

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 207**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/EP2015/055603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15711130 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3119894**

54 Título: **Fibras de algodón con contenido de glucosamina incrementado**

30 Prioridad:

21.03.2014 EP 14161153

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

27.02.2019

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)

J.E. Mommaertslaan 14

1831 Diegem, BE

72 Inventor/es:

MEULEWAETER, FRANK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 702 207 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

Fibras de algodón con contenido de glucosamina incrementado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la modificación de la reactividad química de fibras de algodón. En particular, la presente invención proporciona fibras de algodón que comprenden oligosacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas. Debido a los grupos amino estas fibras tienen una reactividad modificada que se puede explotar al unir otras sustancias a las fibras para alterar sus características. Estas sustancias pueden ser, p. ej., tintes reactivos u otros reaccionantes tales como pirorretardantes, agua, repelentes de aceite y manchas, agentes contra las arrugas, suavizantes, agentes antiestáticos, agentes blanqueadores
10 fluorescentes, etc.

Esta invención proporciona métodos y medios para incrementar la eficacia de producción de oligómeros de glucosamina en células de plantas de algodón tales como células fibrilares.

Antecedentes de la invención

15 La fibra de algodón es el material textil simple más importante en el mundo. Aproximadamente 32 millones de hectáreas (80 millones de acres) de algodón son recogidos anualmente en todo el mundo. El algodón es el quinto cultivo más grande en los EE. UU. en cuanto a producción en hectáreas, con un promedio de 4,2 millones de hectáreas (10,3 millones de acres) plantados en los años 2006 a 2008. Aproximadamente 90% del algodón cultivado en el mundo es *Gossypium hirsutum* L., mientras que *Gossypium barbadense* responde de aproximadamente 8%.

20 Sin embargo, como otras fibras naturales que contienen celulosa, las fibras de algodón no poseen la versatilidad química de las fibras sintéticas, debido a la naturaleza relativamente inerte de los monómeros de glucosa con uniones β -1-4 en la celulosa. Esta naturaleza inerte relativa es evidente, p. ej., durante el proceso de tinción de fibras y telas de algodón.

25 Generalmente, se usan dos tipos de tintes para colorear el algodón: tintes directos y tintes reactivos con fibras, que son ambas moléculas aniónicas. El propio algodón desarrolla una carga aniónica en agua, de modo que, sin tratamiento especial, la captación de tinte por la fibra o la tela es bastante complicada. Los tintes directos crean un enlace de hidrógeno relativamente débil con el polímero de celulosa formando una ligazón semipermanente. Los tintes directos son más fáciles de usar y menos costosos que los tintes reactivos con fibras, pero no soportan bien el lavado. Los tintes reactivos con fibras son moléculas que combinan cromóforos con un grupo reactivo que forma enlaces covalentes fuertes con la fibra a través de una reacción con grupos hidroxilo. Los enlaces covalentes proporcionan una buena resistencia de la fibra teñida contra el lavado. La decoloración se puede mejorar usando fijadores catiónicos.

35 Durante el procedimiento de teñido usando tintes directos, se necesitan grandes cantidades de electrolitos para proteger a los tintes aniónicos de las cargas de las fibras aniónicas. Los tintes sin reaccionar (hasta 40%) necesitan retirarse mediante una etapa de lavado, generando grandes volúmenes de agua residual, que también contiene los susodichos electrolitos.

40 Proveer a la fibra celulósica de una carga eléctrica positiva, p. ej. mediante la incorporación de compuestos químicos cargados positivamente tales como polisacáridos cargados positivamente, podría mejorar por lo tanto la capacidad de tinción de las fibras celulósicas, así como mejorar cualquier reacción química de la fibra celulósica modificada con compuestos químicos cargados negativamente. También haría posible el uso de tintes ácidos.

