagtactcca acaacaacat aagatcaaca atagacaggt acaagaaggc 240  
 ttgctcagat acttctaaca caaacactgt tactgaaatc aatgctcagt attatcaaca 300  
 agaatcagcc aagttgagac agcagattca aatggttacag aattctaaca ggcacctaat 360  
 gggagattcc ttgagttcct taactgtgaa agagttaaag caggtagaaa acaggcttga 420  
 aagaggaatt actaggatca ggtccaagaa gcacgaaatg ctactagctg aaatagagtt 480  
 tttgcagaaa agggaaatcg aattggaaaa tgaaagtgtt tgtctccgaa ccaagattgc 540  
 agaaattgag aggcttcagc aggcaaacat ggtgactgga cctgagctta atgctattca 600  
 agcttttagct tctcgaatt tctttagccc caatgtcatt gagcatccat ctgcttactc 660  
 ccatctctct gacaagaaga ttctccatct tgggtagagg agttggagaa agagctcatg 720

<210> 9  
 <211> 973  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

10

<400> 9

cccgggtccc tattgcatgc ctttcaattt gatttcatgg atgtaacaag cacaccaa 60

## ES 2 665 463 T3

```

agaaaagaaa tggatcggat caaaggtcca tggagccccg aagaagatga cttgctccag 120
cagctggtac agaaacatgg ccccagaaac tggctcttga tcagcaaadc aatccccggc 180
cgatccggta aatcctgtcg gctccgatgg tgcaatcaac tgtcaccgca agttgagcac 240
cgtgccttca ccccggaaga agacgagacc atcatccgag cacatgccag gttcggtaac 300
aagtgggcca ccatagcccg actcctcaac ggccgtaccg acaacgccat taaaaaccac 360
tggaaactcca cgctaaaacg taagtgttg cgggttggg aagagtgtaa tttcgttget 420
aatggagggt atgatggtaa tctgggagga gaggaacggc aaccgttgaa aagatcgggtg 480
agtgctggtc tatacatgag tccagggagc ccatcgggat cggatgtgag cgattctagt 540
gttcccgtct tatcatcttc ttacgtgtac aagccgatcc caaggaccgg cgggtgttaac 600
gttgatgtaa atgttacgcc agctggagtg gaagcggcat catcttcaa cgatccaccg 660
acctcactga gtctgtcttt accgggggtg gagtcatgtg aggtggtgtc aaccagcca 720
ataacggagt caactcagaa tcggagttaa gaaaggggag gtgggggtgat gggtttcagt 780
gcgaggttta tggcggatgat gcaagagatg ataagggttg aggtgaggaa ttacatgacg 840
cagatgcagc aacagcagca gcagcaaac ggcgagttc cgggaggagc gggaatgggg 900
atgtgtttgg atggggggtt caggaatctt atggctgtga acccagtcgg gatgagtaag 960
atcgagtgag etc 973

```

```

<210> 10
<211> 1861
<212> ADN
5 <213> Gossypium hirsutum

```

```

<400> 10
cccggggata gagagatggg aggtccaccg tacgattgct tggcgaatcc cctaggagcc 60
gtccgattaa cattcgagaa ggcaatatgg tcagaatcgg agactcctcc gatccatccc 120
tccgccttta acggcaaaga ttgggggtgcc cttgaactct tccgccactt cctcttcaa 180
ggatcagggc tttcccagg tcccatcctt aatccccaaa cattaagatg ggttcaacc 240
aacagtcttg tacgttaccg tggatgatc caagacatgt tgggaaatga attctatgcc 300
ggcgcttaca aggatggaat tttatggcgg accaacaat tcatggatgt ttctcaatac 360
ccaatgggtt cctctcctga tatgtgtatt tgggaacgcc gcttgetcta ctgtgttct 420
gtcccaggac agaattcatg gactgaacct tctagtgaat tggaacctaa ttggtcatct 480
caaaccaggg agaagcggcg taggatggat gacgaagata atgatcccat ggatttggtt 540
cctgatgatg agattaaaag ctctccaatt accaagaaga tgagagaaga tggacttct 600
tccccttac aatccaggga tactaaaact acaagctctt cttctatcac aagtacattt 660

```

ES 2 665 463 T3

caatctgttg acgaagataa ccttccttgc ctagtcaaga tatatgattc tccagaatca 720  
 gaattgaagc tgaatgatgt ttttgaatth attgggtcc tcaacttttga ttcagagctt 780  
 gcagttgaga aagatgacaa tgatgagtta tcaaatagtt tctatgatga tgccctggtc 840  
 catttgcccc ctaataaggt cctcgccttg cactgtctta tacataggaa gcttgcaagt 900  
 caggactttc tgccagggtc cccaataata gagccaaagc cacatttggg gaaagagaca 960  
 agggaagctc tgttcaggca tcttacggct gttcttggaa atgatgaggt agctgctcat 1020  
 ttcgtgttgt tgcatcttct gtccaaggtt catgctcgag tagatgatgt tgcagtgggg 1080  
 aagctgtcac tcaatctaac aggtttaaac aaagaaagtg tatctgtggt tggtaactcga 1140  
 cttagtgata cattcaaaaa cctcctacca ttcacgaatt gcatgcctct cactactggaa 1200  
 tatctgaaca ttgcctcgct tgccccgcaa aaggattatc aagccaacag attggttcct 1260  
 ggcgttcttc agtaccgga gggctcacac ttgatgtag acgagaccg actagaatca 1320  
 ggaagcctca attctactgg aattgagaat acaaagttgc tgaaaaatct catcgagttt 1380  
 caaaaagtgg agtatgactt tcaatactat aaagtggaaa tggcaacgga tgtccagtta 1440  
 cttatcttct cggaggggaa atctaataat gttcctgctg atgttattgt accttttcaa 1500  
 ccttcttgtc ttgaatccac tgaaatgcca gttgctgagg cactagaagc ttggagatgg 1560  
 tacttggeta ctgtagatc attaccacat tccattggat cagaaataca gaaggtggta 1620  
 gaagatgatt tggttgcagc aagacaaatg gatcggagct tgggaagtcg agattttagc 1680  
 agatggttga cgatggctcg gctcatatcg tcaagtttcg gagaaaccag tttgtcaaag 1740  
 gaacattggg aaatggccaa agaaatggag aggctaagga gggagagact gaaatagaat 1800  
 ccaaaagtcc acaagattht gaagctttgg tattttgtaa atgattgttg cccagagct 1860  
 c 1861

<210> 11  
 <211> 917  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5

<400> 11  
 aaacaacatt tgtgtttcaa aaaaaactaa tccatatact gcaaaatcct tgtgcatctt 60  
 cttcaaagca aacagcaaca actccaacaa atgtccatga aaaaagaagg tgaaattcta 120  
 tacaaaaagg gattatgggc aatggaggaa gacaagttac tcattgatta tgtcaatgtc 180  
 catggaaaag gacaatggaa caaatagcc aacagaacag gtttgaagag aagkgggaaa 240  
 agttgtcggc taaggtggat gaattacctg agtcctaacg ttaaaaaggg tgatthttct 300  
 gaagaagaag aagacctcgt cattagactt cataagctct tggaacagc tgggtctttga 360

## ES 2 665 463 T3

```

ttgcgaaacg agttccaggt cgaactgaca atcaagtcaa gaattactgg aatagtcatt 420
tgaggaagaa actagggatc attgatcaaa acaagacaag gatcgatttt tgtcaaagtt 480
caaagcaagt caaagtgtgt catgttgatg aggcagccac ggatccaagt cctggacatg 540
gaacaaccac tgaaaccacg ggtataacag tggatcagag taaccagcas gaagtcattg 600
atcatcgggt cttaaacaat actactcaag aatcaatgac cactgagark tatatcaaca 660
ctttctggat tcctgaccat gattatgagc taagtacact tgccatgatt gaccacttcc 720
atgaatgkfc tyyttttcay cttarctaga gactatgtta ttarattcgg gttttatfff 780
tagatataag tattcatcta acatggcaat gttaaatttt tcaaaagatt tttcatgtat 840
ttgagcagtt catgtgtttg aagattaaga tatatctgaa acaaatgcca caatcaaaat 900
aaccattatc gaattta 917

```

```

<210> 12
<211> 2024
<212> ADN
5 <213> Gossypium hirsutum

```

```

<400> 12
ccccggcatc tgatctaatt gttggtggac acacacacac acacacacac acacacatac 60
atgtagcttt tagctttgaa atgtctactg gagttcaaca tcaagagaga gtaccaatga 120
acctgaagaa acaacttgct cttgctgtga ggaacattca atggagttat gcaatfffct 180
ggtccatata aactagacaa ccaggggtgt tagaatgggg agaaggttat tacaatggag 240
atataaagac aaggaaaaca gttcaatctg tagaactcaa cactgaccaa ttgagtttac 300
agagaagtga gcaactgaga cagctttatg agtctctttc agctggtgaa agcagtcctc 360
aagctaaacg accttcagca gcattatctc ctgaagatct tactgatact gaatggatt 420
acttggtttg tatgtcattt gtattcaaca ttggccaagg attacctgga agaacattgt 480
ctactggtca acctgtttg ctttgtaatg ctcatgtgfc tgacagtaaa gtgtttggtc 540
gttcactact agctaagagt gcatcgattc agactgcagt atgctttccg ttttcaggag 600
gtgtggttga gctcgggtg actgatttg tatttgaaga tttgagcctc attcagcgcg 660
ttaaaacttt gctcttgat gatccacagc cgattgtttc taagagatcg attcaagtcg 720
atgggatgaa caacgatctt gcttgtccag ctcttgatcc tttgatcctt gccaccaaat 780
tgagtccaat attaggctgt gaacaactag aaacggtttc tcctgatgat agtccggacg 840
gcttggagcc taagcaatca agagaagatt cattattgat tgaagggata aatggtggag 900
cttctcaagt acaaagttgg caattcatgg atgaagagtt ttgcaattgt gttcaccatt 960
ccttgaattc aagtgactgc atatctcaaa ccattgcgga tcatcgaaag gtcgttcctc 1020

```

## ES 2 665 463 T3

```

tttaccgggg agaaaatgat aatggtttgc aagatgttga agagtgcaat cagactaaac 1080
taacatcttt tgatcgccaa aacgatgatc ggcacttcca tgaagttctc tcggccttat 1140
tcaagagctc acaccggttg attttaggac cacagtttcg aaactctaac aaggaatcga 1200
gctttatcag atggcagaaa aatggcttgg tgaagcctca aaaagaaaga gatgaaaccc 1260
ctcaaaagtt actgaagaag atattgttct tggttcctca tatgcatgat agaggattga 1320
ttgaatctcc tgaaactaat gctgttcgag atgcagcttg gagacccgaa gctgatgaaa 1380
tttgcgaaa ccatgtgta tcggagagga agcggaggga aaaaataaac gaacgactta 1440
tgatggtgaa atcacttgtc cctgcaaata acaaggctga caaggttct atactagatg 1500
tcacgataga atacttacia accctcgaaa gaagggttgc ggaattggaa tcttgcagaa 1560
agtcagaagc aagaacgaaa atcgagcgaa catcagataa ctacggcaat aataaaacca 1620
acaacggaaa gaaatcgtcc ctaagtaaaa ggaaagccta tgatggtggt gatgaagctg 1680
atcaagagat cggctatggt gcatctaaag acggttcaac agataaagtt actctcagta 1740
tgaacaacaa ggagcttcta atcgagttca agtgtccatg gcgagaagga attttgcttg 1800
aggtaatgga tgcattaagc attctcaatt tggattgcca ctcaagttcag tcatctacca 1860
ctgaggggat tctctccctg accataaaat ccaagtacia aggatcaagt gttgcaaaag 1920
caggaccaat cgagcaagca ttgcaaagaa ttgctagcaa gtggtgaagc tatttgttct 1980
agatthtacc agthtcttht gtaagatccc atgtcataag gtgc 2024

```

```

<210> 13
<211> 810
<212> ADN
5 <213> Gossypium hirsutum

```

```

<400> 13
cccggggcta gctcttactc aatggcaac caaaacgatg atggtgcaaa tatttccact 60
tttcttcttt ttgttcagtg tctgcaactc cattttcctt ggtgctaagtg gagatgacia 120
tggtggttgg caaactgcc atgccacctt ctacggtggt gctgatgcta ccggcacaat 180
ggggggagct tgtggttatg gaaacctgta cagtcaaggg tatggaacga gcacagcagc 240
tttgagcact gcacttttca acaatggctt gagctgcggt gctgctacg agctccggtg 300
caacaatgat cctcaatggt gcattagtcg aaccataacc gtgacagcca ccaacttttg 360
tccacctaac tatgctttat ctagtgacia tggcgggtgg tgcaatcccc cacgagaaca 420
ctttgatttg gccgaaccgg cattcttgcg gatagcagaa tatcgagctg gaatcgtccc 480
tgttatgttc agaagggtgt catgtgtgaa gaaaggaggc atcaggtaca ccatgaatgg 540
acattcgtac ttcaacatgg tgttgataac gaacgtggga ggggcagggg atataacgtc 600

```

## ES 2 665 463 T3

```

 agtgtccatc aagggttcca gaacaggatg gctacctatg tccagaaatt ggggccaaaa 660
 ctggcagagc aatgcttacc ttaacggaca aagcctctct tttaaagtga ctgccagcga 720
 tggcaggact atcacagcct acaatgtagt gcctgctggt tggcaattcg gacaaacttt 780
 tgaaggaggc cagttttaag acaagatata 810
<210> 14
<211> 21
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
<400> 14
 acctccatg acccagcatt g 21
10 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
<400> 15
 ccagcaacca ttgatatcgt ac 22
<210> 16
<211> 398
20 <212> ADN
 <213> Gossypium hirsutum
<400> 16
 cccgggtaca aacatggcta gttccggtgt ccttaagttg gtttccatga ttctcatggt 60
 gtgcatgacg atgatgagtg cacccaaggc agccaaagcc gccatcacgt gcagcgacgt 120
 ggtgaaccac ttgatcccgt gcttgtccta cgtacaaaac ggcggtacac ccgctgctgc 180
 atgctgcagt ggggtaaaag cactctacgg cgaggttcag acctccccgg accgccaaaa 240
 cgtgtgcaag tgcataaat cggcggtgaa cggaattccg tacaccagca ataacctcaa 300
 tctcgcagcc ggctacctg ctaaagtgg tctccaactc ctttacagca tcagcccctc 360
 cactgactgc aacaagggtg agtgaggttg atgagctc 398
<210> 17
25 <211> 1223
 <212> ADN
 <213> Gossypium hirsutum
<220>
<221> caract_misc
30 <222> (1015)..(1015)
 <223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> caract_misc
35 <222> (1098)..(1098)
 <223> n es a, c, g, o t

```

ES 2 665 463 T3

<220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (1158)..(1158)  
 <223> n es a, c, g, o t

5 <400> 17

```

agctgaacac cccaaagatg gccaaaccaca ccrytacctt tctccctaaa ctatccattg 60
aagctatkca gacagtgact ccgatgagga taactgaacc acgacagaca cgacaagtat 120
tggcagggga gcttgtagga cctgggattt tccaaagggtg tttgaacgtg gtccagtatt 180
acatgaagga gaaagaagaa gactctgggtt ggttattggc tgggtggatc aaggaaacac 240
ttgggagagc tttacatgag caaccaatga tttctggtcg tcttcggaaa ggggaacgaa 300
acgatggaga attggagatt gtttccaatg attgcggcat tagactcatt gaggcaagga 360
ttcagatgaa tttgtcggat tttcttgatt tgaacaaaag ggaagatgct gaagctcagc 420
ttgttttctg gaaagatatt gatgaacaaa acccacagtt ctccccctc ttttatgttc 480
aggttactaa tttccagtgt ggtggatatt caattgggat tagctgcagt attcttctag 540
cagatctttt gttaatgaaa gagttcctta agacatgggc agatattcac aacaaggtta 600
ttatcaacaa aaacgatgaa caaaagcttc ctttattcta ccttctctgt ctgaaaaaca 660
ccaatgggtgc ctccctaac atcatcacct caaattcaag caaaaactca gccaaaacca 720
tgattttcca gatccatgct gaaactgaaa gtccaggagag tgactgggtgc aggaaaatgg 780
cattagcctg tctggaggaa gccgagagca acctargaag tgttgtgggt ggagaatttt 840
ccttgtttgt gaacgaatcg tttgagtcca tcaaagttga aagctgctca aagcaagga 900
tgtcvaaaga agcagagatg ggagtcttga atcgtgcaaa atgggatgat ttgggggcta 960
atgaagttag ttttgagat ggaataaac ctgcgcatgt ttcgtattgg cttanatcga 1020
cgttgggtgg gcytgcatt kgtattsctt sgctsagga ggaaaatgca ctgtgaatat 1080
cattggcaca gttcctgnca atgggagggg gcattgaact atcagctggg atggaaatgc 1140
tatagaaaga aagagganat gctgatgatg ggtgcctttg ttgggccttg aatctttgga 1200
cgttggcaag ctagaggtgc ttt 1223

```

<210> 18  
 <211> 1768  
 <212> ADN  
 <213> Gossypium hirsutum

10

<400> 18

ES 2 665 463 T3

ttatagtacc ggatactgcg cacgacacaa gccgaattca gcacgatcgt tgaaaaaata 60  
 tgggtttcca aagaaacata ttgggtttcc ttttattgat attggcttca ctaacaagcc 120  
 tctcttctag ccttcctagt gaatactcca tagtggaaaca tgagattgac gcatttcttt 180  
 cggaggaaag ggtgttgag atcttccaac agtggaaaga aaagaatcag aaagtgtacc 240  
 ggcaagccga ggaggtgag aaaaggtttg aaaatttcaa ggggaatttg aagtatatcc 300  
 tagagaggaa tgcaaagaga aaagcaaaca aatgggaaca ccatgtggga ttgaacaagt 360  
 ttgctgatat gagcaatgag gagttcagaa aagcttactt gtcaaagggtg aaaaagccca 420  
 tcaacaaagg gataaccctg tcaaggaaca tgaggagaaa ggtgcagtct tgtgatgcac 480  
 cctcctcctt gaattggagg aactatggag ttgtgactgc tgtcaaggac caaggttctt 540  
 gtggaagttg ttgggcattc tcatcaaccg gagccatgga aggaatcaat gccttagtta 600  
 ctggagacct aattagcctt tcagaacaag aacttgtaga ttgtgatacc agcaactatg 660  
 ggtgtgaagg aggatacatg gactatgctt tcgagtgggt tataaacaat ggcgggatcg 720  
 atagcgaaac cgactacccc tacactgggtg tggatggcac atgtaacacc accaaggagg 780  
 aaaccaaggt tgtatctatt gatggctatc aagatgtaga gcaatcagat agtgctcttt 840  
 tatgtgccgt tgctcagcaa cctgttagtg tgggaattga tggttccgcc attgattttc 900  
 aactttacac tgggtgaatt tatgatggga gctgctcgga tgatccagat gacattgatc 960  
 atgctgtttt aatagttggt tatggttcag aaggcagtga agagtattgg atagtgaaga 1020  
 attcatgggg aacaagttgg gggatagatg gatatttcta tctaaaaaga gacactgatt 1080  
 taccatatgg tgtttgtgct gtcaatgcc a tggcttctta tccaactaaa gaatcctctt 1140  
 caccatcccc ttatccatcg ccaagtgttc ctccaccgcc acctccttca actccaccac 1200  
 caccaccacc tccatctcct tcaccaagtg attgtggaga cttttcctat tgttcaagtg 1260  
 atgagacatg ctgttgctt tttgaattct atgattattg cctaataatac ggctgctgtg 1320  
 aatatgaaaa tgctgtttgc tgtaccgaa ctgaatactg ctgccctagt gattacccca 1380  
 tttgtgatgt ccaagaagga ctctgcctca agaacgctgg agactatctg ggagtagcag 1440  
 ctaggaagcg aaaggtggct aaacacaaat taccatggac taaaatagag gaaacagaga 1500  
 taacatatca gcctctgcaa tggaaaagga acccctttgc tgcaatgcgt tgaaaaaagt 1560  
 gaaaaattac atatcatctc ttaaaccttg aaggttgttt tcacctttt tctttttctt 1620  
 tcatttttgc tttttcattt ccagcaagca aatccatgca gataagacta agaaaggggc 1680  
 atatttgttt agatgatgca tttgaatttg gaaactgtgt ttgtcattct tcaccagtgg 1740  
 ggtataaaaa ctactatgct tttgttta 1768