45 Varias publicaciones han descrito la incorporación o el revestimiento de oligómeros de quitosano en fibras celulósicas para formar combinaciones, hilos o telas de quitosano/celulosa. El quitosano es un polímero de glucosamina cargado positivamente, que se puede formar mediante la desacetilación de quitina, p. ej. mediante tratamientos alcalinos. La propia quitina es un polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con uniones β -1-4. Basándose en la función fisiológica del quitosano para inhibir, p. ej., dermatofitos, muchas ropas, telas y fibras
50 funcionales emplean fibras de combinación de celulosa-quitosano, conjugados de fibra celulósica-quitosano y telas revestidas con resinas que contienen quitosano.

La solicitud de patente de EE. UU. US2003/0134120 describe el revestimiento de fibras naturales con quitosano.

55 Liu y cols. (Carbohydrate Polymers 44(2003) 233-238) describen un método para revestir fibras de algodón con quitosano, mediante la oxidación de la hebra de algodón con peryodato potásico a 60°C en agua y el tratamiento posterior con una solución de quitosano en ácido acético acuoso. Con el revestimiento de quitosano, la superficie de la fibra de algodón se vuelve fisiológica y biológicamente activa. Puesto que la reactividad química del grupo amino es mayor que la del grupo hidroxilo de los monómeros de celulosa, la fibra tiene más potencial para una modificación

química adicional. Por otra parte, la superficie lisa de la fibra de algodón se vuelve áspera, sugiriendo un mayor potencial de absorción de fármacos y liberación controlada de los mismos.

5 El documento WO2006/136351 proporciona métodos y medios para la modificación de la reactividad de paredes celulares de planta, particularmente según se pueden encontrar en fibras naturales de plantas productoras de fibras mediante la inclusión de oligosacáridos o polisacáridos cargados positivamente en la pared celular. Esto se puede conseguir convenientemente al expresar un gen quimérico que codifica una N-acetilglucosamina transferasa, particularmente una N-acetilglucosamina transferasa capaz de ser dirigida a las membranas del aparato de Golgi en células de una planta. Una de las aplicaciones es un incremento en la capacidad de tinción.

10 El documento WO2011/089021 proporciona métodos y medios para la modificación de la reactividad de paredes celulares secundarias de plantas, particularmente en paredes celulares de algodón encontradas en fibras de algodón. Esto se puede conseguir convenientemente al expresar un gen quimérico que codifica una quitina sintasa de *Saprolegnia monoica* en plantas de algodón.

15 El documento WO2012/048807 proporciona métodos y medios alternativos para producir oligosacáridos cargados positivamente en la pared celular de plantas al introducir en dicha célula de planta una proteína de nodulación C (NOD C) fusionada a una secuencia de anclaje de señal del aparato de Golgi heteróloga.

20 El polisacárido quitina se forma a partir de residuos de N-acetilglucosamina. Se sintetiza a partir de UDP-N-acetilglucosamina que es el producto final de la ruta de biosíntesis de hexosamina también activa en plantas (Mayer y cols. 1968, Plant Physiol. 43, 1097-1107). La etapa primera y limitativa de la velocidad de esta ruta es la conversión de glutamina en glucosamina-6-fosfato que es catalizada por la enzima glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT).

25 El documento WO 2007/039314 describe plantas transgénicas que tienen la actividad de una hialuronano sintasa y adicionalmente una actividad incrementada de glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT). Estas plantas sintetizan una cantidad incrementada de hialuronano en comparación con plantas que tienen solamente la actividad de una hialuronano sintasa. Como la quitina, el hialuronano se sintetiza a partir de UDP-N-acetilglucosamina.

30 El documento WO 2011/089021 divulga plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen quimérico de quitina sintasa y un gen quimérico de glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa bajo el control de un promotor selectivo de algodón. Las fibras procedentes de estas plantas de algodón transgénicas tienen un incremento en la cantidad de polímeros de N-acetilglucosamina que están uniformemente distribuidos en toda la pared celular.