<210> 19  
 <211> 1027  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

ES 2 665 463 T3

<400> 19

tctagatgaa ggttctctcc ccaattcttg cttgcctagc gcttgctgtg gtggtaagcc 60  
atgctgctct ctcacctgag caatattgga gctataagct gccaaatact ccaatgccaa 120  
aggctgtcaa agaaattcta catccagaac tgatggagga gaaaagcacc tctgtaaag 180  
taggaggtgg tgggtgaaac gtcaatacag gaaaagggaa gcctgggggt gacacccatg 240  
tgaacgttgg aggcaaagga gttggagtga acacgggaaa gccaggggggt ggcaactcatg 300  
tgaatgttgg agaccctttt aattacctat atgcagccag tgaaactcaa atccatgaag 360  
acccgaatgt ggctcttttc tttctggaaa aggatatgca ccccggggca acaatgagcc 420  
tgcatttcac tgaaaataca gagaaatcag ctttcttacc ttatcaaact gcccaaaaaa 480  
taccgttttc atctgacaag ttgccagaaa ttttcaacaa gttttcagtg aaacctggat 540  
cagtgaaggc agagatgatg aagaacacaa ttaaggagtg cgaacagcca gcgattgaag 600  
gagaggaaaa atattgtgca acctcactgg agtcaatgat tgactatagc atttccaaac 660  
tagggaaagt tgatcaggca gtctcaacag aagtggaaaa acaaacccca atgcaaaagt 720  
atacaatagc agctggagtg cagaagatga cagatgacaa agctgtagtg tgccacaagc 780  
agaattatgc atatgctgtc ttctattgcc ataaatcaga aacaacaagg gcttacatgg 840  
ttcctttaga ggggtctgac ggaacaaaag ccaaagcagt agcagtctgc cacacagata 900  
catcagcatg gaaccctaag catttggtt ttcaagtctt aaaagttgaa ccaggaacca 960  
ttcctgtctg ccatttcctt cctcgggatc acattgtttg ggtccctaag taaaaatcct 1020  
ggagctc 1027

<210> 20

<211> 942

5 <212> ADN

<213> *Gossypium hirsutum*

<400> 20

cccgggcata cagagatgga gaggcaaaga agcaagcagg tttgtttggt gatgtgggtt 60  
ttggttgctg cttttttctc ccacaatagg gtcatcgag tgacctccac tggccttgg 120  
gagcagaaaa actactatcc agctcctgac cctcatgctg gaactcccc ttcaggttca 180  
catggcacac caccatcttc aggaggtgga tcacctcct ctcattggaac cccgtcacat 240  
ggaggtgggt accacccttc accaacacca tcaacgcctt cgggtggaaa ttgtggaact 300

ES 2 665 463 T3

ccccacatg acccttcaac tccatcaaca ccatcacaca ctctctctca tggtaactcca 360  
 ccatcatctg gagtggttag tccccatcg tatggaggag gcagtcccc atcgtatgga 420  
 ggaggcagtc ccccatcgta tggaggaggc agtccccat catacggagg tggcagtccc 480  
 ccatcatatg gagtggtcag tccaccaact actcccattg atccaggaac tccaagcatt 540  
 ccctcacctc cattctttcc tgctccaact ccaccaattg gtggtacatg cgatttctgg 600  
 aggagtcacc ccacactgat atgggggtctg cttggttggg ggggcaactgt aggcaacgca 660  
 tttggcgtga ccaacgctcc tggacttggg acaagcatga gcttgcccca agcactttca 720  
 aacacacgta ctgatggact tggggcgctt taccgggaag gaacagcctc atttctcaac 780  
 tccatggtga ataataggtt cccatttctg actaagcaag tcagggagac ttttgttgca 840  
 gcacttgggt caaacagcgc tgcagcagct caggctcgtc tcttcaagct tgccaatgaa 900  
 ggccacctca agccaaggac ctaagcaaac acctttgagc tc 942

<210> 21  
 <211> 627  
 <212> ADN

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 21

cccgggagaa agatgatgaa aaggggtttt attgttttgg ccttgacggt ggttttcgcc 60  
 ggcagcgggtg ttacggcggc tgacgagagt gggtttagcga atgagtgcag caaagatttc 120  
 cagagcgtga tgacttgctt aagctttgct caaggaaaag cagcgtcgcc gtcgaaggag 180  
 tgttgtaatt cagtggcggg gattaaagag aataaaccca aatgtttgtg ttatatattg 240  
 caacaaacac aaacttccgg tgctcaaaat ctcaaaagct taggtgttca agaagataag 300  
 ctgtttcagt taccgtcggc ttgtcaattg aagaacgcta gcgtcagtga ttgcccaaag 360  
 cttcttgggt tatctccgag ctaccagac gccgccatct tcaccaactc ctctctaaa 420  
 gcaacgacac ccagtacttc aacaaccacc gcaacgccgt cttccgcgcc cgataaaacc 480  
 gatagcaaat ccagtggaat caagcttggg ccccacttcg tcggttccac ggcggcgcta 540  
 ctggttgcta cagcggccgt gtttttcctt gtattcccag ctggatttgc ttcaatagtt 600  
 taggggtttt gcatgggatt tgatatac 627

<210> 22  
 <211> 2012  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

10

<400> 22

cccgggcggc aacttaaaag aaaacctttt ctttctcat tgttttacta ctaaaatccc 60

## ES 2 665 463 T3

|            |             |             |            |             |             |      |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| ataatgccgg | tcgtggattt  | tgtctgtgtt  | tttttagttt | cagttgtgat  | gtttaatttg  | 120  |
| agagtaagca | cagaaccagt  | tgaagacaag  | caagctctac | ttgctttcat  | ttcgggaatt  | 180  |
| agacatgccg | accgggttaa  | atggaattca  | tcgacctcag | cctgtgattg  | gttcggtggt  | 240  |
| caatgcgacg | ccaaccggtc  | tttcgtctac  | actttacggc | tccccgggtgc | ggcccttatac | 300  |
| ggttcgattc | cgccaatac   | aatcggtcgg  | ttgaaccgac | ttcgagtttt  | aagtctacga  | 360  |
| gcaaaccggt | tgtccgggtga | gatccctgcc  | gatttctaca | atltgactca  | gctgcgtagc  | 420  |
| ctttatttgc | aaggtaacga  | gttcaccggg  | ccgttcccac | ctagtgtgac  | tcgtttaact  | 480  |
| cgtttgactc | gccttgatct  | ttcttcta    | aatttcaccg | gtccaattcc  | tttgggtgtc  | 540  |
| aacaatttga | ctcagttgac  | cagactcttc  | ttgaaaata  | acaagttttc  | cggttctctc  | 600  |
| ccgagcatcg | actcggacgg  | tttaaacgat  | ttcaatgtgt | ctaacaacia  | ccttaaagggt | 660  |
| tcaatccccg | actcgttatac | taaattcccc  | gaatcttcat | tcgccggaaa  | cattgggctt  | 720  |
| tgcggcggtc | cacttcggcc  | atgtaaccca  | tttctccat  | ctccatctcc  | gactgagccc  | 780  |
| attccgcca  | aaacttccgg  | tcaaagctcg  | aaaagccttc | ccaccggcgc  | catcattgcc  | 840  |
| attgccgtgg | ggtcagcaat  | tggtgcgtta  | ctgttattac | tattcctcat  | tatctgcttc  | 900  |
| cgtaaagtga | aacggaagtc  | accgagggcg  | cagaaggcga | taccatcgac  | gacacatgca  | 960  |
| gttccgggtg | aggaggcggg  | gacttcctcg  | tcgaaagatg | atataaccgg  | aggctcaacg  | 1020 |
| gaaatcga   | ggatgatgaa  | taataagctc  | atgttcttca | aagggtggcgt | ttacagtttc  | 1080 |
| gatttgagg  | atltgatgag  | ggcgtcggct  | gaaatgttg  | gaaaaggcag  | caccggaacg  | 1140 |
| tcgtacaggg | tggttttagc  | ggtggggacg  | acggtggcag | ttaaacgggt  | gaaagacgtg  | 1200 |
| gcggttagta | aacgagagtt  | cgtaatgaag  | atgggaatgt | tgggtaaaat  | catgcatgaa  | 1260 |
| aacgtggttc | cgttgagagc  | tttttattat  | tccgacgagg | agaaattgct  | ggtttatgat  | 1320 |
| tacatgcatg | gtggaagctt  | gtttgcgctg  | cttcacggta | gcagaagctc  | ggctcgtaca  | 1380 |
| ccgttagaat | gggacccccg  | gatgaaaata  | gccctaggcg | tggctagagg  | cctcgcgcac  | 1440 |
| ctccacagtt | cacaaaacat  | ggtccacggc  | aacattaaat | cttccaacat  | ccttctccga  | 1500 |
| ccagaccacg | aagcctgcat  | ctcagagttc  | ggtcttaact | ctcttttcaa  | caccaacact  | 1560 |
| ccacctagtc | gcatcgcggg  | ttaccaagca  | cctgaagtaa | ttcaaaccca  | taaagttacg  | 1620 |
| gtgaagtcag | acgtttatag  | tttcgggggtg | ttattattgg | aattattaac  | cggtagggca  | 1680 |
| ccaatccaac | catcaataac  | tgaagaagcg  | ttcgatcttc | cgcgttgggt  | ccaatccgtg  | 1740 |
| gttcgggagg | aatgggcggc  | cgaggtgttt  | gacgcagagt | taatggcata  | ccacgacatc  | 1800 |
| gaggaagaaa | tggtgcaagc  | gttaciaaatt | gcaatggttt | gtgtctcgcac | agtgcccgat  | 1860 |
| caaagacccg | tcatgtcggg  | agtggtacgt  | atgatcggag | atatgataga  | tagaggggga  | 1920 |

ES 2 665 463 T3

acaaatgacg gtacggcagc cgccatatga tccgttaaac aatgaaacaa aattcaaagt 1980  
 gtggttgacct tgagaagcca acaaaggagc tc 2012  
 <210> 23  
 <211> 2013  
 <212> ADN  
 5 <213> *Gossypium hirsutum*  
 <400> 23  
 tactccaagc aagtatthttc cttacacgtht tghtthttctt gtgattaatc gatatggcta 60  
 gctcaatgtc ccttaaactt gcatgtgtgg tgggtgtgtg catggtagtg ggtgcacccc 120  
 tggctcaagg ggccgtaacc tgtgggtcaag tcacctcgtg ccgaattcgg cacgagcttt 180  
 ataaaagagt wcccaaagct gacaagcagc cataatatca tctgctaaac atatggcaga 240  
 aatgtcaacc ctttgtacat ttctthttctc acttctactc tttgcctcac atccccttat 300  
 cctccccact gctgccgagc gccggtggca gctgctacaa aaaagcattg gcatctcatc 360  
 catgcacatg caactcctta aaaatgaccg tghtgttatg tatgatagga ctgatttcgg 420  
 cccatccact ctgccattgg caagtgggaa atgccacaat gaccaacca acaccgctgt 480  
 ccaagtagat tgtacggcgc attcagttga gtatgatgtht ttgagcaaca agttcagggc 540  
 tcttactgtc caaagcaacg tttgggtgtc ttcaggcggc gtcatgcctg acggtaaatt 600  
 ggtccaaacc ggtggtttca gcgaaggaga acttcgggtc aggggttttca gcccatgcga 660  
 aagctgcgac tggcacgaaa caccaaattg attggcggcc aaaagatggt atgctaccaa 720  
 tcatgtcttg ccagatggaa gacaaattgt tgtcggcggc cgagaacaat ttaattacga 780  
 gtttgttctt aaaaacatag ccgccgacac gttcaagttg catttctgtg cggaaaccaa 840  
 tgaacgagga gtagagaaca atctctaccc ttttgtthtt ctcaatgtcg atggaaacct 900  
 gttcatttht gccacaatc gagctattht gcttgattat gtgaacaaca aggtggtgaa 960  
 aacttaccct aaaataccag gtggggagcc aagaagctat ccaagcacag gttcggctgt 1020  
 attgctacca ttgaagaact tgacagccgc cactattcaa gctgaagtht tagthtgtgg 1080  
 ggggtgctca aaaggatcat ttgtccaagc attacaaagt aagttcgtta aagccttgaa 1140  
 cacttgcgcc aggatctcaa taaccgacc gaaacccaaa tgggtcttgg aaactatgcc 1200  
 tttagctaga gtcatgggtg acatggtatt gcttccaaac ggcaaagtht tggatcatca 1260  
 cggagcacgt tccgggtcag caggatggga cttaggaagg gaccgggtct taaatccagt 1320  
 gttatacatg cctgataatg aaatcgagtc acgattcaag atactaaacc caacaaagat 1380  
 ccctcggatg taccattcca cagcagttat acttcgtgat ggaagagtht tagtgggtgg 1440  
 aagcaatcct catgcgtatt acaacttht gggagtcctt taccctactg aactaagcct 1500

## ES 2 665 463 T3

ggaggcattc tatccggggtt atttggacgc caaattcaac aatttacgac ccaccattgt 1560  
 tgctcccaag tcaatgtccg gaatcagata caataagaaa ttaaaaatta aagtggatgat 1620  
 tacaggtgaa gtaactctaa acttggtgtc ggtgacaatg gtgtcaccag cttttaatac 1680  
 ccattccttc tctatgaatc aaagggttgc tgtacttga aacgacaaag ttatggcatc 1740  
 cgggaaatca acgtatgaga ttgaagtgat gacgccaggt tcgggtaacc tcgcacctgc 1800  
 aggcttttat cttttgtttg tggttcatca agacatcccc agccaaggca tttgggtcca 1860  
 tttgaaatag tttttgattg atatgtttgt gaaattttga tcattattta gagaaagaaa 1920  
 tgtttatttc aacaatgtgg taaaattgtc ccctacatta agcaaagtga tttacaaatt 1980  
 tgtatcaata aaagaggata attgtttccg tcg 2013

<210> 24  
 <211> 1566  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5

<400> 24  
 cccgggactg taaaaaagca taggttccca atgcagatcc tcccgtttcg aggaggcgca 60  
 cttgtgtgct tcattgcttc cttgttattt gttgccagtt tttgcaatgc cgatgctaaa 120  
 acagtcgagg ttgtcggggc tggtgagtgt gcagattgtg cagagaataa cttggagatt 180  
 agccaggctt tttcagggtc acgagtaagc atagactgca agcccgaaaa tgggaagaac 240  
 tttaaaacac gaggatcagg ggagcttgat aaacaaggca attttaaagt attcgttcca 300  
 gaggatttgg ttgaaaatgg ggaactgaag gaagaatgct atgcacagct tcacagtgta 360  
 tcggcagcac cttgtcccgc ccatgatggc ttggagtcgg ccaagttagt gttgaagtcc 420  
 aggagtgatg ggaaacacgg gtttgggtta aaaggaaagc tcagattctc acctctaacc 480  
 tgtgcttctg ctttcttttg gcctcacttt aagtttctc ccttgcctaa gtggaaccat 540  
 ccccctttgc ccaagtttcc acttccccca ttcaaaggct tocaccacca ttatccaata 600  
 atccctcca tctacaagaa acctcttccg ccaccgtccc cgggtgtaca gccccctcca 660  
 gttcccgtaa acccacctgt tccaatctat aaacctccac cagttccagt ctataaacct 720  
 cctccagttc cagtaaaacc acttcttcca cctgttccaa tctacaaacc tccaccagtt 780  
 gaaaaaccac atcctccacc tgttccagtc tataaacctc caccagttcc agtatacaag 840  
 aagccatgtc ctccaccagt tccagtctat aaatctcctc cggttccagt atacaagaaa 900  
 ccgcatcctc ctccagttcc agtctataag aaaccacatc cacctccagt tccagtatac 960  
 aagaaaccat gtctcccccc agttccagtc tataaatctc ctccagttcc ggaaccacat 1020  
 cctccgccag ttccagtcta taagaaacca catccacctc cagttccagt atacaagaaa 1080

ES 2 665 463 T3

ccatgtctctc ccccagttcc agtctataaa tctcctccag ttccggaacc acatcctccg 1140  
 ccagttccag tccataagcc tctcctcagtt ccggtataca agaaaagagt cctcctccg 1200  
 gttccaatct acaagccccc tccagttcct gtatacaaca aaccactacc tcccccggtt 1260  
 ccagtgtata cgaagccact tccaccacct gttccaacct aaaaaccaa acccctccct 1320  
 cccattcctt acaagccact cctccactt cccaagatcc ctccattccc taagaagcca 1380  
 tgcctcccc ttctaagct acctcctctt cccaagattc ctccaagta tttccaccac 1440  
 caccctcccc ttctaagct acctcctctc cctaagattc ctccaagta tttccaccac 1500  
 catcccaagt tcggaaaatg gccttctttg ccaccctttg ctccccatca tccttaagct 1560  
 gagctc 1566

<210> 25  
 <211> 689  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5

<400> 25  
 cccggggatg gtgagaggca aaattcagat gaagcgaatt gaaaatgcaa cgagccggca 60  
 agtcaccttc tctaagcgac gaaacgggtt gttgaagaag gcttatgaac tatatgttct 120  
 atgcatgct gaagtagctg tcatcatatt ttctcataaa ggaaaactct acgagttctc 180  
 aagttccgac aacatgcaaa acaccataga acgataccgt cagtacaaga aagatgtcca 240  
 gagtaacatc cctgaatttg acagatacac acagcaacta aggcttgaag cagaaaatat 300  
 ggccaagaag attgagttcc ttgaggtttc taaaaggaga atggttgggtc aaaatcttgg 360  
 ttcttgttct atagatgaac ttcaagaggt tgaaaaccag cttgaacgca gcttaagaaa 420  
 cattagggca agaaagggct atttattcaa ggagcagata ctgcaactaa aagctaagga 480  
 aagatatatg caagaggaga atgccaagtt atctgctaag aacaatggta caacatgcag 540  
 ccagcagaac gcggaggtgg agacagaact gttcctcggg ttgcccgaaa accgctgttc 600  
 ctagcaggta ggtctttgga tatggaatga aatgatatt ccctattgga ataatgcttg 660  
 cttgtacgtt atcgccattg ctagagctc 689

<210> 26  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> *Gossypium hirsutum*

10

<400> 26  
 Met Ala Thr Lys Thr Met Met Leu Gln Ile Phe Pro Leu Phe Phe Phe  
 1 5 10 15

ES 2 665 463 T3

Leu Phe Ser Val Cys Asn Ser Ile Phe Leu Gly Ala Asn Gly Asp Asp  
 20 25 30  
 Asn Gly Gly Trp Gln Thr Ala His Ala Thr Phe Tyr Gly Gly Ala Asp  
 35 40 45  
 Ala Thr Gly Thr Met Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Gly Asn Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gln Gly Tyr Gly Thr Ser Thr Ala Ala Leu Ser Thr Ala Leu Phe Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Gly Leu Ser Cys Gly Ala Cys Tyr Glu Leu Arg Cys Asn Asn Asp  
 85 90 95  
 Pro Gln Trp Cys Ile Ser Arg Thr Ile Thr Val Thr Ala Thr Asn Phe  
 100 105 110  
 Cys Pro Pro Asn Tyr Ala Leu Ser Ser Asp Asn Gly Gly Trp Cys Asn  
 115 120 125  
 Pro Pro Arg Glu His Phe Asp Leu Ala Glu Pro Ala Phe Leu Arg Ile  
 130 135 140  
 Ala Glu Tyr Arg Ala Gly Ile Val Pro Val Met Phe Arg Arg Val Ser  
 145 150 155 160  
 Cys Val Lys Lys Gly Gly Ile Arg Tyr Thr Met Asn Gly His Ser Tyr  
 165 170 175  
 Phe Asn Met Val Leu Ile Thr Asn Val Gly Gly Ala Gly Asp Ile Thr  
 180 185 190  
 Ser Val Ser Ile Lys Gly Ser Arg Thr Gly Trp Leu Pro Met Ser Arg  
 195 200 205  
 Asn Trp Gly Gln Asn Trp Gln Ser Asn Ala Tyr Leu Asn Gly Gln Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Phe Lys Val Thr Ala Ser Asp Gly Arg Thr Ile Thr Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 Asn Val Val Pro Ala Gly Trp Gln Phe Gly Gln Thr Phe Glu Gly Gly  
 245 250 255  
 Gln Phe