35 Wang y Roosinck, 2006 (Plant Molecular Biology, vol.61, p.699-710) proporciona codones óptimos en doce especies de plantas, entre ellas algodón, y demuestra que la tendencia a la utilización de algodón está correlacionada positivamente con los niveles de transcritos génicos.

40 No obstante sigue habiendo una necesidad de métodos y medios mejorados para producir fibras de algodón que comprendan un nivel incrementado de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas. Estos y otros problemas se resuelven según se describe posteriormente en el sumario, las realizaciones detalladas, los ejemplos, los dibujos y las reivindicaciones.

Sumario de la invención

45 En una primera realización la invención proporciona una célula de planta de algodón que comprende un gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:

(a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,

(b) una región de ADN para un polipéptido de GFAT en donde dicha GFAT es codificada por una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 o dicha variante de la misma y

50 (c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación que comprende un segundo gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:

(a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,

(b) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de quitina sintasa y

(c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

En otra realización más, la invención proporciona una planta de algodón que consiste en las células de planta que se describen en la presente.

5 La invención también proporciona fibras tales como fibras de algodón que se pueden obtener de la planta que se describe en la presente. Por otra parte, se proporciona un hilo o una tela elaborados a partir de las fibras.

En otra realización de la invención, dicho método para producir fibras de algodón con polisacáridos cargados positivamente comprende las etapas de

10 i) expresar un primer gen quimérico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica GFAT según se describe en la presente anteriormente y un segundo gen quimérico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una quitina sintasa,

ii) regenerar una planta de algodón a partir de células de plantas de algodón de la etapa i) y

iii) opcionalmente aislar fibras de dicha planta de algodón.

Descripción de las figuras

15 Figura 1: Secuencia nucleotídica de la molécula de ácido nucleico sintética que codifica la glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) de *E. coli* según SEQ ID 2 (SEQ ID 1).

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de la glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (SEQ ID 2) de *E. coli*.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que la expresión de una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) en células de planta, particularmente en células de planta de algodón de plantas de algodón conduce a la producción de una cantidad incrementada de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas en células de planta o fibras de estas plantas tales como fibras de algodón, en comparación con células o fibras de planta que no comprendan una proteína de GFAT o en comparación con células de planta que expresen un gen que
25 codifica GFAT conocido en la técnica que no esté optimizado para la expresión en células de plantas de algodón.

Este hallazgo inesperado también se puede conseguir mediante la expresión de una variante de SEQ ID 1 en una célula de planta, particularmente en una célula de planta de algodón, que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa según SEQ ID 2, en donde dicha variante difiere de SEQ ID 1 en uno o más nucleótidos con la condición de que en total no difiera en más de 20 nucleótidos con respecto a SEQ ID 1.
30

Así, se describe en la presente una molécula de ácido nucleico aislada que comprende

i) una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1,

35 ii) o una variante de la misma, en donde uno o más nucleótidos difieren de la secuencia nucleotídica de SEQ ID 1, con la condición de que dicha variante no difiera en más de 20 nucleótidos con respecto a SEQ ID 1, que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) según SEQ ID 2

iii) o una secuencia complementaria de i) o ii).

40 SEQ ID 1 codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa procedente de *E. coli*. La correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína se describe en SEQ ID 2. Esta enzima cataliza la conversión de fructosa-6-fosfato y glutamina en glucosamina-6-fosfato y glutamato como un producto secundario. Se ha descrito en el documento WO2007/039314 la producción de hialuronano en plantas. Durante la ruta de la hexosamina, glucosamina-6-fosfato se convierte además en UDP-N-acetilglucosamina que a su vez sirve como materia prima para la síntesis de glicosaminoglicanos tales como hialuronano o quitina si están presentes las enzimas apropiadas.
45