ES 2 665 463 T3

<210> 27  
 <211> 1432  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5 <400> 27

cccgggttcc atgaaaaggg tctcgaacat ctatatagag gcaaagaaac atctctctga 60  
 tctgctaaca aacgaggatc aaaatgagga tcttttgagt acacagggtc caaaaacctt 120  
 aggtaggatt ctttctcttc ctgagtataa tacatcccct gtcagcagcc ctggtcagaa 180  
 cttggagcat agttttacaa ctgcgcatat gagatttgca ggctcggaca aattgcaaatt 240  
 ggtgagttaa aatgatcggg ttgtcagcct tctaagtatg agggcagaga agaccgatgg 300  
 ccagctttgc atttctgaaa acaaaagcga taatgaagtt gaaagtgata atgcaatttc 360  
 aaacaacctt gacactagtg tgaataatga caaagaggat ccaatttttt gttctataaaa 420  
 agatgaattg agttccaaag agtctgtgag tattgttaaa gctactgaaa tgatggttca 480  
 tgaagaaagc aagtccctgg atatctcttc agagacgagc ggctcttcaa ttatcacaga 540  
 tgataaaaaat gttgacatat atgaagtttg tgatgaaaaa caaaatcctt ggtacttgaa 600  
 acaggattca tcggaagtgg accaacagcc tttttctcca ttatcatctc catcagactc 660  
 atcagtcatg aaaaagggtg aatgtttgga gagtggtact gatataccag agcgatcaag 720  
 ccccgatatct gttcttgagc caatatttgc agatgatctt atcagccctg caagcatcag 780  
 atcttattcc ggtgaaacat ccattcaacc gctaagaatt cgattcgaag aacatgactc 840  
 tttggccaca aatcagagca atcgaattaa aactgtatg aatgataagg aatcaatatt 900  
 tgagcacata aaggcagtgc tgcaagcctc gagtttcagc tgggacgaag tctacatccg 960  
 gtcactttct tcagacctgc ttatcgacce attgttggtt gacgaggtcg aatacttgcc 1020  
 caaccagctt tgtcaagacc aaaaactgct ctttgattgc attaataag tagtcagaga 1080  
 ggtttgtgag tactattttg gttcccctag tgtttcattt gttaaacca atatccgtcc 1140  
 tatcccaaac atgcaaaata caattcaaga agtctgggag ggagtttatt ggcatttget 1200  
 cccgactcca ttgccttgta ctctggacct ggtagtccga aaagacctgg ctaagactgg 1260  
 aacatggatg gaccttcaac ttgacactgg ttatattggt gttgagattg gtgaagccat 1320  
 cttcgaagat ttagtggaag acaccataac aagctacata aatggaagtt gggaatgtga 1380  
 atataatgtg cttccagctt agcttagctg aaggacaacg acgatagagc tc 1432

<210> 28  
 <211> 1079  
 <212> ADN  
 <213> *Gossypium hirsutum*

10

<400> 28

ES 2 665 463 T3

ggattccggt gacggtgttt ctacacaccgt gccaatctat gaaggatatg cccttcacaca 60  
 tgccatcctc cgtcttgacc ttgcaggtcg tgatctaacc gatgccttga tgaagattct 120  
 taccgagaga ggttacatgt tcaccaccac tgctgaacgg gaaattgtcc gtgacatgaa 180  
 ggagaagctt gcttatgttg ccctggacta tgagcaggaa ctggagactg ccaagagcag 240  
 ctcatctggt gagaagaact atgagttgcc tgacggacaa gtcattacta ttggagctga 300  
 gagattccgt tgcccggaag tctctttcca gccatctttc atcgggatgg aagctgctgg 360  
 aatccatgaa actacctaca actctatcat gaagtgcgat gtggatatca ggaaggatct 420  
 ctacggtaac attgtgctca gtgggggttc aaccatgttc cctggtattg cagaccgcat 480  
 gagcaaggag atcactgctc ttgctccaag cagcatgaag attaaggtcg ttgcgccacc 540  
 agagagaaaag tacagtgtct ggattggagg atctatcttg gcatcactca gcaccttcca 600  
 gcagatgtgg atttccaagg gtgagtatga tgaatccggt ccatccattg tccacaggaa 660  
 gtgcttctaa gttttgtaat tgcttttgat ggtgatctac attttgcat tagttggctt 720  
 tttttgtgtg cgatgttaag tgaagtccaa agtctggttt atgtggggag agttagggat 780  
 cattgtagga tgggtactt gatattgacg tattattatt ttagcctttc accgatcac 840  
 caccattaag atgatgggtc ctatggagat ggcggtgggc ggacaattgg tgcttaattc 900  
 cttccttata atccatcttt gaaccatggt gcttaaaagg atgtttggag ctggagactg 960  
 gattgtggtg cttttttatt ttattttatt atttaaatatt caagggtttt gagaacatta 1020  
 atgttcatag ctattattgt acgagatfff ttttgaaaaa ttagagtcag tttgcggtc 1079

<210> 29

<211> 657

<212> ADN

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 29

cggccgcgctc gactttttta ataaaactga aacaaccctt cttcacacaa aaatatgctc 60  
 cgtacaattc gtttattctc tcatagcatc tcttctaaat taaaattgct aaagcttga 120  
 tacacaaagc acaatcactc actcacttaa gccttagaca tgtgtcggat caagtcgata 180  
 acacgggaac tgtaacccca ttogttgtca taccaagtca caagcttaac aaagttgtca 240  
 ttcaaagcaa ttccagcctt ggcatacaaa atgcttgacc tgttgtctcc gatgaagtca 300  
 gttgagacta aatcttcgctc cacataacca agaattccct tcaagttgcc ttcagattcc 360  
 gccttgatag cagccttaat ttcacatcat gtagccttct tctcaagtct cacagtgagg 420  
 tcaaccacag agacatcaac agtgggaaca cggaaagcca ttccagtcag cttgccattc 480  
 agtgctggca aaactttgcc gacggccttg gcagctccag tgctgctagg aatgatattg 540  
 aaggaagcag ctctaccacc tctccagtcc ttcattggaat gaccatcaac agtcttttgt 600  
 gtagcagtaa tagaatgaac agtggtcata agaccctcaa cgatgccaaa tttatca 657

ES 2 665 463 T3

<210> 30  
 <211> 649  
 <212> ADN  
 <213> Gossypium hirsutum

5 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (423)..(423)  
 <223> n es a, c, g, o t

10 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (492)..(492)  
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (504)..(504)  
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (627)..(627)  
 <223> n es a, c, g, o t

25 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (630)..(630)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 30  
 gagaaaagga agacaacgat ggtgtctctg aagttacaga agcgggctcgc cgctagcgtc 60  
 ctgaagtgtg gccgtggcaa ggtttggctt gatcctaataa aatcaatga aatctccatg 120  
 gccaaactcca ggcagaatgt taggaaactt gttaaggatg gttttatcat ccggaagcct 180  
 accaagattc actcccgatc tcgtgcacgc agaatgaaag aggccaagag aaagggtcgt 240  
 cattctggct atggtaagag gaaggggtacc agggaggcaa gattgcctac aaagatcctt 300  
 tggatgagga gaatgcgagt actaaggcgt ttgcttcgta agtacagggga atccaagaag 360  
 attgacaagc acatgtacca tgacatgtac atgaaggatga agggtaatgt atttaaaac 420  
 aancgtgtct tgatggaaag catccacaag tccaaggctg agaaggcaaa aaaaaaaca 480  
 ctctcaaate antttgaggc caancgaact aaaaacaagg cgagcagggga gagaaagatg 540  
 gccagaaagg aaaaacgcct tgcacagggga cctggtgtga aagcagcacc tgcagctgca 600  
 ccgcaacagg ccgaaggagt taaaaantcn aagaaatgaa tgaggtact 649

30 <210> 31  
 <211> 877  
 <212> ADN  
 <213> Virus del mosaico de la coliflor  
 <400> 31

# ES 2 665 463 T3

```

aagcttgcac gctgcaggc cccagatta gccttttcaa tttcagaaag aatgctaacc 60
cacagatggc tagagaggc tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagcaata 120
atctccagga aatcaaatac cttcccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga 180
ctaactgcat caagaacaca gagaaagata tattttctcaa gatcagaagt actattccag 240
tatggacgat tcaaggcttg cttcacaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta 300
aaaaggtagt tcccactgaa tcaaaggcca tggagtcaaa gattcaaata gaggacctaa 360
cagaactcgc cgtaaagact ggcgaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgaca 420
agaagaaaat cttcgtcaac atgggtggagc acgacacact tgtctactec aaaaatatca 480
aagatacagt ctcagaagac caaagggcaa ttgagacttt tcaacaagag gtaatatccg 540
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 600
aggaagggtg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 660
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 720
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 780
gggatgacgc acaatcccac tctccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagtccat 840
ttcatttggg gagaacacgg gggactctag aggatcc 877

```

<210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 32

accgggatg gatgggtatt gtagcagaag g 31

10 <210> 33  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 33

gccgagctc aatcaaatga gggcaatgcc 30

20 <210> 34  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 34

25 aatctagaca agtacagaag ctcaattccc 30

<210> 35

<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 35  
 tgataatcat gtggaagcaa cc 22  
  
 <210> 36  
 <211> 29  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 36  
 15 cagccccgggt gatggaactg agcattcag 29  
  
 <210> 37  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 37  
 cgtgagctct gattagagtt tcaagtgcatt g 31  
  
 <210> 38  
 <211> 30  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 30 <400> 38  
 ttccccgggt tgtgtcatg gcttctctgc 30  
  
 <210> 39  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 39  
 atggagctca tattcatggc caaaacac 28  
  
 <210> 40  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 40  
 gcacccggga aaggaaatgg caggcgtc 28

- <210> 41  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 41  
 ttcgatatc cacagtaccc tacttcatg c 31
- 10 <210> 42  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- 15 <400> 42  
 taccgggta ccattactct actacagctg c 31
- 20 <210> 43  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 43  
 gagagctcaa cagacaaaga ccagactgg 29
- 25 <210> 44  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>
- 30 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 44  
 acccccgggc aagtgatcaa agagaatgg 29
- 35 <210> 45  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 45
- 40 catgagctct ttctcaact cctctaccc 29  
 <210> 46  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 46

|    |                                            |    |
|----|--------------------------------------------|----|
|    | ccccgggtc cctattgcat gccttc                | 27 |
|    | <210> 47                                   |    |
|    | <211> 26                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
| 5  | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario |    |
|    | <400> 47                                   |    |
|    | ttgagctcac tcgatcttac tcatcc               | 26 |
| 10 | <210> 48                                   |    |
|    | <211> 29                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
| 15 | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario |    |
|    | <400> 48                                   |    |
|    | agccccgggag atagagagat gggaggtcc           | 29 |
|    | <210> 49                                   |    |
|    | <211> 28                                   |    |
| 20 | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario |    |
|    | <400> 49                                   |    |
| 25 | tcgagctctg gggcaacaat catttacc             | 28 |
|    | <210> 50                                   |    |
|    | <211> 30                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
| 30 | <220>                                      |    |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario |    |
|    | <400> 50                                   |    |
|    | tccccgggca tctgatctaa ttgttggtgg           | 30 |
|    | <210> 51                                   |    |
| 35 | <211> 29                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
|    | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario |    |
| 40 | <400> 51                                   |    |
|    | ttggatatcg cacctatga catgggatc             | 29 |
|    | <210> 52                                   |    |
|    | <211> 28                                   |    |
|    | <212> ADN                                  |    |
| 45 | <213> Secuencia artificial                 |    |
|    | <220>                                      |    |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario |    |

<400> 52  
 ttcccgggta caaacatggc tagttccg 28  
 <210> 53  
 <211> 28  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 53  
 10 tcgagctcat caacctcact gcacctg 28  
 <210> 54  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 54  
 tagtcactcc tgttctagat gaag 24  
 <210> 55  
 20 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 25 <400> 55  
 ctgagctcca ggattttac ttagggacc 30  
 <210> 56  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 56  
 taccgggca tacagagatg gagaggc 27  
 35 <210> 57  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 57  
 acgagctcaa aggtgttgc ttaggtcc 28  
 <210> 58  
 <211> 28  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 58  
 agcccgggag aaagatgatg aaaagggg 28  
 5 <210> 59  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 10 <400> 59  
 aagatatcaa atcccatgca aaacccc 27  
 <210> 60  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 60  
 aaccgggcg gcaactaaa agaaaacc 28  
 20 <210> 61  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 61  
 aagagctct ttgttgctt ctaag 26  
 <210> 62  
 <211> 26  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 62  
 35 gaccgggac tgtaaaaag catagg 26  
 <210> 63  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 63  
 gcgagctcag ctaaggatg atggggag 28  
 45 <210> 64  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 64  
 atcccgggga tggtagagagg caaaattc 28

5 <210> 65  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 65  
 acgagctcta gcaatggcga taacgtac 28

15 <210> 66  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 66

20 atcccggggtt ccatgaaaag ggtctcg 27

<210> 67  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 67  
 gtgagctcta tcgtcgtgt ccttcagc 28

30 <210> 68  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

35 <400> 68  
 tcgtgatcta accgatgcct t 21

<210> 69  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 69  
 acaattccc gttcagcagt g 21

45 <210> 70  
 <211> 22  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 70  
 5 ggtggctcct acaaatgcca tc 22  
 <210> 71  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 71  
 aagttgggta acgccagggt 20  
 15 <210> 72  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 20 <400> 72  
 ctattcggct atgactgggc 20  
 <210> 73  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 73  
 atgtcctgat agcggtcgc 20  
 30 <210> 74  
 <211> 1344  
 <212> ADN  
 <213> Gossypium hirsutum  
 <400> 74

ES 2 665 463 T3

tgctcccttg ctacaccacc ctcgaggag gagcagcaga cccttaaagg gtttcgcagt 60  
 gatatttggg tccgtcgttt tctactctc actggtcata ttaatcgta accaaagccc 120  
 ggagccatta gcaagtaacc ccagtagtgt aacggaggca gggtcgtatt caatggcggc 180  
 gcagccaaga gggatagctg aaggagtffc agccaagtca aaccatcac tttttgacaa 240  
 agttggggtt aattggacaa acgctatggt ttactggcaa agaactgcct accactttca 300  
 gcctcaaaag aattggatga atggtagggt acctaattat aatttaagtt acttcttttg 360  
 attttcgtca ctaaaccctt catttttagtt tactattttt aaacttaa atgatttctt 420  
 ttttaataatc gaatttaatt tggtgtcttt ttcttactat gcttgcacgt tggttcggca 480  
 caacttacgt atcttgcttc agatcctgac ggtgagttct catcacatct aaattcttgt 540  
 tgggacaata ctgttagtca accatttcat caatcaatgc gtaaaacaca aaaatatcga 600  
 atcagaaatt tgtgaccaac ccaatctgct agttcttcca aatttgagca tttcaacctt 660  
 gatttgcaat taaagttagc ttctacattg aattgaatca tatcttacc tttttcttct 720  
 actagatcca cttataatth tatttttcaa tactcattta attaaagtaa ataatttaa 780  
 taatttggtt catataaaat atatataatc tacatcaata agataactaat atcgaatcca 840  
 ccatttggtg tataataaat gcaattatat tacaaaaaag ttaataaaat attagtagca 900  
 tagaattaat taatttaaaa aaatatgatt ttttagcag aattaaaaaa aacaaatc 960  
 ttataaaaaa aataaatatt aaaagaaaa agacatatga taacccttag tttacaatct 1020  
 ataagttaca aaaaaatagt tacttgaccg tttggtttgt ttacctgctg ttctaacggt 1080  
 taagtcctaa ctaactagtt ttgcaaaacc ttgcttctgt acatcacat gtaatagcat 1140  
 gtggtttttt tagtaattat attaaactct aatagtttaa ttaaagtagt atgtgacata 1200  
 atggaacaaa aatacagatg tcgcaggctc gttatatcac aagggatggt accatctttt 1260  
 ctatcaatac aaccctgatt cagccatag gggcaacatc acttggggcc acgctgtatc 1320  
 aaaggacctc atcacggtt ctat 1344

<210> 75

<211> 556

<212> ADN

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 75

tccacaacat tgacgtcagc cggcgccgcc gccgccacca tcaaactctc cctctctccc 60  
 ttccctcacc cttcttctc ccaccttac caaattctca acaacttagt cacttcttct 120  
 gttgcaagag cccaccacct caaacayccc aaagccaagg ccgataatac tacctcttct 180  
 cttctcaggg ctyccctatt tyctcacagt tatgggggct aactatctc cctcaaattt 240

# ES 2 665 463 T3

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
|    | ggaactccgc ctcaaaccct tcctttcrty atggacacyg ggagcagcct ctcttggttc | 300 |
|    | ccttgcacct ctcgttacct ttgttcccaa tgcgwtcc ccaatggtga ccctgcaaaa   | 360 |
|    | atccccactt ttgccctaa ackttcatct tccarkaagc tcgtaggttg yagaaacccc  | 420 |
|    | aagtgtagtt ggctttttgg ccccgacggt gagtctcgtt gccaaagactg tgaaccact | 480 |
|    | tccgaaaact gactcaaac ytgccctct tacataattc aatacggtt aggttccact    | 540 |
|    | gctgggcttc tattag                                                 | 556 |
|    | <210> 76                                                          |     |
|    | <211> 28                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
| 5  | <213> Secuencia artificial                                        |     |
|    | <220>                                                             |     |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario                        |     |
|    | <400> 76                                                          |     |
|    | tttttttt tgtttgtg gggggtg                                         | 28  |
| 10 | <210> 77                                                          |     |
|    | <211> 17                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |
|    | <220>                                                             |     |
| 15 | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario                        |     |
|    | <400> 77                                                          |     |
|    | ttttgttg ttgtggg                                                  | 17  |
|    | <210> 78                                                          |     |
|    | <211> 28                                                          |     |
| 20 | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |
|    | <220>                                                             |     |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario                        |     |
|    | <400> 78                                                          |     |
| 25 | tttttttt tgtttgtg gggggtg                                         | 28  |
|    | <210> 79                                                          |     |
|    | <211> 20                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |
| 30 | <220>                                                             |     |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario                        |     |
|    | <400> 79                                                          |     |
|    | ctggggttac ttgctaatg                                              | 20  |
|    | <210> 80                                                          |     |
| 35 | <211> 17                                                          |     |
|    | <212> ADN                                                         |     |
|    | <213> Secuencia artificial                                        |     |
|    | <220>                                                             |     |
|    | <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario                        |     |
| 40 | <400> 80                                                          |     |

tttttgttg ttgtggg 17  
 <210> 81  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 81  
 gctccgggct ttggtaacg 20  
 10 <210> 82  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 82  
 ggctttggga tgttgaggt gg 22  
 <210> 83  
 <211> 17  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 83  
 25 tttttgttg ttgtggg 17  
 <210> 84  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 84  
 ggtggtgggc tctgcaaca g 21  
 <210> 85  
 35 <211> 969  
 <212> ADN  
 <213> Gossypium hirsutum  
 <400> 85

# ES 2 665 463 T3

```

ggtggtgggc tcttgcaaca gaggcaatth tctaccggaa atgaaggaag gaatgaagga 60
ggcggttagag agaagagcac agaaaatgtc ttacagaaat tgaaagggta agacattttc 120
cttaaaatgt aacacattht ctcttgtht ggagttcatt ttccaaatgg aaaatgtht 180
ccgccaatca aaagctgaaa aagttaaaaa tgatthtctg gaaaatcaat tccgtcaatc 240
aaacagacc ttagtctatt ctctccaatt aaatcattct tagtccttat actthtthta 300
atthtctatct cgatacaaaa gacaaccatt gaatctatta aattacctt gtgtaaatga 360
tatatgaaaa taataaattg atatgacata acgcatgcga taatatatgt aaaaatcacc 420
aattacaggt acaaaaaaat ggttatggac taaatccgta acttgccat gataaacgaa 480
gtggcataat ggataattca gtgthttaca atgtcaaaat agcagcaccg taatcgaaca 540
tgataccttg gtccagttgt gctgthtacc gttggtatag tathtctact ctctctctat 600
aaagagagaa cgggacaaac atcatcccca ccgctatgcc tathtcccca ctcaaatca 660
thtctcttht aaataccaat taatattact tacttact tccccttht aaatagataa 720
tccaaaagca gagcaaaaac agagataacc atthttht tthtgtgtt gttgtgtcg 780
tcgtcatggc thtctthtct thcatctct tcttatctth tthtataatc tccacaacat 840
tgacgtcagc cggcgccgcc gccgccacca tcaactctc cctctctccc thcctcacc 900
ctthtctctc ccactcttac caaattctca acaacttagt cactthtct gttgcaagag 960
cccaccacc 969

```

- <210> 86
- <211> 29
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 86
- attcaagctt thtthtgg ttgthgggg 29
- 10 <210> 87
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 87
- thggtcctt gggcattgag thtctgtac 29
- <210> 88
- <211> 1040
- 20 <212> ADN
- <213> Gossypium hirsutum
- <400> 88

ES 2 665 463 T3

aagctttttt tgtttgttgt ggggggtgta tttgaagtag catagcattt aaatcgaatt 60  
aattgaagca gtccttttaa tttagttttg ttggttgtca atgccataa aaaggagaca 120  
ggggttgaat aatgcaatgc aattcaagac ccaatgatcc taacaaacat tcaaggagca 180  
cactcaaate ccaacaacca ttccatcctg atggatgtgg aaaagcaaate ttaattaagg 240  
agcctctcaa acttagagct cttgccacag cacatgatgc atttttcaac agatcagaac 300  
aagtacaagg acaattaate ctagattatc tcaacagcat gccacatgac ccatgttcca 360  
tttcgtatac atatgtctgc catttaattt aaaggtaaac atttgtgatg ccaatgcca 420  
tgccttattc acctcacaaa tcagtatcca taaactagct gttttcaggc caggaggacc 480  
aacatgctca agacttggca ttccctaate ctgtgtgtcc attggtcatt gcacgtaaate 540  
tggctctgtc ttcatgcttc caaattatta ttattaatga agaaaaataa tttactctct 600  
gaaatcttgc aacgcaagcc acaaccaga agctagagaa gacaaataate acgatgataa 660  
tttataacta tatgtatagt agtgtaaate gcaatatata ttaatatata atcctacccc 720  
aaaagcaagc aatgagttt gactaccagg tgcagctgca tgcattgatg catgggatgc 780  
cctacctttt caactgtccc tcttgtttca ctgtatagca ttcaccagat ctgatctaat 840  
gggaccacct ctctctccca gctaaattgg acaacaacca atccaagctc aagacataa 900  
aatctcttct ctttctctct atggtgttct ctctttaatt ttacctacca ttaccctttt 960  
ctacttaate tctcattgct tacttatatt gtaagtgtga ccaagtaaate caagtacaga 1020  
agctcaatgc ccaaggatcc 1040

<210> 89  
<211> 29  
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 89

ftaaagcttt gggctcttgc aacagaggc 29

10 <210> 90  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 90

aaggatccga cgacgacaac aacaacaac 29

20 <210> 91  
<211> 792  
<212> ADN  
<213> Gossypium hirsutum

<400> 91

## ES 2 665 463 T3

```

aagctttggg ctcttgcaac agaggcaatt tctaccgga aatgaaggaa ggaatgaagg 60
agggcggtaga gagaagagca cagaaaatgt cttacagaaa ttgaaagggt aagacatddd 120
ccttaaaatg taacacatddd tctcttgddd tggagttcat tttccaaatg gaaaatgddd 180
tccgccaatc aaaagctgaa aaagttaaaa atgatdddct ggaaaatcaa tcccgtaat 240
caaacagacc cttagtctat tctctccaat taaatcattc ttagtcctta tacttdtdtda 300
aattdctatc tcgatacaaa agacaacctt tgaatctatt aaattacctt tgtgtaaatg 360
atatatgaaa ataataaatt gatatgacat aacgcatgcg ataatatatg taaaaatcac 420
caattacagg tacaacaaaaa tggttatgga ctaaaccgtt aacttgcgca tgataaacga 480
agtggcataa tggataattd agtgtdtdtdc aatgtcaaaa tagcagcacc gtaatcgaac 540
atgatacctt ggtccagtdg tgctgtdtdc cgttgggtata gtattdctac tctctctcta 600
taaagagaga acgggacaaa catcatcccc accgctatgc ctattdcccc actcaaattd 660
attdcacttd taaataccaa ttaatattac ttacacttdc ttdcccttda caaatagata 720
atccaaaagc agagcaaaaa cagagataac cattcttdtdt ctdtdgttdg tgttdgttdc 780
gtcgtcggat cc 792

<210> 92
<211> 32
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 92
aaatctagat aagttgataa agctaatttc tc 32

10 <210> 93
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 93
tttccggga cctggaggca atc 23

 <210> 94
 <211> 1969
20 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum

 <400> 94

```

## ES 2 665 463 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tctagataag ttgataaagc taatttctca ttttagctac catcgctagt aatcgtggca  | 60   |
| ataactacc taactatagc atttattgct accaaataaa atttggcagc taatcataat   | 120  |
| tttttgatcat gaatcaatag ttattgtagc aatagttatc tcttagccac aataaattat | 180  |
| ttaaaataaa atattatagc taaataaata tttttgcttt aagttctaaa agcttgtggc  | 240  |
| aatagttaaa tgatataagc acagatttat tggataaatt gaattatgtt gctaatttct  | 300  |
| tagttttttg ccacgagtta aaaattacca atagctatag taacttttta atcacaataa  | 360  |
| aatatttgaa agaaaatatt gtagctaaat gaatattttt tccttcaagt tattaaaagt  | 420  |
| tgtggcaata taggttaaat tagccacatg tttcttgctt taatagaatt ttgtagctaa  | 480  |
| tcattaactt ttaccacgag ttgaacttaa tataacaaca ataacctttt aaccataata  | 540  |
| aagcgattta aatcaaatat tactaaataa ataactttgc tttcaagttt ctataaaatc  | 600  |
| atggcaatag tcattacgat aaaatgatat aaccacgaat atattgcaac gataaattct  | 660  |
| gtaactaatc attagttttt gcgacgaggt aaattttccg tcacagtagc aatcttctag  | 720  |
| gcacattaaa aatttgaaac aaaattttgt agtcaaataa atatttatct tcttatttta  | 780  |
| agaaaataaa aatagttaga taatagttac tactatttgt catgaaaata tcaatagata  | 840  |
| caaattttaa gtgactataa atttacgagt ttactatact ttagtcgtac agtttgcaat  | 900  |
| aatagtattt taaccacaat tagttatatg taaaaataa cataagtga taactttttt    | 960  |
| tcaatgagaa aataagagtt gctcaaaca tatcaagtta caaaaattta attttaactg   | 1020 |
| taaaagttat atttttccaa aataacataa actatagtaa ttatatatag ttggaagtat  | 1080 |
| taataaaatt taaatatgca aaagttaatt ttaataaacc atttgtatgc ctaacttgta  | 1140 |
| gcctctaaac tattttattt gctttattta tcaaactcat attttatttt attgcacctt  | 1200 |
| gtagttttg gacgttaatt atatatattt ggtgtaaaat ttaaaatata ttaacatttg   | 1260 |
| tggagaattt atgtatgcct ggttcttaac tatttttttt tatataactg gtagagtaa   | 1320 |
| tttcttatat tcagtatatt atttttaaat aagtcctcat aaattgaaga ctttaaaagt  | 1380 |
| ttttgtgtca ttcctctttt tatttaagaa attgaagaat tccgctaaat ttcataattc  | 1440 |

ES 2 665 463 T3

cgctgttatt taactgttta tttcccttgt taatataatt ggtaagaagt tttaaaataa 1500  
 aggagttaat gattttctag gttcatggct tgcctagctt ctacgagtaa gcgccatcac 1560  
 gactcccgag gataaggaaa tccgggctgt agcattcact cacaaaaatt actaaaaaca 1620  
 aagtttacc tttctccaaa agtaaatttc atatttggtt ccacataatg tgttcaatga 1680  
 gtcaagtgaa gtacttttca tgacaaaaaa aagttgctga aaaatgcata tctcatattt 1740  
 tttttttaga gaaatcccat ttcttgccca aacgaaagcc tataaaagag catatatatgc 1800  
 aacaacagtt tgacgaaact atcaagtcaa ataatcccc ctttaattcc ctcccaaat 1860  
 gcagttcttc aacttctttt cccttttctt ttttgtgtca tttctctttt tatttaagaa 1920  
 atggaagaat tccaatagcc aaaccaaag attgcctcca ggtcccggg 1969

<210> 95  
 <211> 198  
 <212> PRT  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5

<400> 95  
 Met Val Arg Gly Lys Ile Gln Met Lys Arg Ile Glu Asn Ala Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Asn Gly Leu Leu Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 Tyr Glu Leu Tyr Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Val Ile Ile Phe  
 35 40 45  
 Ser His Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Phe Ser Ser Ser Asp Asn Met Gln  
 50 55 60  
 Asn Thr Ile Glu Arg Tyr Arg Gln Tyr Lys Lys Asp Val Gln Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Glu Phe Asp Arg Tyr Thr Gln Gln Leu Arg Leu Glu Ala Glu  
 85 90 95  
 Asn Met Ala Lys Lys Ile Glu Phe Leu Glu Val Ser Lys Arg Arg Met  
 100 105 110  
 Leu Gly Gln Asn Leu Gly Ser Cys Ser Ile Asp Glu Leu Gln Glu Val  
 115 120 125  
 Glu Asn Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asn Ile Arg Ala Arg Lys Gly  
 130 135 140

ES 2 665 463 T3

Tyr Leu Phe Lys Glu Gln Ile Leu Gln Leu Lys Ala Lys Glu Arg Tyr  
 145 150 155 160

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

Cys Ser Gln Gln Asn Ala Glu Val Glu Thr Glu Leu Phe Leu Gly Leu  
 180 185 190

Pro Glu Asn Arg Cys Ser  
 195

<210> 96

<211> 463

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 96

Met Lys Arg Val Ser Asn Ile Tyr Ile Glu Ala Lys Lys His Leu Ser  
 1 5 10 15

Asp Leu Leu Thr Asn Glu Asp Gln Asn Glu Asp Leu Leu Ser Thr Gln  
 20 25 30

Val Pro Lys Thr Leu Gly Arg Ile Leu Ser Leu Pro Glu Tyr Asn Thr  
 35 40 45

Ser Pro Val Ser Ser Pro Gly Gln Asn Leu Glu His Ser Phe Thr Thr  
 50 55 60

Ala His Met Arg Phe Ala Gly Ser Asp Lys Leu Gln Met Val Ser Glu  
 65 70 75 80

Asn Asp Arg Phe Val Ser Leu Leu Ser Met Arg Ala Glu Lys Thr Asp  
 85 90 95

Gly Gln Leu Cys Ile Ser Glu Asn Lys Ser Asp Asn Glu Val Glu Ser  
 100 105 110

Asp Asn Ala Ile Ser Asn Asn Leu Asp Thr Ser Val Asn Asn Asp Lys  
 115 120 125

Glu Asp Pro Ile Phe Cys Ser Ile Lys Asp Glu Leu Ser Ser Lys Glu  
 130 135 140

ES 2 665 463 T3

Ser Val Ser Ile Val Lys Ala Thr Glu Met Met Val His Glu Glu Ser  
145 150 155 160

Lys Ser Leu Asp Ile Ser Ser Glu Thr Ser Gly Ser Ser Ile Ile Thr  
165 170 175

Asp Asp Lys Asn Val Asp Ile Tyr Glu Val Cys Asp Glu Lys Gln Asn  
180 185 190

Pro Trp Tyr Leu Lys Gln Asp Ser Ser Glu Val Asp Gln Gln Pro Phe  
195 200 205

Ser Pro Leu Ser Ser Pro Ser Asp Ser Ser Val Met Lys Lys Val Glu  
210 215 220

Cys Leu Glu Ser Val Thr Asp Ile Pro Glu Arg Ser Ser Pro Val Ser  
225 230 235 240

Val Leu Glu Pro Ile Phe Ala Asp Asp Leu Ile Ser Pro Ala Ser Ile  
245 250 255

Arg Ser Tyr Ser Gly Glu Thr Ser Ile Gln Pro Leu Arg Ile Arg Phe  
260 265 270

Glu Glu His Asp Ser Leu Ala Thr Asn Gln Ser Asn Arg Ile Lys Thr  
275 280 285

Cys Met Asn Asp Lys Glu Ser Ile Phe Glu His Ile Lys Ala Val Leu  
290 295 300

Gln Ala Ser Ser Phe Ser Trp Asp Glu Val Tyr Ile Arg Ser Leu Ser  
305 310 315 320

Ser Asp Leu Leu Ile Asp Pro Leu Leu Val Asp Glu Val Glu Tyr Leu  
325 330 335

Pro Asn Gln Leu Cys Gln Asp Gln Lys Leu Leu Phe Asp Cys Ile Asn  
340 345 350

Glu Val Val Arg Glu Val Cys Glu Tyr Tyr Phe Gly Ser Pro Ser Val  
355 360 365

Ser Phe Val Lys Pro Asn Ile Arg Pro Ile Pro Asn Met Gln Asn Thr  
370 375 380

Ile Gln Glu Val Trp Glu Gly Val Tyr Trp His Leu Leu Pro Thr Pro

ES 2 665 463 T3

385 390 395 400

Leu Pro Cys Thr Leu Asp Leu Val Val Arg Lys Asp Leu Ala Lys Thr  
405 410 415

Gly Thr Trp Met Asp Leu Gln Leu Asp Thr Gly Tyr Ile Gly Val Glu  
420 425 430

Ile Gly Glu Ala Ile Phe Glu Asp Leu Val Glu Asp Thr Ile Thr Ser  
435 440 445

Tyr Ile Asn Gly Ser Trp Glu Cys Glu Tyr Asn Val Leu Pro Ala  
450 455 460

<210> 97

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 97

tcagattccg ccttgatagc a 21

10 <210> 98

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 98

ctctgtgggt gacctcactg tga 23

<210> 99

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 99

25 cctaccaaga ttactcccg atc 23

<210> 100

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 100

cctctacca tagccagaat gacg 24

<210> 101

35 <211> 21

ES 2 665 463 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 5 <400> 101  
 tccacaacat tgacgtcagc c 21  
 <210> 102  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 102  
 ctaatagaag cccagcagtg g 21  
 15 <210> 103  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 103  
 aaatctagat aagttgataa agctaatttc tc 32  
 <210> 104  
 <211> 23  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 104  
 30 ttcccggga cctggaggca atc 23  
 <210> 105  
 <211> 1969  
 <212> ADN  
 <213> Gossypium hirsutum  
 35 <400> 105  
 tctagataag ttgataaagc taatttctca ttttagctac catcgctagt aatcgtggca 60

## ES 2 665 463 T3

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ataactacc   | taactatagc  | atattattgct | accaaataaa  | atattggcagc | taatcataat  | 120  |
| tttttgtcat  | gaatcaatag  | ttattgtagc  | aatagttatc  | tcttagccac  | aataaattat  | 180  |
| ttaaaataaa  | atattatagc  | taaataaata  | tttttgcttt  | aagttctaaa  | agcttgtggc  | 240  |
| aatagttaaa  | tgatatagtc  | acagatllat  | tggtataatt  | gaattatgtt  | gctaatttct  | 300  |
| tagttttttg  | ccacgagtta  | aaaattacca  | atagctatag  | taacttttta  | atcacaataa  | 360  |
| aatatlttgaa | agaaaatatt  | gtagctaaat  | gaatattttt  | tccttcaagt  | tattaaaagt  | 420  |
| tgtggcaata  | taggttaaatt | tagccacatg  | tttcttgctt  | taatagaatt  | ttgtagctaa  | 480  |
| tcattaactt  | ttaccacgag  | ttgaacttaa  | tataacaaca  | ataacctttt  | aaccataata  | 540  |
| aagcgattta  | aatcaaatat  | tactaaataa  | ataactttgc  | tttcaagttt  | ctataaaatc  | 600  |
| atggcaatag  | tcattacgat  | aaaatgatat  | aaccacgaat  | atattgcaac  | gataaattct  | 660  |
| gtaactaatc  | attagttttt  | gcgacgaggt  | aaatlttccg  | tcacagtagc  | aatcttctag  | 720  |
| gcacattaaa  | aatttgaaac  | aaaatlttgt  | agtcaaataa  | atatttatct  | tcttatttta  | 780  |
| agaaaataaa  | aatagttaga  | taatagttac  | tactatlttgt | catgaaaata  | tcaatagata  | 840  |
| caaatttaaa  | gtgactataa  | atlttacgagt | ttactatact  | ttagtcgtac  | agtttgcaat  | 900  |
| aatagtattt  | taaccacaat  | tagtttatatg | tacaaaataa  | cataagtгаа  | taactlttttt | 960  |
| tcaatgagaa  | aataagagtt  | gctcaaacaa  | tatcaagtta  | caaaaattta  | atlttactg   | 1020 |
| taaaagttat  | atltttccaa  | aataacataa  | actatagtaa  | ttatatatag  | tttgaagtat  | 1080 |
| taataaaatt  | taaatagca   | aaagttaatt  | ttaataaacc  | atlttgatgc  | ctaacttgta  | 1140 |
| gcctctaaac  | tatltttattt | gctlttattta | tcaaactcat  | atltttatttt | attgcacctt  | 1200 |
| gttagttttg  | gacgttaatt  | atatatatltt | ggtgtaaaat  | ttaaaatata  | ttaacatttg  | 1260 |
| tggagaattt  | atgtatgcct  | ggttcttaac  | tatlttttttt | tatataactg  | gtagagtaa   | 1320 |
| tttcttatat  | ttcagtatltt | atlttttaaat | aagtcctcat  | aaattgaaga  | ctlttaaaagt | 1380 |
| ttttgtgtca  | ttcctctttt  | tatlttaagaa | attgaagaat  | tccgctaaat  | ttcatatltt  | 1440 |
| cgctgttatt  | taactgttta  | tttcccttgt  | taatataatt  | ggtaagaagt  | tttaaaaataa | 1500 |
| aggagttaat  | gattlttctag | gttcatggct  | tgcttagctt  | ctacgagtaa  | gcgccatcac  | 1560 |
| gactcccag   | gataaggaaa  | tccgggtcgt  | agcattcact  | cacaaaaatt  | actaaaaaca  | 1620 |
| aagtttacc   | ttctccaaa   | agtaaatttc  | atatttggt   | ccacataatg  | tgttcaatga  | 1680 |
| gtcaagtгаа  | gtactltttca | tgacaaaaaa  | aagttgctga  | aaaatgcata  | tctcatatltt | 1740 |
| tttttttaga  | gaaatcccat  | ttcttgctta  | aacgaaagcc  | tataaaagag  | catatattgc  | 1800 |
| aacaacagtt  | tgacgaaact  | atcaagtcaa  | ataatcccc   | ctlttaattcc | ctccaaaat   | 1860 |
| gcagttcttc  | aacttctltt  | ccctlttct   | ttttgtgtca  | tttctctltt  | tatlttaagaa | 1920 |
| atggaagaat  | tccaatagcc  | aaaccaaag   | attgcctcca  | ggtcccggg   |             | 1969 |

ES 2 665 463 T3

<210> 106  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> *Gossypium hirsutum*

5 <400> 106

Met Asp Gly Tyr Cys Ser Arg Arg Val Ile Met Phe Leu Val Phe Ala  
 1 5 10 15

Phe Ala Ala Ile Ser Arg Gly Tyr Gly Gln Glu Ser Thr Thr Leu Val  
 20 25 30

Pro Ala Ile Ile Thr Phe Gly Asp Ser Val Val Asp Val Gly Asn Asn  
 35 40 45

Asp Tyr Leu Pro Thr Ile Phe Lys Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Arg  
 50 55 60

Asp Phe Ala Asn Lys Lys Pro Thr Gly Arg Phe Cys Asn Gly Lys Leu  
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Ile Thr Ala Glu Thr Leu Gly Phe Thr Thr Tyr Pro Pro  
 85 90 95

Ala Tyr Leu Ser Pro Glu Ala Ser Gly Lys Asn Leu Leu Leu Gly Ala  
 100 105 110

Asn Phe Ala Ser Ala Gly Ser Gly Tyr Asp Asp Lys Ala Ala Met Val  
 115 120 125

Asn His Ala Ile Thr Leu Thr Gln Gln Leu Glu Tyr Phe Lys Glu Tyr  
 130 135 140

Gln Ala Lys Leu Ala Lys Val Ala Gly Ser Thr Lys Ser Ala Ser Ile  
 145 150 155 160

Thr Lys Asp Ala Leu Tyr Val Leu Ser Ala Gly Ser Gly Asp Phe Leu  
 165 170 175

Gln Asn Tyr Tyr Val Asn Pro Leu Leu Asn His Ala Tyr Thr Pro Asp  
 180 185 190

Gln Tyr Gly Ser Phe Leu Ile Asp Thr Phe Thr Asn Phe Val Lys Asn

ES 2 665 463 T3

195 200 205

Leu Tyr Gly Leu Gly Ala Arg Lys Ile Gly Val Thr Ser Leu Pro Pro  
 210 215 220

Leu Gly Cys Val Pro Leu Ala Arg Thr Leu Phe Gly Tyr His Glu Lys  
 225 230 235 240

Gly Cys Ile Ser Arg Phe Asn Thr Asp Ala Gln Gln Phe Asn Lys Lys  
 245 250 255

Leu Asn Ala Ala Ala Ala Asn Leu Gln Lys Gln His Pro Gly Leu Lys  
 260 265 270

Ile Val Val Phe Asp Ile Phe Lys Ala Leu Tyr Asp Ile Val Lys Ser  
 275 280 285

Pro Ser Asn Tyr Gly Phe Val Glu Ala Thr Lys Gly Cys Cys Gly Thr  
 290 295 300

Gly Thr Val Glu Thr Thr Ala Phe Leu Cys Asn Pro Lys Ala Pro Gly  
 305 310 315 320

Thr Cys Ser Asn Ala Ser Gln Tyr Val Phe Trp Asp Ser Val His Pro  
 325 330 335

Ser Gln Ala Ala Asn Gln Val Leu Ala Asp Ala Leu Ile Val Gln Gly  
 340 345 350

Ile Ala Leu Ile  
 355

<210> 107

<211> 645

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 107

Met Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser His Asp Pro Ala Leu Phe His Ala  
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Tyr His Pro Arg Arg Arg Ser Ser Arg Pro Leu Lys Gly  
 20 25 30