El documento WO2007/039314 divulga una secuencia nucleotídica de GFAT que se derivaba del gen de *E. coli* que codifica GFAT pero estaba adaptada al uso de codones en células de planta. La secuencia nucleotídica divulgada como SEQ ID 1 en la presente solicitud varía con respecto a la secuencia nucleotídica descrita en el documento WO2007/039314 en aproximadamente 25%. Aunque la secuencia divulgada en el documento WO2007/039314 estaba optimizada para la expresión en células de planta en general, la expresión de un gen quimérico que
50 comprende una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 conduce a resultados particularmente buenos en células de

algodón. Las células de algodón que comprenden una secuencia nucleotídica expresable en plantas según SEQ ID 1 o una variante de la misma que codifica una proteína de GFAT procedente de *E. coli* según SEQ ID 2 y que difiere de SEQ ID 1 en uno o más nucleótidos con la condición de que en total no difiera en más de 20 nucleótidos con respecto a SEQ ID 1, o plantas de algodón constituidas por estas células de plantas de algodón, producen una cantidad incrementada de glucosamina en comparación con células de algodón que expresen una secuencia nucleotídica como la divulgada en el documento WO2007/039314 o plantas constituidas por estas células de algodón (véanse los datos experimentales).

Según se usa en la presente, "diferencia de no más de 20 nucleótidos con respecto a SEQ ID 1" significa, p. ej., 20 nt, 19 nt, 18 nt, 17 nt, 16 nt, 15 nt, 14 nt, 13 nt, 12 nt, 11 nt, 10 nt, 9 nt, 8 nt, 7 nt, 6 nt, 5 nt, 4 nt, 3 nt, 2 nt o 1 nt diferente de SEQ ID 1, aunque codificando todavía la glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) según SEQ ID 2.

Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, mono- o bicatenario. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar químicamente o producirse mediante la expresión biológica *in vitro* o incluso *in vivo*. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. En relación con el gen quimérico de la presente divulgación, ADN incluye ADNc y ADN genómico.

Además, se proporciona un gen quimérico que comprende como regiones de ADN ligadas operativamente

(a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,

(b) una región de ADN que codifica un polipéptido de GFAT en donde dicha GFAT está codificada por una secuencia nucleotídica como la descrita en la presente anteriormente y

(c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

Según se usa en la presente, el término "promotor expresable en plantas" significa una secuencia de ADN que es capaz de controlar (iniciar) la transcripción en una célula de planta. Este incluye cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula de planta, es decir, ciertos promotores de origen viral o bacteriano tales como el CaMV35S, el promotor del virus del trébol subterráneo N° 4 o N° 7 (documento WO9606932) o promotores de ADN T y similares.

En un ejemplo, el promotor puede ser un promotor heterólogo no asociado naturalmente con la región de ADN ligada operativamente a él.

Estará claro que pueden ser adecuados para la invención promotores constitutivos expresables en plantas. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen el promotor procedente del gen de actina (McElroy y cols. (1990) Plant Cell 2: 163-171), el promotor CaMV35S (Odell y cols. (1985) Nature 313: 810-812), el promotor CaMV19S (Nilsson y cols. (1997) Physiol. Plant. 100: 456-462), el promotor GOS2 (de Pater y cols. (1992) Plant. J. 2(6): 837-44), el promotor procedente del gen de ubiquitina (Christensen y cols. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689), el promotor procedente del gen de ciclofilina de arroz (Buchholz y cols. (1994) Plant. Mol. Biol. 25(5): 837-43), el promotor procedente del gen de histona H3 de maíz (Lepetit y cols. (1992) Mol. Gen. Genet. 231: 276-285) o el promotor procedente del gen de actina 2 (An y cols. (1996) Plant J. 10(1): 107-121).

También está claro que se pueden usar según la invención promotores inducibles, tales como un promotor inducible por temperatura o inducible químicamente o un promotor que es sensible a señales de desarrollo. También se pueden usar promotores selectivos en tejidos.