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

ES 2 665 463 T3

Leu Ile Val Asn Gln Ser Pro Glu Pro Leu Ala Ser Asn Pro Ser Ser  
50 55 60

Val Thr Glu Ala Gly Ser Tyr Ser Met Ala Ala Gln Pro Arg Gly Ile  
65 70 75 80

Ala Glu Gly Val Ser Ala Lys Ser Asn Pro Ser Leu Phe Asp Lys Val  
85 90 95

Gly Phe Asn Trp Thr Asn Ala Met Phe Tyr Trp Gln Arg Thr Ala Tyr  
100 105 110

His Phe Gln Pro Gln Lys Asn Trp Met Asn Asp Pro Asp Gly Pro Leu  
115 120 125

Tyr His Lys Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asp Ser  
130 135 140

Ala Ile Trp Gly Asn Ile Thr Trp Gly His Ala Val Ser Thr Asp Leu  
145 150 155 160

Ile His Trp Phe Tyr Leu Pro Leu Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr  
165 170 175

Asp Ile Asn Gly Cys Trp Thr Gly Ser Ala Thr Leu Leu Pro Asp Gly  
180 185 190

Arg Ile Val Met Leu Tyr Thr Gly Ser Thr Asn Asp Ser Val Gln Val  
195 200 205

Gln Asn Leu Ala Tyr Pro Ala Asn Leu Ser Asp Pro Leu Leu Leu Gln  
210 215 220

Trp Leu Lys Tyr Pro Gly Asn Pro Val Val Val Pro Pro Thr Gly Ile  
225 230 235 240

Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asp Pro Thr Thr Ala Trp Leu Gly Pro Asp  
245 250 255

Gly Ser Trp Arg Ile Val Val Gly Thr Arg Phe Asn Thr Thr Ile Gly  
260 265 270

Thr Ala Leu Val Phe Gln Thr Thr Asn Phe Ser Asp Tyr Glu Leu Leu  
275 280 285

ES 2 665 463 T3

Asp Gly Val Leu His Ala Val Pro Gly Thr Gly Met Trp Glu Cys Val  
 290 295 300

Asp Phe Tyr Pro Val Ala Ile Asn Gly Ser Val Gly Leu Asp Thr Thr  
 305 310 315 320

Ala Leu Gly Pro Gly Ile Lys His Val Leu Lys Ala Ser Leu Asp Asp  
 325 330 335

Thr Lys Val Asp His Tyr Ala Ile Gly Thr Tyr Asp Met Ile Thr Asp  
 340 345 350

Lys Trp Thr Pro Asp Asn Pro Glu Glu Asp Val Gly Ile Gly Leu Lys  
 355 360 365

Val Asp Tyr Gly Arg Tyr Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Phe Asp Gln Ser  
 370 375 380

Lys Gln Arg Arg Ile Leu Tyr Gly Trp Val Asn Glu Thr Asp Ser Glu  
 385 390 395 400

Ala Asp Asp Leu Glu Lys Gly Trp Ala Ser Ile Gln Thr Ile Pro Arg  
 405 410 415

Ser Val Leu Tyr Asp Asn Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro  
 420 425 430

Val Glu Glu Val Glu Ser Leu Arg Leu Asn Ala Thr Val Phe Lys Asp  
 435 440 445

Val Val Val Glu Ala Gly Ser Val Val Pro Leu Asp Ile Gly Thr Ala  
 450 455 460

Thr Gln Leu Asp Ile Leu Ala Glu Phe Glu Ile Glu Thr Leu Val Leu  
 465 470 475 480

Asn Ser Thr Glu Asp Glu Val Ser Asp Cys Gly Asp Gly Ala Val Asp  
 485 490 495

Arg Ser Thr Tyr Gly Pro Phe Gly Val Leu Val Ile Ala Asp Asp Ser  
 500 505 510

Leu Ser Glu Leu Thr Pro Ile Tyr Phe Arg Pro Leu Asn Thr Ser Asp  
 515 520 525

Gly Ser Leu Glu Thr Tyr Phe Cys Ala Asp Glu Thr Arg Ser Ser Lys

ES 2 665 463 T3

530

535

540

Ala Pro Asp Val Thr Lys Arg Val Tyr Gly Gly Lys Ile Pro Val Leu  
545 550 555 560

Asp Asp Glu Asn Tyr Asn Met Arg Val Leu Val Asp His Ser Val Val  
565 570 575

Glu Ser Phe Gly Gly Gly Gly Arg Thr Val Ile Thr Ser Arg Val Tyr  
580 585 590

Pro Thr Glu Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Arg Leu Phe Leu Phe Asn Asn  
595 600 605

Ala Ser Gly Val Asn Val Lys Ala Thr Leu Lys Ile Trp Glu Met Asn  
610 615 620

Ser Ala Phe Ile Arg Pro Phe Pro Phe Glu Glu Thr Leu Phe Gln Glu  
625 630 635 640

Met Val Ala Ser Thr  
645

<210> 108

<211> 180

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 108

Met Glu Leu Ser Ile Gln Lys Ile Glu Ala Leu Ile Arg Leu Ser Thr  
1 5 10 15

Ile Val Met Leu Val Leu Thr Ala Cys Leu Ile Gly Leu Asp Ser Gln  
20 25 30

Thr Lys Val Ile Phe Tyr Val Gln Lys Lys Ala Ser Phe Lys Asp Leu  
35 40 45

Arg Ala Leu Val Gly Leu Leu Tyr Ile Thr Ser Leu Ala Ala Ala Tyr  
50 55 60

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

Thr Ser Leu Gln Ser Tyr Ala Tyr Leu Ala Trp Leu Arg Tyr Ile Leu  
85 90 95

ES 2 665 463 T3

Asp Gln Ala Val Val Tyr Ala Val Phe Ala Gly Asn Leu Ala Ala Leu  
 100 105 110

Glu His Ser Phe Leu Val Leu Thr Gly Glu Glu Asn Phe Gln Trp Leu  
 115 120 125

Lys Trp Cys Asn Lys Tyr Thr Arg Phe Cys Thr Gln Ile Gly Gly Ser  
 130 135 140

Leu Leu Cys Gly Phe Val Ala Ser Leu Leu Met Phe Ser Ile Ala Ser  
 145 150 155 160

Ile Ser Ala Phe Asn Leu Phe Arg Leu Tyr Ser Pro Thr Lys Phe Met  
 165 170 175

His Leu Lys Leu  
 180

<210> 109

<211> 189

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 109

Met Ala Glu Ile Leu Arg Lys Pro Ser Val Leu Lys Lys Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Gln Val Val Gly Lys Asp Arg Phe Val Val Glu Ser Asp  
 20 25 30

Ile Pro Lys Leu Thr Tyr Leu Gln Ala Val Val Lys Glu Val Phe Arg  
 35 40 45

Leu His Pro Gly Val Pro Leu Ile Ile Pro Arg Arg Thr Asn Glu Ala  
 50 55 60

Cys Glu Val Ala Gly Tyr His Ile Pro Lys His Cys Ile Val Tyr Val  
 65 70 75 80

Asn Val Trp Gly Met Ala Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asp Pro Leu  
 85 90 95

Glu Phe Lys Pro Glu Arg Phe Ile Gly Ser Ser Val Asp Val Lys Gly  
 100 105 110

Gln Asp Phe Asn Leu Leu Pro Phe Gly Thr Gly Arg Arg Ser Cys Val

ES 2 665 463 T3

115

120

125

Gly Trp Pro Leu Ala His Arg Met Val His Tyr Tyr Leu Ala Ala Leu  
130 135 140

Leu His Ala Phe Gln Trp Glu Ser Pro Pro Asp Val Leu Asn Asp Leu  
145 150 155 160

Gly Glu Arg Val Gly Leu Thr Ile Gln Lys Gly Lys Ser Leu Leu Ser  
165 170 175

Thr Pro Lys Pro Arg Leu Pro Ala Ser Val Tyr Glu Arg  
180 185

<210> 110

<211> 468

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 110

Met Ala Ser Leu Pro Phe Ile Phe Phe Leu Ser Phe Phe Ile Ile Ser  
1 5 10 15

Thr Thr Leu Thr Ser Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ile Lys Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Phe Pro His Pro Ser Ser Ser His Pro Tyr Gln Ile Leu  
35 40 45

Asn Asn Leu Val Thr Ser Ser Val Ala Arg Ala His His Leu Lys His  
50 55 60

Pro Lys Ala Lys Ala Asp Asn Thr Thr Ser Ser Leu Leu Arg Ala Pro  
65 70 75 80

Leu Phe Ser His Ser Tyr Gly Gly Tyr Thr Ile Ser Leu Lys Phe Gly  
85 90 95

Thr Pro Pro Gln Thr Leu Pro Phe Val Met Asp Thr Gly Ser Ser Leu  
100 105 110

Ser Trp Phe Pro Cys Thr Ser Arg Tyr Leu Cys Ser Gln Cys Ala Phe  
115 120 125

Pro Asn Val Asp Pro Ala Lys Ile Pro Thr Phe Ala Pro Lys Leu Ser  
130 135 140

ES 2 665 463 T3

Ser Ser Ser Lys Leu Val Gly Cys Arg Asn Pro Lys Cys Ser Trp Leu  
145 150 155 160

Phe Gly Pro Asp Val Glu Ser Arg Cys Gln Asp Cys Glu Pro Thr Ser  
165 170 175

Glu Asn Cys Thr Gln Thr Cys Pro Pro Tyr Ile Ile Gln Tyr Gly Leu  
180 185 190

Gly Ser Thr Ala Gly Leu Leu Leu Val Glu Asn Leu Ala Phe Pro Gln  
195 200 205

Lys Thr Phe Gln Asp Phe Leu Val Gly Cys Ser Ile Leu Ser Asn Arg  
210 215 220

Gln Pro Ala Gly Ile Ala Gly Phe Gly Arg Ser Ala Glu Ser Ile Pro  
225 230 235 240

Ser Gln Leu Gly Leu Lys Lys Phe Ser Tyr Cys Leu Val Ser Arg Arg  
245 250 255

Phe Asp Asp Thr Gly Val Ser Ser Asn Met Leu Leu Glu Thr Gly Ser  
260 265 270

Gly Ser Gly Asp Ala Lys Thr Pro Gly Leu Ser Tyr Thr Pro Phe Tyr  
275 280 285

Arg Asn Gln Val Ala Ser Asn Pro Val Phe Lys Glu Phe Tyr Tyr Val  
290 295 300

Thr Leu Arg Lys Ile Leu Val Gly Asp Lys His Val Lys Val Pro Tyr  
305 310 315 320

Ser Tyr Leu Val Pro Gly Ser Asp Gly Asn Gly Gly Thr Ile Val Asp  
325 330 335

Ser Gly Ser Thr Phe Thr Phe Met Glu Arg Pro Val Phe Glu Val Val  
340 345 350

Ser Lys Glu Phe Glu Lys Gln Met Gly Asn Tyr Arg Arg Val Arg Glu  
355 360 365

Ile Glu Asn Arg Ser Gly Leu Ala Pro Cys Phe Asn Thr Ser Gly Tyr  
370 375 380

ES 2 665 463 T3

Thr Ser Ile Glu Ile Pro Glu Leu Ser Phe Gln Phe Lys Gly Gly Ala  
385 390 395 400

Lys Met Ala Leu Pro Leu Val Asn Tyr Phe Ser Phe Asp Gly Asp Asp  
405 410 415

Lys Val Val Cys Leu Met Ile Val Ser Asn Asn Val Val Gly Gln Gly  
420 425 430

Ser His Ser Gly Pro Ala Ile Ile Leu Gly Ser Phe Gln Gln Gln Asn  
435 440 445

Tyr Tyr Ile Glu Phe Asp Ile Ala Asn Asn Arg Phe Gly Trp Ala Glu  
450 455 460

Arg Ser Cys Ala  
465

<210> 111

<211> 451

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 111

Met Ala Gly Val Glu Ala Gly Lys Glu Glu Glu Ala Thr Ala Val Arg  
1 5 10 15

Ile Thr Gly Lys Ser His Val Lys Pro Gly Lys Leu Ile Gly Arg Lys  
20 25 30

Glu Cys Gln Leu Val Thr Phe Asp Leu Pro Tyr Leu Ala Phe Tyr Tyr  
35 40 45

Asn Gln Lys Leu Leu Phe Tyr Lys Asn Asp Gly Gly Gly Glu Phe Glu  
50 55 60

Asp Lys Val Glu Lys Leu Lys Gly Gly Leu Arg Val Val Leu Glu Glu  
65 70 75 80

Phe Tyr Gln Leu Gly Gly Lys Leu Gly Lys Asp Asp Asp Gly Val Leu  
85 90 95

Arg Val Asp Tyr Asp Asp Asp Met Asp Gly Val Glu Val Val Glu Ala  
100 105 110

Val Ala Glu Gly Ile Thr Val Asp Glu Leu Thr Gly Asp Asp Gly Thr  
115 120 125

ES 2 665 463 T3

Ser Ser Phe Lys Glu Leu Ile Pro Phe Asn Gly Val Leu Asn Leu Glu  
130 135 140

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

Gly Val Ala Met Gly Cys Ala Phe Asn His Ala Ile Leu Asp Gly Thr  
165 170 175

Ser Thr Trp His Phe Met Ser Ser Trp Ala Gln Ile Cys Asn Gly Thr  
180 185 190

Ser Ser Ser Val Val Val Pro Pro Phe Leu Asp Arg Thr Thr Ala Arg  
195 200 205

Asn Thr Arg Val Lys Leu Asp Leu Ser Pro Val Val Ser Cys Asn Gly  
210 215 220

Asp Asp Ala Thr Lys Gln Gly Gln Pro Ala Pro Gln Met Arg Glu Lys  
225 230 235 240

Leu Phe Arg Phe Ser Glu Ala Ala Val Asp Lys Ile Lys Ser Arg Val  
245 250 255

Asn Ser Thr Pro Pro Pro Ser Asp Gly Ser Lys Pro Phe Ser Thr Phe  
260 265 270

Gln Ser Leu Ala Val His Ile Trp Arg His Val Ser Gln Ala Arg Asn  
275 280 285

Leu Lys Pro Glu Asp Tyr Thr Val Phe Thr Val Phe Ala Asp Cys Arg  
290 295 300

Lys Arg Val Asp Pro Pro Met Pro Asp Ser Tyr Phe Gly Asn Leu Ile  
305 310 315 320

Gln Ala Ile Phe Thr Ala Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Glu Asn Pro  
325 330 335

Pro Ser Phe Gly Ala Ser Val Ile Gln Lys Ala Ile Glu Ser His Asp  
340 345 350

Ala Lys Ala Ile Asp Glu Arg Asn Lys Ala Trp Glu Ala Ala Pro Lys  
355 360 365

ES 2 665 463 T3

Ile Phe Gln Phe Lys Asp Ala Gly Val Asn Cys Val Ala Val Gly Ser  
 370 375 380

Ser Pro Arg Phe Lys Val Tyr Glu Val Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro  
 385 390 395 400

Val Gly Val Arg Ser Gly Ser Asn Asn Arg Phe Asp Gly Met Val Tyr  
 405 410 415

Leu Tyr Gln Gly Lys Ser Gly Gly Arg Ser Ile Asp Val Glu Ile Thr  
 420 425 430

Met Glu Ala Gln Ala Met Glu Lys Leu Glu Lys Asp Lys Glu Phe Leu  
 435 440 445

Met Glu Val  
 450

<210> 112

<211> 467

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 112

Met Ser Thr Gln Ser Arg Ala Val Gly Gly Thr Glu His Asn Trp Cys  
 1 5 10 15

Arg Ala Val Val Gly Gly Thr Gly Ile Ala Val Leu Ala Ile Ile Ser  
 20 25 30

Ser Lys Asn Pro Asp Val Ser His Leu Lys Asn Ala Leu His Lys Leu  
 35 40 45

Gln Ile Ser His Pro Ile Leu Arg Ser Arg Leu His Tyr Ser Pro Thr  
 50 55 60

Ala Asn Ser Tyr Ser Phe Val Thr Ser Pro Ser Pro Phe Ile Gln Ile  
 65 70 75 80

Lys Tyr Phe Asn His Ser Thr Thr Cys Gln Ile Leu Glu Asn Asn Gln  
 85 90 95

Asn Ile Ser Pro Leu His Leu Ile Leu Glu His Glu Leu Asn Gln Asn  
 100 105 110

Ala Trp Val Ser Ser Ser Cys Thr Thr Lys His Asp Val Phe Phe Ala

# ES 2 665 463 T3

|                                                                                    |     |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                                                | 120 | 125 |
| Ser Val Tyr Ala Leu Pro Gly Ala Thr Arg Trp Val Leu Val Leu Arg<br>130 135 140     |     |     |
| Leu His Ala Ala Ala Cys Asp Arg Thr Thr Ala Val Ser Leu Leu Arg<br>145 150 155 160 |     |     |
| Glu Leu Leu Thr Leu Met Ala Ile Glu Glu Glu Glu Thr Gly Phe Gln<br>165 170 175     |     |     |
| Gln Gly Gln Lys Glu Ile Thr Met Asn Lys Gly Glu Ile Ser Leu Ala<br>180 185 190     |     |     |
| Met Glu Asp Ile Leu Pro Lys Gly Ile Val Lys Lys Thr Leu Trp Ala<br>195 200 205     |     |     |
| Arg Gly Val Asp Met Leu Ser Tyr Ser Val Asn Ser Leu Arg Phe Thr<br>210 215 220     |     |     |
| Asn Leu Arg Phe Lys Asp Ala Lys Ser Pro Arg Ser Thr Gln Val Val<br>225 230 235 240 |     |     |
| Arg Leu Leu Ile Asn Pro Asp Asp Thr Gln Lys Ile Leu Thr Gly Cys<br>245 250 255     |     |     |
| Lys Ala Arg Gly Ile Lys Leu Cys Gly Ala Leu Gly Ala Ala Gly Leu<br>260 265 270     |     |     |
| Ile Ser Ala His Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asp His Gln Lys Lys Lys<br>275 280 285     |     |     |
| Tyr Gly Val Val Thr Leu Thr Asp Cys Arg Ser Ile Leu Glu Pro Pro<br>290 295 300     |     |     |
| Leu Ser Asn His His Phe Gly Phe Tyr His Ser Ala Ile Leu Asn Thr<br>305 310 315 320 |     |     |
| His Ala Ile Lys Gly Gly Glu Lys Leu Trp Glu Leu Ala Glu Lys Val<br>325 330 335     |     |     |
| Tyr Thr Val Phe Thr His Tyr Lys Ser Cys Asn Lys His Leu Ser Asp<br>340 345 350     |     |     |
| Met Ala Asp Leu Asn Phe Leu Met Cys Arg Ala Met Glu Asn Pro Gly<br>355 360 365     |     |     |

ES 2 665 463 T3

Leu Thr Pro Ser Ala Ser Leu Arg Thr Cys Leu Ile Ser Val Phe Glu  
370 375 380

Asp Thr Val Ile Asp Glu Ser Ser Asn Gln Gln Asn Gln Val Gly Val  
385 390 395 400

Glu Asp Tyr Met Gly Cys Ala Ser Ala His Gly Ile Ala Pro Ser Ile  
405 410 415

Ala Ile Phe Asp Thr Ile Arg Asp Gly Arg Leu Asp Cys Ile Cys Val  
420 425 430

Tyr Pro Ser Pro Leu His Ser Arg Glu Gln Met Gln Glu Leu Val Asp  
435 440 445

Asn Met Lys Cys Ile Leu Val Asp Ala Gly Lys Asn Val Ala Asp Glu  
450 455 460

Thr Glu Ser  
465

<210> 113

<211> 223

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 113

Met Gly Arg Gly Lys Ile Glu Ile Lys Arg Ile Glu Asn Thr Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Gln Val Thr Phe Cys Lys Arg Arg Asn Gly Leu Leu Lys Lys Ala  
20 25 30

Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Ile Val Phe  
35 40 45

Ser Ser Arg Gly Arg Leu Tyr Glu Tyr Ser Asn Asn Asn Ile Arg Ser  
50 55 60

Thr Ile Asp Arg Tyr Lys Lys Ala Cys Ser Asp Thr Ser Asn Thr Asn  
65 70 75 80

Thr Val Thr Glu Ile Asn Ala Gln Tyr Tyr Gln Gln Glu Ser Ala Lys  
85 90 95

ES 2 665 463 T3

Leu Arg Gln Gln Ile Gln Met Leu Gln Asn Ser Asn Arg His Leu Met  
 100 105 110

Gly Asp Ser Leu Ser Ser Leu Thr Val Lys Glu Leu Lys Gln Val Glu  
 115 120 125

Asn Arg Leu Glu Arg Gly Ile Thr Arg Ile Arg Ser Lys Lys His Glu  
 130 135 140

Met Leu Leu Ala Glu Ile Glu Phe Leu Gln Lys Arg Glu Ile Glu Leu  
 145 150 155 160

Glu Asn Glu Ser Val Cys Leu Arg Thr Lys Ile Ala Glu Ile Glu Arg  
 165 170 175

Leu Gln Gln Ala Asn Met Val Thr Gly Pro Glu Leu Asn Ala Ile Gln  
 180 185 190

Ala Leu Ala Ser Arg Asn Phe Phe Ser Pro Asn Val Ile Glu His Pro  
 195 200 205

Ser Ala Tyr Ser His Leu Ser Asp Lys Lys Ile Leu His Leu Gly  
 210 215 220

<210> 114

<211> 310

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 114

Met Asp Val Thr Ser Thr Pro Asn Arg Lys Glu Met Asp Arg Ile Lys  
 1 5 10 15

Gly Pro Trp Ser Pro Glu Glu Asp Asp Leu Leu Gln Gln Leu Val Gln  
 20 25 30

Lys His Gly Pro Arg Asn Trp Ser Leu Ile Ser Lys Ser Ile Pro Gly  
 35 40 45

Arg Ser Gly Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Cys Asn Gln Leu Ser Pro  
 50 55 60

Gln Val Glu His Arg Ala Phe Thr Pro Glu Glu Asp Glu Thr Ile Ile  
 65 70 75 80

Arg Ala His Ala Arg Phe Gly Asn Lys Trp Ala Thr Ile Ala Arg Leu  
 85 90 95

ES 2 665 463 T3

Leu Asn Gly Arg Thr Asp Asn Ala Ile Lys Asn His Trp Asn Ser Thr  
 100 105 110

Leu Lys Arg Lys Cys Leu Pro Val Gly Glu Glu Cys Asn Phe Val Ala  
 115 120 125

Asn Gly Gly Tyr Asp Gly Asn Leu Gly Gly Glu Glu Arg Gln Pro Leu  
 130 135 140

Lys Arg Ser Val Ser Ala Gly Leu Tyr Met Ser Pro Gly Ser Pro Ser  
 145 150 155 160

Gly Ser Asp Val Ser Asp Ser Ser Val Pro Val Leu Ser Ser Ser Tyr  
 165 170 175

Val Tyr Lys Pro Ile Pro Arg Thr Gly Gly Val Asn Val Asp Val Asn  
 180 185 190

Val Thr Pro Ala Gly Val Glu Ala Ala Ser Ser Ser Asn Asp Pro Pro  
 195 200 205

Thr Ser Leu Ser Leu Ser Leu Pro Gly Val Glu Ser Cys Glu Val Val  
 210 215 220

Ser Thr Gln Pro Ile Thr Glu Ser Thr Gln Asn Arg Ser Glu Glu Arg  
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Val Met Gly Phe Ser Ala Glu Phe Met Ala Val Met Gln  
 245 250 255

Glu Met Ile Arg Val Glu Val Arg Asn Tyr Met Thr Gln Met Gln Gln  
 260 265 270

Gln Gln Gln Gln Gln Asn Gly Ala Val Pro Gly Gly Ala Gly Met Gly  
 275 280 285

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

Gly Met Ser Lys Ile Glu  
 305 310

<210> 115

<211> 593

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 115

# ES 2 665 463 T3

Met Gly Gly Pro Pro Tyr Asp Cys Leu Ala Asn Pro Leu Gly Ala Val  
 1 5 10 15

Arg Leu Thr Phe Glu Lys Ala Ile Trp Ser Glu Ser Glu Thr Pro Pro  
 20 25 30

Ile His Pro Ser Ala Phe Asn Gly Lys Asp Trp Gly Ala Leu Glu Leu  
 35 40 45

Phe Arg His Phe Leu Phe Gln Gly Ser Gly Leu Ser Gln Val Pro Ile  
 50 55 60

Leu Asn Pro Lys Thr Leu Arg Trp Val Gln Pro Asn Ser Leu Val Arg  
 65 70 75 80

Tyr Arg Gly Met Ile Gln Asp Met Leu Gly Asn Glu Phe Tyr Ala Gly  
 85 90 95

Ala Tyr Lys Asp Gly Asn Leu Trp Arg Thr Asn Lys Phe Met Asp Val  
 100 105 110

Ser Gln Tyr Pro Met Gly Ser Ser Pro Asp Met Cys Ile Trp Glu Arg  
 115 120 125

Arg Leu Leu Tyr Cys Val Pro Val Pro Gly Gln Asn Ser Trp Thr Glu  
 130 135 140

Pro Ser Ser Glu Met Glu Pro Asn Trp Ser Ser Gln Thr Arg Glu Lys  
 145 150 155 160

Arg Arg Arg Met Asp Asp Glu Asp Asn Asp Pro Met Asp Leu Val Pro  
 165 170 175

Asp Asp Glu Ile Lys Ser Ser Pro Ile Thr Lys Lys Met Arg Glu Asp  
 180 185 190

Gly Leu Pro Ser Pro Ser Gln Ser Arg Asp Thr Lys Thr Thr Ser Ser  
 195 200 205

Ser Ser Ile Thr Ser Thr Phe Gln Ser Val Asp Glu Asp Asn Leu Pro  
 210 215 220

Cys Leu Val Lys Ile Tyr Asp Ser Pro Glu Ser Glu Leu Lys Leu Asn



# ES 2 665 463 T3

Gly Lys Ser Asn Ile Val Pro Ala Asp Val Ile Val Pro Phe Gln Pro  
                                   485                                  490                                  495

Ser Cys Leu Glu Ser Thr Glu Met Pro Val Ala Glu Ala Leu Glu Ala  
                                   500                                  505                                  510

Trp Arg Trp Tyr Leu Ala Thr Val Arg Ser Leu Pro His Ser Ile Gly  
                                   515                                  520                                  525

Ser Glu Ile Gln Lys Val Val Glu Asp Asp Leu Val Ala Ala Arg Gln  
                                   530                                  535                                  540

Met Asp Arg Ser Leu Gly Ser Arg Asp Phe Ser Arg Trp Leu Thr Met  
 545                                  550                                  555                                  560

Ala Arg Leu Ile Ser Ser Ser Phe Gly Glu Thr Ser Leu Ser Lys Glu  
                                   565                                  570                                  575

His Trp Glu Met Ala Lys Glu Met Glu Arg Leu Arg Arg Glu Arg Leu  
                                   580                                  585                                  590

Lys

<210> 116

<211> 89

<212> PRT

5 <213> Gossypium hirsutum

<220>

<221> caract\_misc

<222> (48)..(48)

<223> Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos naturales

10 <400> 116

Met Ser Met Lys Lys Glu Gly Glu Ile Leu Tyr Lys Lys Gly Leu Trp  
   1                                  5                                  10                                  15

Ala Met Glu Glu Asp Lys Leu Leu Ile Asp Tyr Val Asn Val His Gly  
                                   20                                  25                                  30

Lys Gly Gln Trp Asn Lys Ile Ala Asn Arg Thr Gly Leu Lys Arg Xaa  
                                   35                                  40                                  45

Gly Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Met Asn Tyr Leu Ser Pro Asn Val  
                                   50                                  55                                  60

Lys Lys Gly Asp Phe Ser Glu Glu Glu Glu Asp Leu Val Ile Arg Leu  
 65                                  70                                  75                                  80

His Lys Leu Leu Glu Thr Gly Gly Leu  
                                   85

<210> 117

ES 2 665 463 T3

<211> 628  
 <212> PRT  
 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 117

Met Ser Thr Gly Val Gln His Gln Glu Arg Val Pro Met Asn Leu Lys  
 1 5 10 15

Lys Gln Leu Ala Leu Ala Val Arg Asn Ile Gln Trp Ser Tyr Ala Ile  
 20 25 30

Phe Trp Ser Ile Ser Thr Arg Gln Pro Gly Val Leu Glu Trp Gly Glu  
 35 40 45

Gly Tyr Tyr Asn Gly Asp Ile Lys Thr Arg Lys Thr Val Gln Ser Val  
 50 55 60

Glu Leu Asn Thr Asp Gln Leu Ser Leu Gln Arg Ser Glu Gln Leu Arg  
 65 70 75 80

Gln Leu Tyr Glu Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ser Ser Pro Gln Ala Lys  
 85 90 95

Arg Pro Ser Ala Ala Leu Ser Pro Glu Asp Leu Thr Asp Thr Glu Trp  
 100 105 110

Tyr Tyr Leu Val Cys Met Ser Phe Val Phe Asn Ile Gly Gln Gly Leu  
 115 120 125

Pro Gly Arg Thr Leu Ser Thr Gly Gln Pro Val Trp Leu Cys Asn Ala  
 130 135 140

His Cys Ala Asp Ser Lys Val Phe Gly Arg Ser Leu Leu Ala Lys Ser  
 145 150 155 160

Ala Ser Ile Gln Thr Ala Val Cys Phe Pro Phe Ser Gly Gly Val Val  
 165 170 175

5

ES 2 665 463 T3

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

ES 2 665 463 T3

420 425 430

Glu Ile Cys Gly Asn His Val Leu Ser Glu Arg Lys Arg Arg Glu Lys  
435 440 445

Ile Asn Glu Arg Leu Met Met Leu Lys Ser Leu Val Pro Ala Asn Asn  
450 455 460

Lys Ala Asp Lys Val Ser Ile Leu Asp Val Thr Ile Glu Tyr Leu Gln  
465 470 475 480

Thr Leu Glu Arg Arg Val Ala Glu Leu Glu Ser Cys Arg Lys Ser Glu  
485 490 495

Ala Arg Thr Lys Ile Glu Arg Thr Ser Asp Asn Tyr Gly Asn Asn Lys  
500 505 510

Thr Asn Asn Gly Lys Lys Ser Ser Leu Ser Lys Arg Lys Ala Tyr Asp  
515 520 525

Val Val Asp Glu Ala Asp Gln Glu Ile Gly Tyr Val Ala Ser Lys Asp  
530 535 540

Gly Ser Thr Asp Lys Val Thr Leu Ser Met Asn Asn Lys Glu Leu Leu  
545 550 555 560

Ile Glu Phe Lys Cys Pro Trp Arg Glu Gly Ile Leu Leu Glu Val Met  
565 570 575

Asp Ala Leu Ser Ile Leu Asn Leu Asp Cys His Ser Val Gln Ser Ser  
580 585 590

Thr Thr Glu Gly Ile Leu Ser Leu Thr Ile Lys Ser Lys Tyr Lys Gly  
595 600 605

Ser Ser Val Ala Lys Ala Gly Pro Ile Glu Gln Ala Leu Gln Arg Ile  
610 615 620

Ala Ser Lys Cys  
625

<210> 118

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Gossypium hirsutum

<400> 118

ES 2 665 463 T3

Met Ala Ser Ser Gly Val Leu Lys Leu Val Ser Met Ile Leu Met Val  
1 5 10 15

Cys Met Thr Met Met Ser Ala Pro Lys Ala Ala Lys Ala Ala Ile Thr  
20 25 30

Cys Ser Asp Val Val Asn His Leu Ile Pro Cys Leu Ser Tyr Val Gln  
35 40 45

Asn Gly Gly Thr Pro Ala Ala Ala Cys Cys Ser Gly Val Lys Ala Leu  
50 55 60

Tyr Gly Glu Val Gln Thr Ser Pro Asp Arg Gln Asn Val Cys Lys Cys  
65 70 75 80

Ile Lys Ser Ala Val Asn Gly Ile Pro Tyr Thr Ser Asn Asn Leu Asn  
85 90 95

Leu Ala Ala Gly Leu Pro Ala Lys Cys Gly Leu Gln Leu Pro Tyr Ser  
100 105 110

Ile Ser Pro Ser Thr Asp Cys Asn Lys Val Gln  
115 120

<210> 119

<211> 362

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 119

Met Ala Asn His Thr Val Thr Phe Leu Pro Lys Leu Ser Ile Glu Ala  
1 5 10 15

Ile Gln Thr Val Thr Pro Met Arg Ile Thr Glu Pro Arg Gln Thr Arg  
20 25 30

Gln Val Leu Ala Gly Glu Leu Val Gly Pro Gly Ile Phe Gln Arg Cys  
35 40 45

Leu Asn Val Val Gln Tyr Tyr Met Lys Glu Lys Glu Glu Asp Ser Gly  
50 55 60

Trp Leu Leu Ala Gly Trp Ile Lys Glu Thr Leu Gly Arg Ala Leu His  
65 70 75 80

Glu Gln Pro Met Ile Ser Gly Arg Leu Arg Lys Gly Glu Arg Asn Asp

ES 2 665 463 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95 |
| Gly | Glu | Leu | Glu | Ile | Val | Ser | Asn | Asp | Cys | Gly | Ile | Arg | Leu | Ile | Glu |    |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |    |
| Ala | Arg | Ile | Gln | Met | Asn | Leu | Ser | Asp | Phe | Leu | Asp | Leu | Lys | Gln | Arg |    |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |    |
| Glu | Asp | Ala | Glu | Ala | Gln | Leu | Val | Phe | Trp | Lys | Asp | Ile | Asp | Glu | Gln |    |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |    |
| Asn | Pro | Gln | Phe | Ser | Pro | Leu | Phe | Tyr | Val | Gln | Val | Thr | Asn | Phe | Gln |    |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |    |
| Cys | Gly | Gly | Tyr | Ser | Ile | Gly | Ile | Ser | Cys | Ser | Ile | Leu | Leu | Ala | Asp |    |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |    |
| Leu | Leu | Leu | Met | Lys | Glu | Phe | Leu | Lys | Thr | Trp | Ala | Asp | Ile | His | Asn |    |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |    |
| Lys | Val | Ile | Ile | Asn | Lys | Asn | Asp | Glu | Gln | Lys | Leu | Pro | Leu | Phe | Tyr |    |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |    |
| Leu | Pro | Gly | Leu | Lys | Asn | Thr | Asn | Gly | Ala | Ser | Pro | Asn | Ile | Ile | Thr |    |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |    |
| Ser | Asn | Ser | Ser | Lys | Asn | Ser | Ala | Lys | Thr | Met | Ile | Phe | Gln | Ile | Gln |    |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |    |
| Ala | Glu | Thr | Glu | Ser | Pro | Gly | Ser | Asp | Trp | Cys | Arg | Lys | Met | Ala | Leu |    |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |    |
| Ala | Cys | Leu | Glu | Glu | Ala | Glu | Ser | Asn | Leu | Gly | Ser | Val | Val | Gly | Gly |    |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |    |
| Glu | Phe | Ser | Leu | Phe | Val | Asn | Glu | Ser | Phe | Glu | Ser | Ile | Lys | Val | Glu |    |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |    |
| Ser | Cys | Ser | Lys | Gln | Gly | Met | Ser | Lys | Glu | Ala | Glu | Met | Gly | Val | Leu |    |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |    |
| Asn | Arg | Ala | Lys | Trp | Asp | Asp | Leu | Gly | Ala | Asn | Glu | Val | Ser | Phe | Gly |    |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |    |
| Asp | Gly | Asn | Lys | Pro | Ala | His | Val | Ser | Tyr | Trp | Leu | Arg | Ser | Thr | Leu |    |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |    |

ES 2 665 463 T3

Gly Gly Leu Ile Ile Val Ile Pro Ser Leu Gln Glu Asp Lys Tyr Thr  
 340 345 350

Val Asn Ile Ile Val Thr Ile Pro Ser Lys  
 355 360

<210> 120

<211> 497

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 120

Met Gly Phe Gln Arg Asn Ile Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ile Leu Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Ser Leu Ser Ser Ser Leu Pro Ser Glu Tyr Ser Ile Val  
 20 25 30

Glu His Glu Ile Asp Ala Phe Leu Ser Glu Glu Arg Val Leu Glu Ile  
 35 40 45

Phe Gln Gln Trp Lys Glu Lys Asn Gln Lys Val Tyr Arg Gln Ala Glu  
 50 55 60

Glu Ala Glu Lys Arg Phe Glu Asn Phe Lys Gly Asn Leu Lys Tyr Ile  
 65 70 75 80

Leu Glu Arg Asn Ala Lys Arg Lys Ala Asn Lys Trp Glu His His Val  
 85 90 95

Gly Leu Asn Lys Phe Ala Asp Met Ser Asn Glu Glu Phe Arg Lys Ala  
 100 105 110

Tyr Leu Ser Lys Val Lys Lys Pro Ile Asn Lys Gly Ile Thr Leu Ser  
 115 120 125

Arg Asn Met Arg Arg Lys Val Gln Ser Cys Asp Ala Pro Ser Ser Leu  
 130 135 140

Asn Trp Arg Asn Tyr Gly Val Val Thr Ala Val Lys Asp Gln Gly Ser  
 145 150 155 160

Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ser Thr Gly Ala Met Glu Gly Ile  
 165 170 175

ES 2 665 463 T3

Asn Ala Leu Val Thr Gly Asp Leu Ile Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu  
 180 185 190

Val Asp Cys Asp Thr Ser Asn Tyr Gly Cys Glu Gly Gly Tyr Met Asp  
 195 200 205

Tyr Ala Phe Glu Trp Val Ile Asn Asn Gly Gly Ile Asp Ser Glu Thr  
 210 215 220

Asp Tyr Pro Tyr Thr Gly Val Asp Gly Thr Cys Asn Thr Thr Lys Glu  
 225 230 235 240

Glu Thr Lys Val Val Ser Ile Asp Gly Tyr Gln Asp Val Glu Gln Ser  
 245 250 255

Asp Ser Ala Leu Leu Cys Ala Val Ala Gln Gln Pro Val Ser Val Gly  
 260 265 270

Ile Asp Gly Ser Ala Ile Asp Phe Gln Leu Tyr Thr Gly Gly Ile Tyr  
 275 280 285

Asp Gly Ser Cys Ser Asp Asp Pro Asp Asp Ile Asp His Ala Val Leu  
 290 295 300

Ile Val Gly Tyr Gly Ser Glu Gly Ser Glu Glu Tyr Trp Ile Val Lys  
 305 310 315 320

Asn Ser Trp Gly Thr Ser Trp Gly Ile Asp Gly Tyr Phe Tyr Leu Lys  
 325 330 335

Arg Asp Thr Asp Leu Pro Tyr Gly Val Cys Ala Val Asn Ala Met Ala  
 340 345 350

Ser Tyr Pro Thr Lys Glu Ser Ser Ser Pro Ser Pro Tyr Pro Ser Pro  
 355 360 365

Ser Val Pro Pro Pro Pro Pro Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
 370 375 380

Pro Ser Pro Ser Pro Ser Asp Cys Gly Asp Phe Ser Tyr Cys Ser Ser  
 385 390 395 400

Asp Glu Thr Cys Cys Cys Leu Phe Glu Phe Tyr Asp Tyr Cys Leu Ile  
 405 410 415

Tyr Gly Cys Cys Glu Tyr Glu Asn Ala Val Cys Cys Thr Gly Thr Glu

ES 2 665 463 T3

420

425

430

Tyr Cys Cys Pro Ser Asp Tyr Pro Ile Cys Asp Val Gln Glu Gly Leu  
435 440 445

Cys Leu Lys Asn Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Val Ala Ala Arg Lys Arg  
450 455 460

Lys Val Ala Lys His Lys Leu Pro Trp Thr Lys Ile Glu Glu Thr Glu  
465 470 475 480

Ile Thr Tyr Gln Pro Leu Gln Trp Lys Arg Asn Pro Phe Ala Ala Met  
485 490 495

Arg

<210> 121

<211> 335

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 121

Met Lys Val Leu Ser Pro Ile Leu Ala Cys Leu Ala Leu Ala Val Val  
1 5 10 15

Val Ser His Ala Ala Leu Ser Pro Glu Gln Tyr Trp Ser Tyr Lys Leu  
20 25 30

Pro Asn Thr Pro Met Pro Lys Ala Val Lys Glu Ile Leu His Pro Glu  
35 40 45

Leu Met Glu Glu Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Gly Gly Gly Gly Val  
50 55 60

Asn Val Asn Thr Gly Lys Gly Lys Pro Gly Gly Asp Thr His Val Asn  
65 70 75 80

Val Gly Gly Lys Gly Val Gly Val Asn Thr Gly Lys Pro Gly Gly Gly  
85 90 95

Thr His Val Asn Val Gly Asp Pro Phe Asn Tyr Leu Tyr Ala Ala Ser  
100 105 110

Glu Thr Gln Ile His Glu Asp Pro Asn Val Ala Leu Phe Phe Leu Glu  
115 120 125

ES 2 665 463 T3

Lys Asp Met His Pro Gly Ala Thr Met Ser Leu His Phe Thr Glu Asn  
 130 135 140

Thr Glu Lys Ser Ala Phe Leu Pro Tyr Gln Thr Ala Gln Lys Ile Pro  
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Asp Lys Leu Pro Glu Ile Phe Asn Lys Phe Ser Val Lys  
 165 170 175

Pro Gly Ser Val Lys Ala Glu Met Met Lys Asn Thr Ile Lys Glu Cys  
 180 185 190

Glu Gln Pro Ala Ile Glu Gly Glu Glu Lys Tyr Cys Ala Thr Ser Leu  
 195 200 205

Glu Ser Met Ile Asp Tyr Ser Ile Ser Lys Leu Gly Lys Val Asp Gln  
 210 215 220

Ala Val Ser Thr Glu Val Glu Lys Gln Thr Pro Met Gln Lys Tyr Thr  
 225 230 235 240