En un ejemplo, el gen quimérico comprende un promotor preferente en fibras o selectivo en fibras. El término "preferente en fibras" o "selectivo en fibras", con respecto a la expresión de un gen o con respecto a un promotor, se refiere, con propósitos prácticos, a la expresión altamente específica de un gen o la expresión dirigida por un promotor, en células fibrilares de plantas, tales como plantas de algodón. En otras palabras, los niveles de transcritos de un ADN en tejidos diferentes de células fibrilares bien están por debajo del límite de detección o bien son muy bajos (menores de aproximadamente 0,2 picogramos por microgramo de ARN total).

El término "preferente en fibras" o "preferente en células fibrilares" con respecto a la expresión de un ADN según esta invención se refiere a un patrón de expresión por el que el ADN se expresa predominantemente en células fibrilares o fibras, pero la expresión se puede identificar en otros tejidos de la planta. Preferiblemente, la expresión en células fibrilares es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces mayor en las células fibrilares que en otros tejidos.

Estos promotores incluyen el promotor procedente de algodón procedente de un *Duch prom* (como el descrito en el documento WO0210377), el promotor procedente de algodón procedente de un gen de actina específico en fibras (como el descrito en el documento WO0210413), el promotor procedente de un gen de proteína de transferencia de lípidos específico en fibras procedente de algodón (como el descrito en el documento US5792933), un promotor procedente de un gen de expansina procedente de algodón (documento WO9830698) o un promotor procedente de un gen de quitinasa en algodón (documento US2003106097) o los promotores de los genes específicos en fibras descritos en los documentos US6259003 o US6166294 o los promotores derivados de la familia E6 que se divulgan en el documento US6096950. Promotores selectivos en fibras como los descritos en el documento WO08/083969 (a partir de genes de glucanasa de algodón), el documento WO12/093032 (a partir del gen FS18 o SCW-PRP de algodón) o el documento US 2013/0081154 (a partir de genes tipo FB8 de algodón) también son promotores adecuados expresables en plantas. También es adecuado para la invención el promotor divulgado en el documento EP13172094 que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID No. 5 que se describe en la presente desde la posición nucleotídica 4208 a la posición nucleotídica 5615 o que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID No. 5 desde la posición nucleotídica 75 a la 1482.

Los genes quiméricos de la presente descritos opcionalmente comprenden una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Se conoce en la técnica una variedad de regiones de ADN implicadas en la terminación de la transcripción y la poliadenilación funcionales en plantas y los expertos en la técnica conocerán secuencias terminadoras y de poliadenilación que pueden ser adecuadas al realizar los métodos descritos en la presente. La región de poliadenilación se puede derivar de un gen natural, de una variedad de otros genes de plantas, de genes de ADN T o incluso de genomas virales de planta. La secuencia del extremo 3' que se va a añadir se puede derivar, por ejemplo, de los genes de nopalina sintasa u octopina sintasa, o alternativamente de otro gen de planta, o de cualquier otro gen eucariótico.

En una primera realización de la invención, se proporciona una planta de algodón que comprende un gen quimérico que comprende como regiones de ADN ligadas operativamente

(a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,

(b) una región de ADN que codifica un polipéptido de GFAT en donde dicha GFAT está codificada por una secuencia nucleotídica como la descrita en la presente y

(c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación y que comprende adicionalmente un segundo gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:

a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,

b) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de quitina sintasa y

c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

El gen quimérico se puede introducir en una célula de planta mediante métodos muy conocidos en la técnica. "Introducir", en relación con la presente solicitud, se refiere a la colocación de información genética en una célula de planta o una planta por medios artificiales. Esto se puede efectuar mediante cualquier método conocido en la técnica para introducir ARN o ADN en células de planta, tejidos, protoplastos o plantas enteras.