Ile Ala Ala Gly Val Gln Lys Met Thr Asp Asp Lys Ala Val Val Cys  
 245 250 255

His Lys Gln Asn Tyr Ala Tyr Ala Val Phe Tyr Cys His Lys Ser Glu  
 260 265 270

Thr Thr Arg Ala Tyr Met Val Pro Leu Glu Gly Ala Asp Gly Thr Lys  
 275 280 285

Ala Lys Ala Val Ala Val Cys His Thr Asp Thr Ser Ala Trp Asn Pro  
 290 295 300

Lys His Leu Ala Phe Gln Val Leu Lys Val Glu Pro Gly Thr Ile Pro  
 305 310 315 320

Val Cys His Phe Leu Pro Arg Asp His Ile Val Trp Val Pro Lys  
 325 330 335

<210> 122

<211> 302

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 122

Met Glu Arg Gln Arg Ser Lys Gln Val Cys Leu Leu Met Trp Val Leu

ES 2 665 463 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Val | Ala | Ala | Phe | Phe | Ser | His | Asn | Arg | Val | Ile | Ala | Val | Thr | Ser | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Leu | Gly | Glu | Gln | Lys | Asn | Tyr | Tyr | Pro | Ala | Pro | Asp | Pro | His | Ala |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Thr | Pro | Pro | Ser | Gly | Ser | His | Gly | Thr | Pro | Pro | Ser | Ser | Gly | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Pro | Pro | Ser | His | Gly | Thr | Pro | Ser | His | Gly | Gly | Gly | Tyr | His |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Pro | Ser | Pro | Thr | Pro | Ser | Thr | Pro | Ser | Gly | Gly | Asn | Cys | Gly | Thr | Pro |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Pro | His | Asp | Pro | Ser | Thr | Pro | Ser | Thr | Pro | Ser | His | Thr | Pro | Pro | His |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Thr | Pro | Pro | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Ser | Pro | Pro | Ser | Tyr | Gly | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Gly | Ser | Pro | Pro | Ser | Tyr | Gly | Gly | Gly | Ser | Pro | Pro | Ser | Tyr | Gly | Gly |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Pro | Pro | Ser | Tyr | Gly | Gly | Gly | Ser | Pro | Pro | Ser | Tyr | Gly | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Gly | Ser | Pro | Pro | Thr | Thr | Pro | Ile | Asp | Pro | Gly | Thr | Pro | Ser | Ile | Pro |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Pro | Pro | Phe | Phe | Pro | Ala | Pro | Thr | Pro | Pro | Ile | Gly | Gly | Thr | Cys |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Asp | Phe | Trp | Arg | Ser | His | Pro | Thr | Leu | Ile | Trp | Gly | Leu | Leu | Gly | Trp |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Trp | Gly | Thr | Val | Gly | Asn | Ala | Phe | Gly | Val | Thr | Asn | Ala | Pro | Gly | Leu |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Gly | Thr | Ser | Met | Ser | Leu | Pro | Gln | Ala | Leu | Ser | Asn | Thr | Arg | Thr | Asp |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Leu | Gly | Ala | Leu | Tyr | Arg | Glu | Gly | Thr | Ala | Ser | Phe | Leu | Asn | Ser |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |

ES 2 665 463 T3

Met Val Asn Asn Arg Phe Pro Phe Ser Thr Lys Gln Val Arg Glu Thr  
 260 265 270

Phe Val Ala Ala Leu Gly Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ala Gln Ala Arg  
 275 280 285

Leu Phe Lys Leu Ala Asn Glu Gly His Leu Lys Pro Arg Thr  
 290 295 300

<210> 123

<211> 196

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 123

Met Met Lys Arg Gly Phe Ile Val Leu Ala Leu Thr Val Val Phe Ala  
 1 5 10 15

Ala Thr Val Val Thr Ala Ala Asp Glu Ser Gly Leu Ala Asn Glu Cys  
 20 25 30

Ser Lys Asp Phe Gln Ser Val Met Thr Cys Leu Ser Phe Ala Gln Gly  
 35 40 45

Lys Ala Ala Ser Pro Ser Lys Glu Cys Cys Asn Ser Val Ala Gly Ile  
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Pro Lys Cys Leu Cys Tyr Ile Leu Gln Gln Thr Gln  
 65 70 75 80

Thr Ser Gly Ala Gln Asn Leu Lys Ser Leu Gly Val Gln Glu Asp Lys  
 85 90 95

Leu Phe Gln Leu Pro Ser Ala Cys Gln Leu Lys Asn Ala Ser Val Ser  
 100 105 110

Asp Cys Pro Lys Leu Leu Gly Leu Ser Pro Ser Ser Pro Asp Ala Ala  
 115 120 125

Ile Phe Thr Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Pro Ser Thr Ser Thr  
 130 135 140

Thr Thr Ala Thr Pro Ser Ser Ala Ala Asp Lys Thr Asp Ser Lys Ser  
 145 150 155 160

ES 2 665 463 T3

Ser Gly Ile Lys Leu Gly Pro His Phe Val Gly Ser Thr Ala Ala Leu  
 165 170 175

Leu Val Ala Thr Ala Ala Val Phe Phe Leu Val Phe Pro Ala Gly Phe  
 180 185 190

Ala Ser Ile Val  
 195

<210> 124

<211> 629

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 124

Met Pro Val Val Asp Phe Ala Cys Val Phe Leu Val Ser Val Val Met  
 1 5 10 15

Phe Asn Leu Arg Val Ser Thr Glu Pro Val Glu Asp Lys Gln Ala Leu  
 20 25 30

Leu Ala Phe Ile Ser Gly Ile Arg His Ala Asp Arg Val Lys Trp Asn  
 35 40 45

Ser Ser Thr Ser Ala Cys Asp Trp Phe Gly Val Gln Cys Asp Ala Asn  
 50 55 60

Arg Ser Phe Val Tyr Thr Leu Arg Val Pro Gly Trp Gly Pro Tyr Gly  
 65 70 75 80

Val Arg Phe Arg Pro Lys Gln Ile Gly Arg Leu Asn Arg Leu Arg Val  
 85 90 95

Leu Ser Leu Arg Ala Asn Arg Leu Ser Gly Glu Ile Pro Ala Asp Phe  
 100 105 110

Tyr Asn Leu Thr Gln Leu Arg Ser Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Glu Phe  
 115 120 125

Thr Gly Pro Phe Pro Pro Ser Val Thr Arg Leu Thr Arg Leu Thr Arg  
 130 135 140

Leu Asp Leu Ser Ser Asn Asn Phe Thr Gly Pro Ile Pro Leu Gly Val  
 145 150 155 160

Asn Asn Leu Thr Gln Leu Thr Lys Leu Phe Leu Gln Asn Asn Lys Phe  
 165 170 175

ES 2 665 463 T3

Ser Gly Ser Leu Pro Ser Ile Asp Ser Asp Gly Leu Asn Asp Phe Asn  
180 185 190

Val Ser Asn Asn Asn Leu Lys Gly Ser Ile Pro Asp Ser Leu Ser Lys  
195 200 205

Phe Pro Glu Ser Ser Phe Ala Gly Asn Ile Gly Leu Cys Gly Gly Pro  
210 215 220

Leu Arg Pro Cys Asn Pro Phe Pro Pro Ser Pro Ser Pro Thr Glu Pro  
225 230 235 240

Ile Pro Pro Lys Thr Ser Gly Gln Ser Ser Lys Ser Leu Pro Thr Gly  
245 250 255

Ala Ile Ile Ala Ile Ala Val Gly Ser Ala Ile Val Ala Leu Leu Leu  
260 265 270

Leu Leu Phe Leu Ile Ile Cys Phe Arg Lys Trp Lys Arg Lys Ser Pro  
275 280 285

Arg Arg Gln Lys Ala Ile Pro Ser Thr Thr His Ala Leu Pro Val Glu  
290 295 300

Glu Ala Gly Thr Ser Ser Ser Lys Asp Asp Ile Thr Gly Gly Ser Thr  
305 310 315 320

Glu Ile Glu Arg Met Met Asn Asn Lys Leu Met Phe Phe Lys Gly Gly  
325 330 335

Val Tyr Ser Phe Asp Leu Glu Asp Leu Met Arg Ala Ser Ala Glu Met  
340 345 350

Leu Gly Lys Gly Ser Thr Gly Thr Ser Tyr Arg Val Val Leu Ala Val  
355 360 365

Gly Thr Thr Val Ala Val Lys Arg Leu Lys Asp Val Ala Val Ser Lys  
370 375 380

Arg Glu Phe Val Met Lys Met Gly Met Leu Gly Lys Ile Met His Glu  
385 390 395 400

Asn Val Val Pro Leu Arg Ala Phe Tyr Tyr Ser Asp Glu Glu Lys Leu  
405 410 415

ES 2 665 463 T3

Leu Val Tyr Asp Tyr Met His Gly Gly Ser Leu Phe Ala Leu Leu His  
 420 425 430

Gly Ser Arg Ser Ser Ala Arg Thr Pro Leu Glu Trp Asp Pro Arg Met  
 435 440 445

Lys Ile Ala Leu Gly Val Ala Arg Gly Leu Ala His Leu His Ser Ser  
 450 455 460

Gln Asn Met Val His Gly Asn Ile Lys Ser Ser Asn Ile Leu Leu Arg  
 465 470 475 480

Pro Asp His Glu Ala Cys Ile Ser Glu Phe Gly Leu Asn Ser Leu Phe  
 485 490 495

Asn Thr Asn Thr Pro Pro Ser Arg Ile Ala Gly Tyr Gln Ala Pro Glu  
 500 505 510

Val Ile Gln Thr His Lys Val Thr Val Lys Ser Asp Val Tyr Ser Phe  
 515 520 525

Gly Val Leu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Gly Arg Ala Pro Ile Gln Pro  
 530 535 540

Ser Ile Thr Glu Glu Gly Phe Asp Leu Pro Arg Trp Val Gln Ser Val  
 545 550 555 560

Val Arg Glu Glu Trp Ala Ala Glu Val Phe Asp Ala Glu Leu Met Ala  
 565 570 575

Tyr His Asp Ile Glu Glu Glu Met Val Gln Ala Leu Gln Met Ala Met  
 580 585 590

Val Cys Val Ser Thr Val Pro Asp Gln Arg Pro Val Met Ser Glu Val  
 595 600 605

Val Arg Met Ile Gly Asp Met Ile Asp Arg Gly Gly Thr Asn Asp Gly  
 610 615 620

Thr Ala Ala Ala Ile  
 625

<210> 125

<211> 545

<212> PRT

5 <213> Gossypium hirsutum

<400> 125

ES 2 665 463 T3

Met Ala Glu Met Ser Thr Leu Cys Thr Phe Leu Phe Ser Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Phe Ala Ser His Pro Leu Ile Leu Pro Thr Ala Ala Asp Gly Arg Trp  
20 25 30

Gln Leu Leu Gln Lys Ser Ile Gly Ile Ser Ser Met His Met Gln Leu  
35 40 45

Leu Lys Asn Asp Arg Val Val Met Tyr Asp Arg Thr Asp Phe Gly Pro  
50 55 60

Ser Thr Leu Pro Leu Ala Ser Gly Lys Cys His Asn Asp Pro Thr Asn  
65 70 75 80

Thr Ala Val Gln Val Asp Cys Thr Ala His Ser Val Glu Tyr Asp Val  
85 90 95

Leu Ser Asn Lys Phe Arg Ala Leu Thr Val Gln Ser Asn Val Trp Cys  
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Val Met Pro Asp Gly Lys Leu Val Gln Thr Gly Gly  
115 120 125

Phe Ser Glu Gly Glu Leu Arg Val Arg Val Phe Ser Pro Cys Glu Ser  
130 135 140

Cys Asp Trp His Glu Thr Pro Asn Gly Leu Ala Ala Lys Arg Trp Tyr  
145 150 155 160

Ala Thr Asn His Val Leu Pro Asp Gly Arg Gln Ile Val Val Gly Gly  
165 170 175

Arg Glu Gln Phe Asn Tyr Glu Phe Val Pro Lys Asn Ile Ala Ala Asp  
180 185 190

Thr Phe Lys Leu His Phe Leu Ser Glu Thr Asn Glu Arg Gly Val Glu  
195 200 205

Asn Asn Leu Tyr Pro Phe Val Phe Leu Asn Val Asp Gly Asn Leu Phe  
210 215 220

Ile Phe Ala Asn Asn Arg Ala Ile Leu Leu Asp Tyr Val Asn Asn Lys  
225 230 235 240

ES 2 665 463 T3

Val Val Lys Thr Tyr Pro Lys Ile Pro Gly Gly Glu Pro Arg Ser Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Thr Gly Ser Ala Val Leu Leu Pro Leu Lys Asn Leu Thr Ala  
 260 265 270

Ala Thr Ile Gln Ala Glu Val Leu Val Cys Gly Gly Ala Pro Lys Gly  
 275 280 285

Ser Phe Val Gln Ala Leu Gln Gly Lys Phe Val Lys Ala Leu Asn Thr  
 290 295 300

Cys Ala Arg Ile Ser Ile Thr Asp Pro Lys Pro Lys Trp Val Leu Glu  
 305 310 315 320

Thr Met Pro Leu Ala Arg Val Met Gly Asp Met Val Leu Leu Pro Asn  
 325 330 335

Gly Lys Val Leu Val Ile Asn Gly Ala Arg Ser Gly Ser Ala Gly Trp  
 340 345 350

Asp Leu Gly Arg Asp Pro Val Leu Asn Pro Val Leu Tyr Met Pro Asp  
 355 360 365

Asn Glu Ile Glu Ser Arg Phe Lys Ile Leu Asn Pro Thr Lys Ile Pro  
 370 375 380

Arg Met Tyr His Ser Thr Ala Val Leu Leu Arg Asp Gly Arg Val Leu  
 385 390 395 400

Val Gly Gly Ser Asn Pro His Ala Tyr Tyr Asn Phe Thr Gly Val Leu  
 405 410 415

Tyr Pro Thr Glu Leu Ser Leu Glu Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Asp  
 420 425 430

Ala Lys Phe Asn Asn Leu Arg Pro Thr Ile Val Ala Pro Lys Ser Met  
 435 440 445

Ser Gly Ile Arg Tyr Asn Lys Lys Leu Lys Ile Lys Val Val Ile Thr  
 450 455 460

Gly Glu Val Thr Leu Asn Leu Leu Ser Val Thr Met Val Ser Pro Ala  
 465 470 475 480

ES 2 665 463 T3

Phe Asn Thr His Ser Phe Ser Met Asn Gln Arg Leu Leu Val Leu Gly  
 485 490 495

Asn Asp Lys Val Met Ala Ser Gly Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Glu Val  
 500 505 510

Met Thr Pro Gly Ser Gly Asn Leu Ala Pro Ala Gly Phe Tyr Leu Leu  
 515 520 525

Phe Val Val His Gln Asp Ile Pro Ser Gln Gly Ile Trp Val His Leu  
 530 535 540

Lys  
 545

<210> 126

<211> 508

<212> PRT

5 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 126

Met Gln Ile Leu Pro Phe Arg Gly Gly Ala Leu Val Cys Phe Ile Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Phe Val Ala Ser Phe Cys Asn Ala Asp Ala Lys Thr Val  
 20 25 30

Glu Val Val Gly Ala Gly Glu Cys Ala Asp Cys Ala Glu Asn Asn Leu  
 35 40 45

Glu Ile Ser Gln Ala Phe Ser Gly Leu Arg Val Ser Ile Asp Cys Lys  
 50 55 60

Pro Glu Asn Gly Lys Asn Phe Lys Thr Arg Gly Ser Gly Glu Leu Asp  
 65 70 75 80

Lys Gln Gly Asn Phe Lys Val Phe Val Pro Glu Asp Leu Val Glu Asn  
 85 90 95

Gly Glu Leu Lys Glu Glu Cys Tyr Ala Gln Leu His Ser Val Ser Ala  
 100 105 110

Ala Pro Cys Pro Ala His Asp Gly Leu Glu Ser Ala Lys Leu Val Leu  
 115 120 125

Lys Ser Arg Ser Asp Gly Lys His Gly Phe Gly Leu Lys Gly Lys Leu

ES 2 665 463 T3

130 135 140

Arg Phe Ser Pro Leu Thr Cys Ala Ser Ala Phe Phe Trp Pro His Phe  
 145 150 155 160

Lys Phe Pro Pro Leu Pro Lys Trp Asn His Pro Pro Leu Pro Lys Phe  
 165 170 175

Pro Leu Pro Pro Phe Lys Gly Phe His His His Tyr Pro Ile Ile Pro  
 180 185 190

Pro Ile Tyr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Pro Ser Pro Val Tyr Lys Pro  
 195 200 205

Pro Pro Val Pro Val Asn Pro Pro Val Pro Ile Tyr Lys Pro Pro Pro  
 210 215 220

Val Pro Val Tyr Lys Pro Pro Pro Val Pro Val Lys Pro Leu Pro Pro  
 225 230 235 240

Pro Val Pro Ile Tyr Lys Pro Pro Pro Val Glu Lys Pro His Pro Pro  
 245 250 255

Pro Val Pro Val Tyr Lys Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys Lys Pro  
 260 265 270

Cys Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys Ser Pro Pro Val Pro Val Tyr  
 275 280 285

Lys Lys Pro His Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys Lys Pro His Pro  
 290 295 300

Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys Lys Pro Cys Pro Pro Pro Val Pro Val  
 305 310 315 320

Tyr Lys Ser Pro Pro Val Pro Glu Pro His Pro Pro Pro Val Pro Val  
 325 330 335

Tyr Lys Lys Pro His Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys Lys Pro Cys  
 340 345 350

Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys Ser Pro Pro Val Pro Glu Pro His  
 355 360 365

Pro Pro Pro Val Pro Val His Lys Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Lys  
 370 375 380

# ES 2 665 463 T3

Lys Arg Val Pro Pro Pro Val Pro Ile Tyr Lys Pro Pro Pro Val Pro  
385 390 395 400

Val Tyr Asn Lys Pro Leu Pro Pro Pro Val Pro Val Tyr Thr Lys Pro  
405 410 415

Leu Pro Pro Pro Val Pro Thr Tyr Lys Pro Lys Pro Leu Pro Pro Ile  
420 425 430

Pro Tyr Lys Pro Leu Pro Pro Leu Pro Lys Ile Pro Pro Phe Pro Lys  
435 440 445

Lys Pro Cys Pro Pro Leu Pro Lys Leu Pro Pro Leu Pro Lys Ile Pro  
450 455 460

Pro Lys Tyr Phe His His His Pro Pro Leu Pro Lys Leu Pro Pro Leu  
465 470 475 480

Pro Lys Ile Pro Pro Lys Tyr Phe His His His Pro Lys Phe Gly Lys  
485 490 495

Trp Pro Ser Leu Pro Pro Phe Ala Pro His His Pro  
500 505

66

1

## REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar el alargamiento de la fibra de una planta, método que comprende expresar en la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7, en donde dicho polinucleótido es capaz de regular el desarrollo de la fibra de algodón, mejorando de este modo el alargamiento de la fibra de la planta, en donde dicha mejora de dicho alargamiento de la fibra es en una planta productora de fibra.
2. Un método para mejorar el alargamiento de la fibra de una planta, método que comprende expresar en la planta un polinucleótido exógeno que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 112, mejorando de este modo el alargamiento de la fibra de la planta, en donde dicha mejora de dicho alargamiento de fibra es en una planta productora de fibra.
3. Una célula vegetal transgénica que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7, y un promotor capaz de regular la expresión de dicho polinucleótido en la célula vegetal transgénica, en donde dicho promotor es heterólogo a la célula vegetal transgénica, en donde dicho polinucleótido y célula vegetal transgénica mejora el alargamiento de la fibra de una planta productora de fibra de una planta.
4. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 3, en donde dicho polinucleótido es al menos 90% idéntico al polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7.
5. El método de la reivindicación 1, o la célula vegetal transgénica de la reivindicación 3, en donde dicho polinucleótido que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa se expone en SEQ ID NO: 7.
6. La célula vegetal transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dicho promotor se expone en SEQ ID NO: 74, 75, 85 o 91 de un equivalente funcional del mismo.
7. La célula vegetal transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dicho promotor es un promotor constitutivo.
8. La célula vegetal transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor inducible, un promotor de desarrollo específico de etapa y un promotor específico de tejido.
9. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 3-8.
10. Un método para generar una planta transgénica, que comprende expresar dentro de la planta un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polinucleótido de longitud completa expuesto en SEQ ID NO: 7, y un promotor capaz de regular la expresión de dicho polinucleótido en una célula vegetal, en donde dicho promotor es heterólogo a la célula vegetal transgénica, en donde dicho polinucleótido mejora el alargamiento de la fibra de una planta productora de fibra, generando de este modo la planta transgénica.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicha planta es algodón.
12. Un método de producción de fibras de algodón, método que comprende:
- (a) generar una planta de algodón transgénica de acuerdo con el método de la reivindicación 11, y
- (b) recoger las fibras de la planta de algodón transgénica,
- produciendo de este modo las fibras de algodón.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 10, la célula transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, o la planta transgénica de la reivindicación 9, en donde la planta es una planta monocultivadénea.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 10, la célula transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, o la planta transgénica de la reivindicación 9, en donde la planta es una planta dicoltivadénea.
15. El método de la reivindicación 1, 10, 11 o 12, la célula vegetal transgénica de la reivindicación 3, o la planta transgénica de la reivindicación 9, en donde dicho polinucleótido se expone en SEQ ID NO: 7.