El término "introducir" se puede referir a la introducción de una molécula de ADN exógena a una célula de planta mediante transformación, opcionalmente seguido por la regeneración de una planta a partir de la célula de planta transformada. El término también se puede referir a la introducción de la molécula de ADN recombinante mediante el cruzamiento de una planta transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante con otra planta y la selección de plantas descendientes que han heredado la molécula de ADN recombinante o el transgén. Otro significado alternativo por proporcionar se refiere a la introducción de la molécula de ADN recombinante mediante técnicas tales como fusión de protoplastos, opcionalmente seguida por regeneración de una planta a partir de los protoplastos fusionados.

Estará claro que los métodos de transformación usados son de poca relevancia para la presente invención. La transformación de plantas es actualmente una técnica habitual. Ventajosamente, se puede usar cualquier de varios métodos de transformación para introducir el ácido nucleico/gen de interés en una célula progenitora adecuada. Métodos de transformación incluyen el uso de liposomas, electroporación, productos químicos que incrementan la captación de ADN libre, inyección del ADN directamente en la planta, bombardeo con pistola de partículas, transformación usando virus o polen y microproyección. Los métodos se pueden seleccionar del método de calcio/poli-etilenglicol para protoplastos (Krens y cols. (1982) Nature 296: 72-74 ; Negrutiu y cols. (1987) Plant. Mol.

Biol. 8: 363-373); electroporación de protoplastos (Shillito y cols. (1985) Bio/Technol. 3: 1099-1102); microinyección en material de planta (Crossway y cols. (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 179-185); bombardeo de partículas revestidas con ADN o ARN (Klein y cols. (1987) Nature 327: 70) infección con virus (no integrantes) y similares.

5 También se conocen en la técnica métodos para transformar plantas de algodón. La transformación de algodón mediada por *Agrobacterium* se ha descrito, p. ej., en la patente de EE. UU. 5.004.863 o en la patente de EE. UU. 6.483.013 y la transformación de algodón mediante bombardeo de partículas se presenta, p. ej., en el documento WO 92/15675. Otros métodos de transformación de algodón adecuados se divulgan, p. ej., en los documentos WO 00071733 y US 5.159.135.

10 Las moléculas de ADN recombinante descritas en la presente se pueden introducir en plantas de un modo estable o de un modo transitorio usando métodos muy conocidos en la técnica. Los genes quiméricos se pueden introducir en plantas o se pueden generar dentro de la célula de planta según se describe, p. ej., en EP 1339859.

15 Varias especificaciones sobre lo que se entiende por el término "promotor expresable en plantas" se dan anteriormente y se aplican igualmente para el segundo gen quimérico que comprende una región de ADN que codifica una quitina sintasa. Lo mismo es cierto para las especificaciones dadas anteriormente sobre la región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación y también para métodos y medios para proporcionar una célula de planta con un gen quimérico.

20 El primer gen quimérico y el segundo gen quimérico se pueden introducir en una célula de planta individualmente en cualquier orden o simultáneamente. Se pueden introducir en el mismo vector o en vectores separados.

25 La quitina sintasa puede ser cualquier proteína que tenga la actividad enzimática de una quitina sintasa (EC 2.4.1.16), es decir, que convierta UDP-N-acetil-D-glucosamina en quitina y UDP. Una quitina sintasa cataliza la reacción: UDP-N-acetil-alfa-D-glucosamina + (1,4-(N-acetil-beta-D-glucosaminilo))(n) \rightleftharpoons UDP + (1,4-(N-acetil-beta-D-glucosaminilo))(n+1). Es adecuada para la presente invención cualquier quitina sintasa derivada de cualquier organismo. Ejemplos de quitina sintasas adecuadas son quitina sintasa procedente de *Saprolegnia monoica* (documento WO 2011/089021) o quitina sintasas de tipo NOD C como las descritas en el documento WO 30 2006/136351 o en el documento WO 2012/048807, por ejemplo.