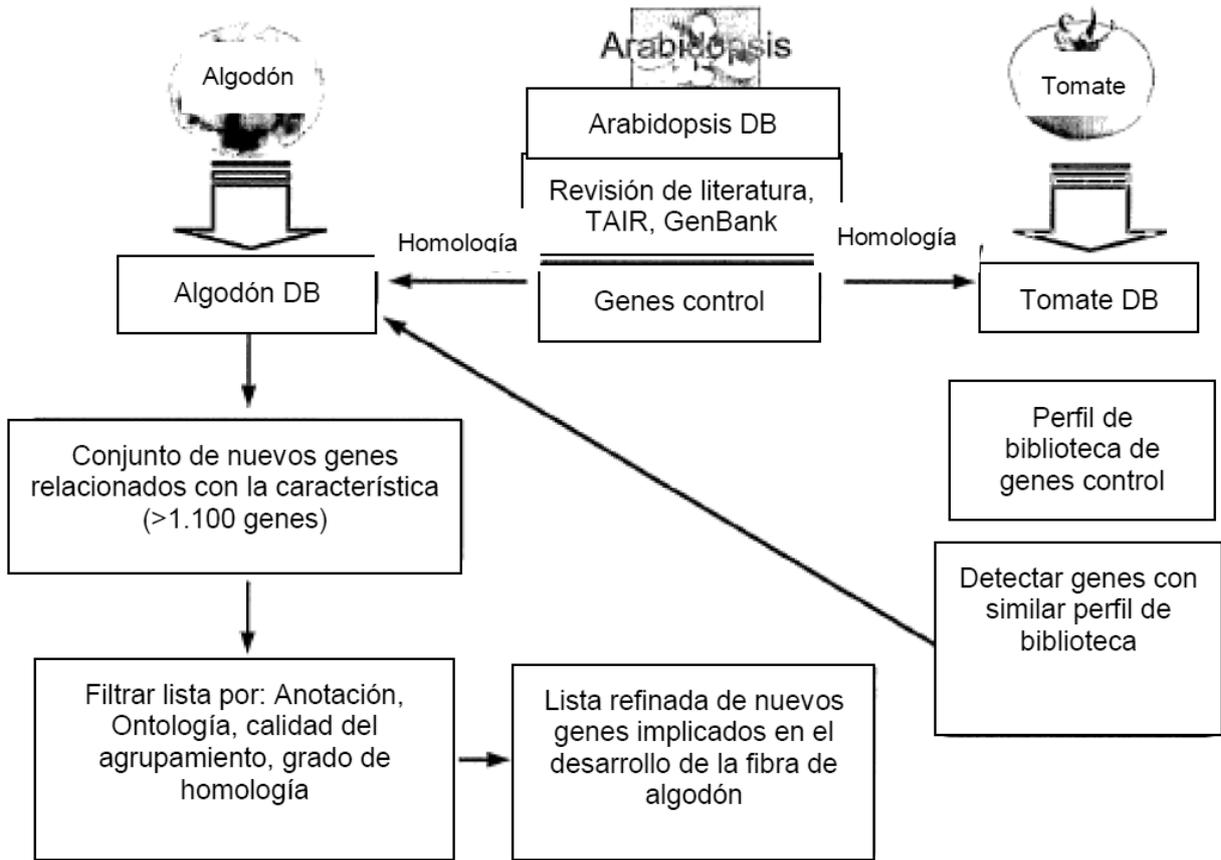
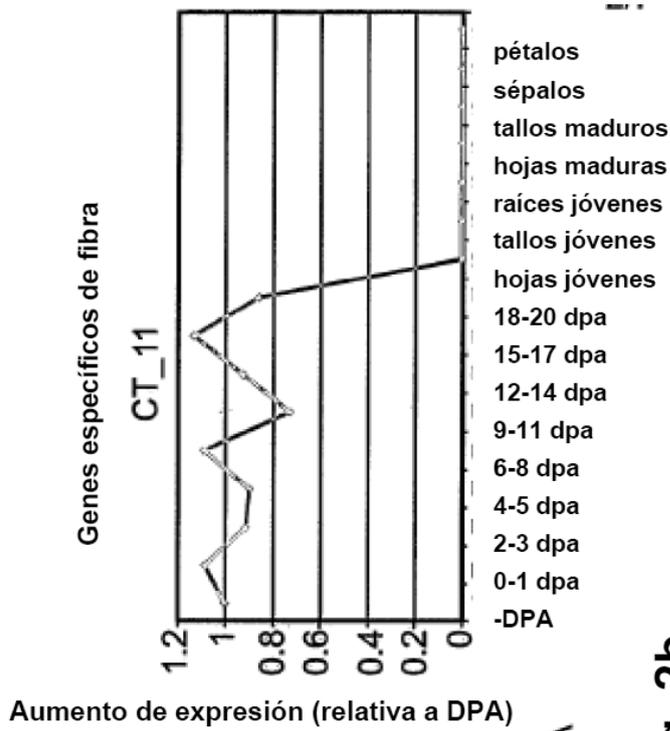


Fig. 1



Aumento de expresión (relativa a DPA)

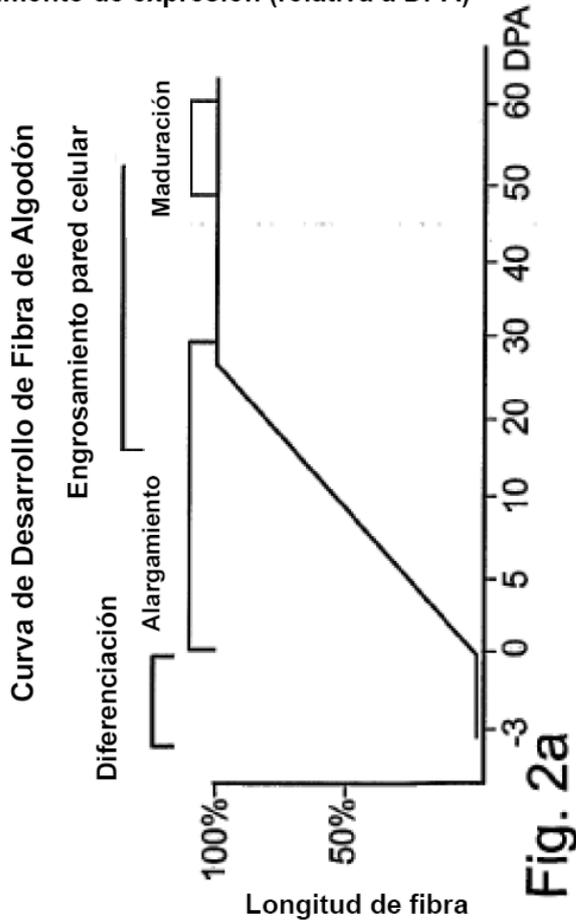


Fig. 2a

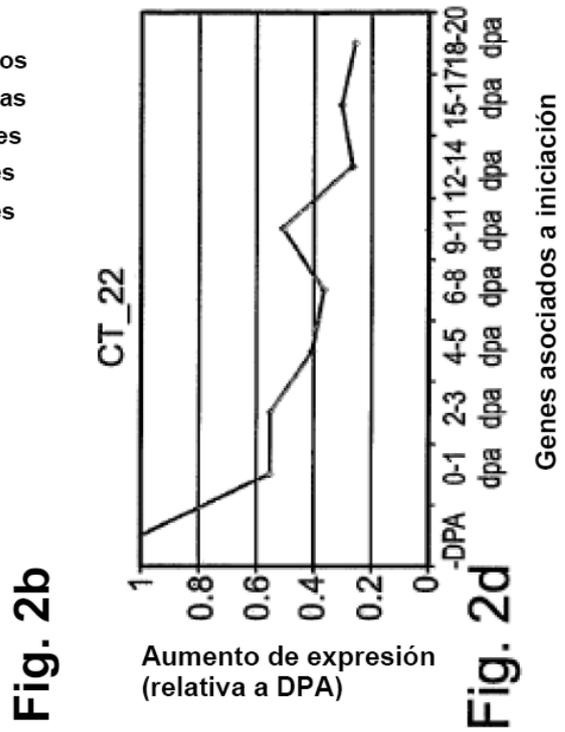


Fig. 2b

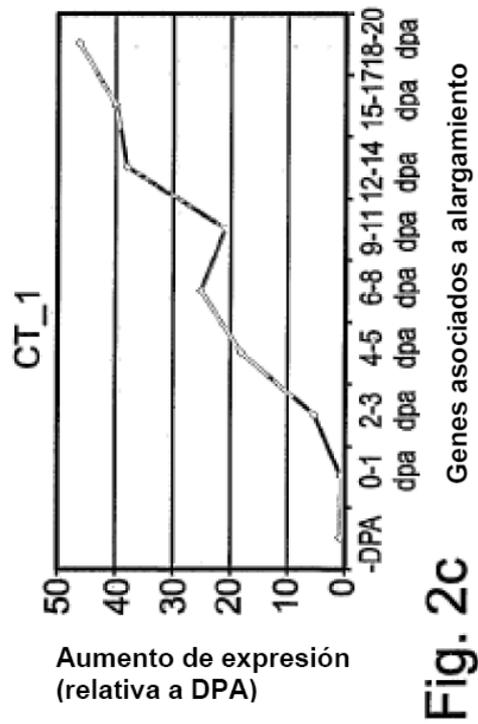


Fig. 2c

Aumento de expresión (relativa a DPA)

Fig. 2d

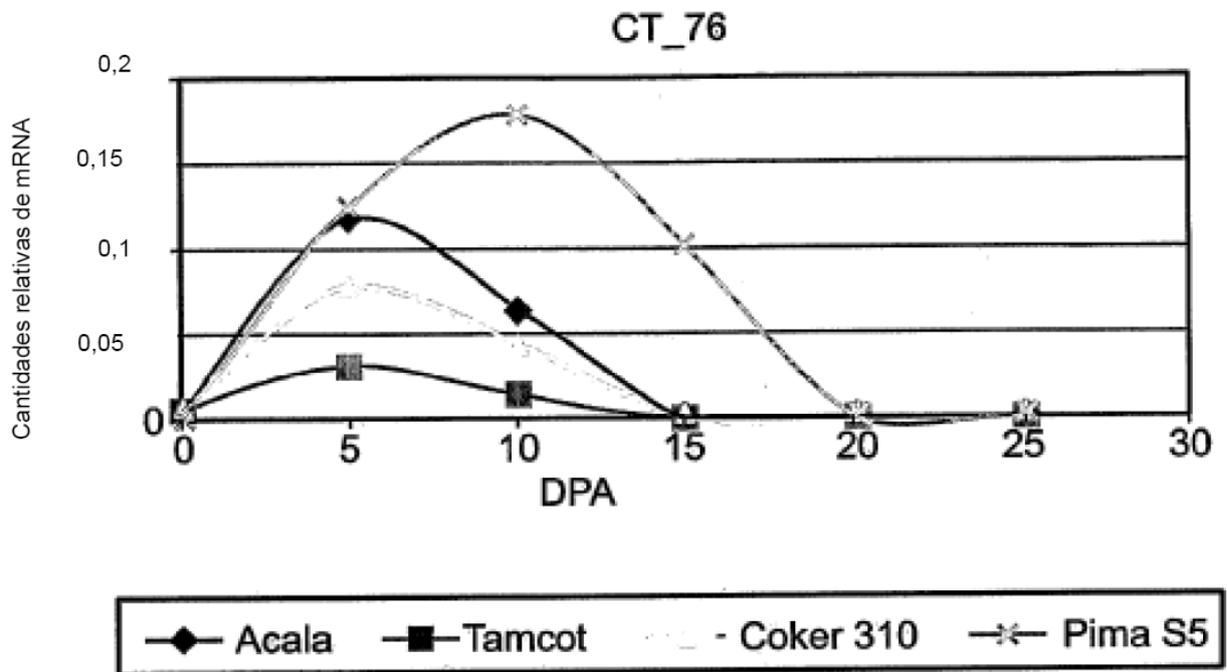
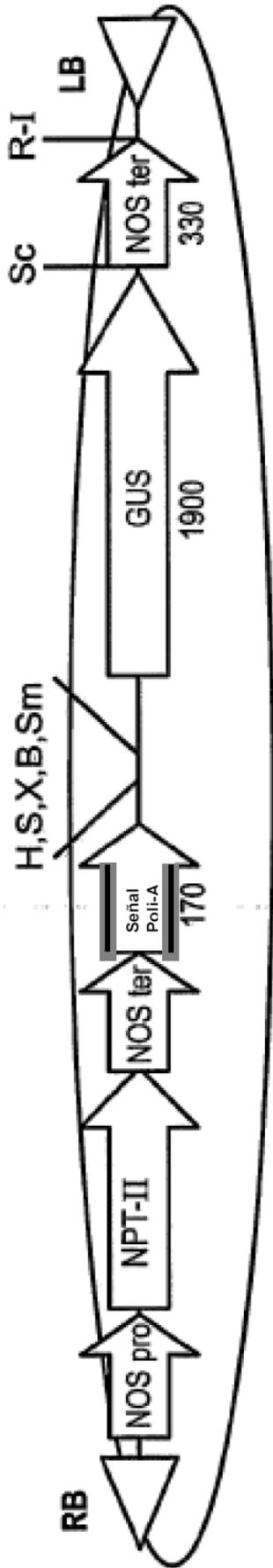


Fig. 3



Leyendas:

- RB- Borde derecho T-ADN
  - LB- Borde izquierdo T-ADN
  - H- Enzima de restricción Hind-III
  - X- Enzima de restricción Xba-I
  - B- Enzima de restricción BamHI
  - S- Enzima de restricción Sal-I
  - Sm- Enzima de restricción Sma-I
  - R-I- Enzima de restricción Hind-III
  - H- Enzima de restricción Eco-RI
  - Sc-SacI/SstII/Ecl136II
- (números)- Longitud en pares de bases

Fig. 4



Fig. 5f



Fig. 5e



Fig. 5d



Fig. 5c

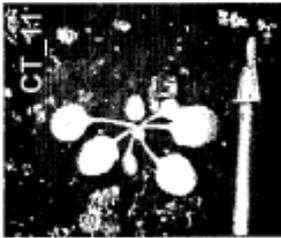


Fig. 5b

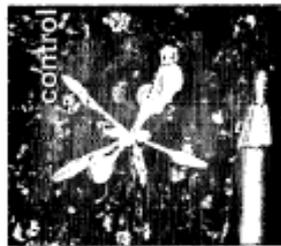


Fig. 5a

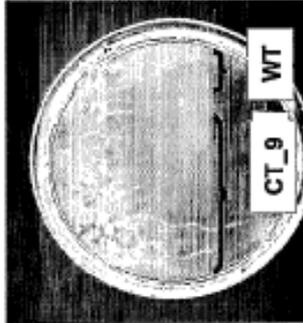


Fig. 5i

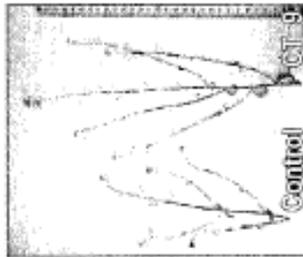


Fig. 5h



Fig. 5g



Fig. 5l



Fig. 5k

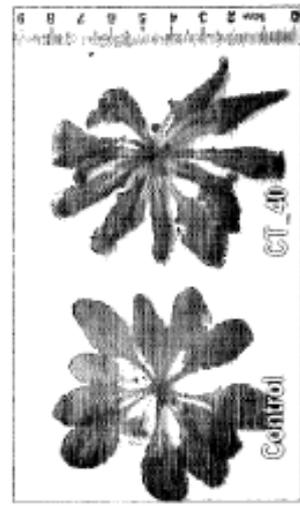


Fig. 5j



Fig. 6a



Fig. 6b

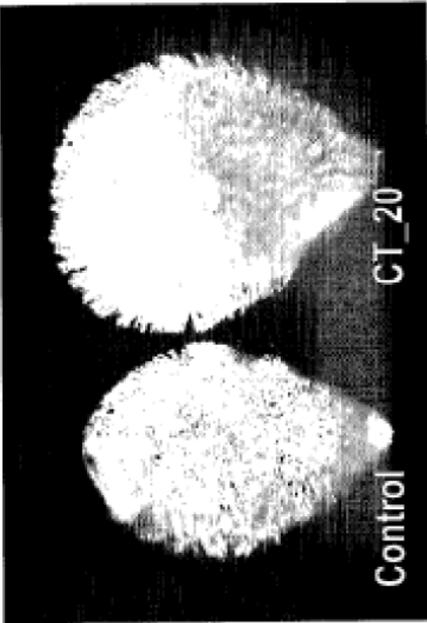


Fig. 6c

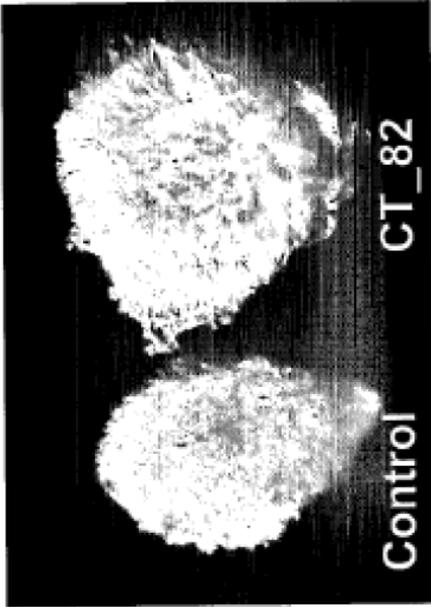


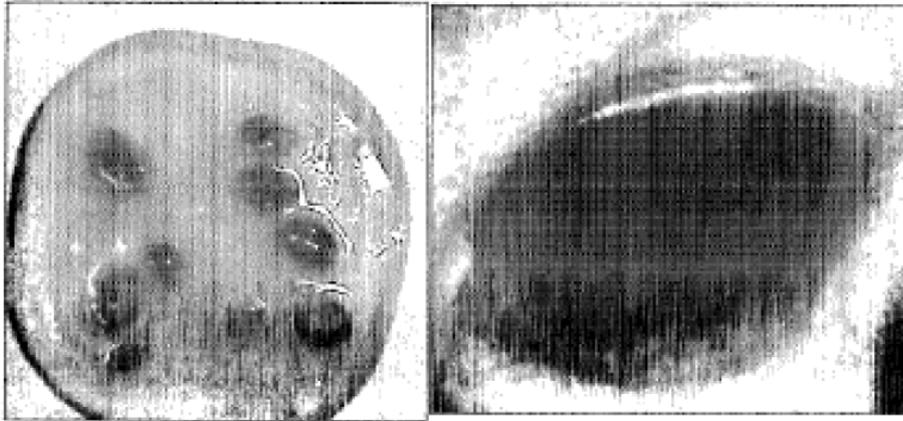
Fig. 6f



Fig. 6d

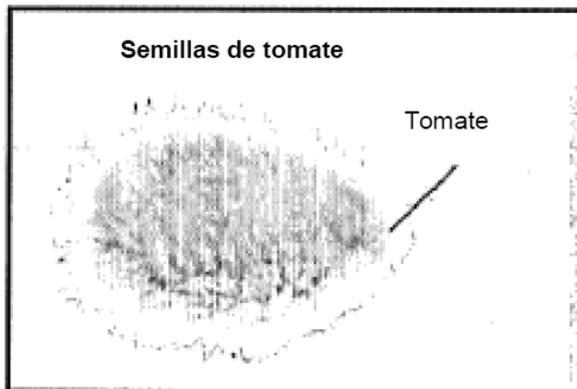


Fig. 6e

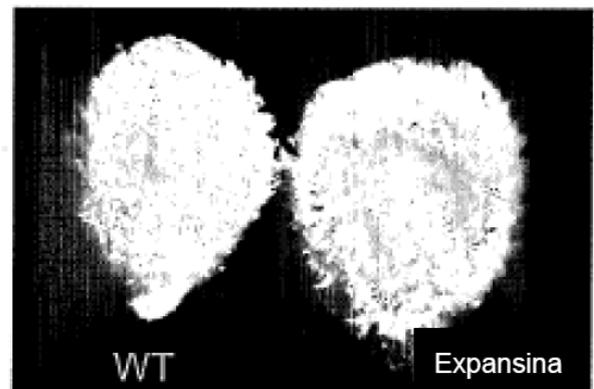


**Fig. 7a**

**Fig. 7b**



**Fig. 8a**



**Fig. 8b**