En una realización particular de la invención, la quitina sintasa en dicha célula de planta de algodón que se describe anteriormente es una N-acetilglucosamina transferasa del tipo NOD C. Se obtienen buenos resultados particulares si dicho polipéptido de quitina sintasa comprende una señal de localización en el aparato de Golgi.

35 Aunque se han conseguido buenos resultados con células de planta que comprenden una actividad de quitina sintasa además de la actividad de GFAT, la actividad de GFAT que se obtiene por los medios descritos en la invención también se puede combinar beneficiosamente con cualquier actividad enzimática que conduzca a la producción de glicosaminoglicanos procedentes del producto de GFAT glucosamina-6-fosfato o de UDP-N-acetilglucosamina. Según se describe en la introducción, glucosamina-6-fosfato se convierte adicionalmente en UDP-N-acetilglucosamina a través de la ruta de la hexosamina en plantas. Una de estas actividades enzimáticas que convierte UDP-N-acetilglucosamina en glicosaminoglicanos distintos a la quitina es la de una hialuronano sintasa. Así, también se puede usar una hialuronano sintasa en lugar de una quitina sintasa.

45 En otra realización particular, la invención proporciona una planta de algodón que consiste esencialmente en células de plantas de algodón que comprenden un primer y un segundo gen quimérico descrito en la presente anteriormente.

50 "Algodón" o "planta de algodón", según se usa en la presente, puede ser cualquier variedad útil para cultivar algodón. Las variedades de algodón más comúnmente usadas son *Gossypium barbadense*, *G. hirsutum*, *G. arboreum* y *G. herbaceum*. Variedades adicionales incluyen *G. africanum* y *G. raimondii*. También se incluye la progenie procedentes de cruces de cualquiera de las especies anteriores con otras especies o cruces entre estas especies.

55 Una célula de planta de algodón puede ser cualquier célula que comprenda esencialmente la información genética necesaria para definir una planta de algodón, que, aparte del gen quimérico divulgado en la presente, puede estar complementada mediante uno o más transgenes adicionales. Las células se pueden derivar de los diversos órganos y/o tejidos que forman una planta de algodón, incluyendo, pero no limitados a, frutos, semillas, embriones, tejido reproductivo, regiones meristemáticas, tejido calloso, hojas, raíces, tallos, flores, tejido vascular, gametofitos, 60 esporofitos, polen y microesporas.

Aunque ciertas células de planta según la invención pueden ser capaces de regenerarse en plantas completas, en algunas realizaciones dichas células de planta no se pueden desarrollar adicionalmente o regenerar en una planta completa. En una realización de la invención, las células fibrilares se muelen. Las células fibrilares maduras son 65 células muertas.

También se describen plantas productoras de fibras que comprenden una o más construcciones recombinantes descritas en la presente. Aunque la secuencia nucleotídica que codifica la proteína de GFAT se ha optimizado para la expresión en plantas de algodón, se cree que la región codificante también se podría usar beneficiosamente en otras plantas productoras de fibras tales como cáñamo, yute, lino y plantas leñosas incluyendo, pero no limitadas a, *Pinus spp.*, *Populus spp.*, *Picea spp.*, *Eucalyptus spp.*, etc. La célula de planta se puede derivar de cualquier planta productora de tricomas.

Las plantas según la invención se pueden usar en un esquema de reproducción convencional para producir más plantas con las mismas características o para introducir los genes quiméricos descritos en la presente en otras variedades de la misma especie de planta o una relacionada, o en plantas híbridas. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas contienen los genes quiméricos descritos en la presente como una inserción genómica estable y también son abarcadas por la invención.

El término "planta", según se usa en la presente, abarca plantas enteras, progenitores y descendencia de las plantas y partes de planta, incluyendo semillas, tallos, troncos, hojas, raíces (incluyen tubérculos), flores, fibras y tejidos y órganos, en donde cada uno de los susodichos comprende el gen/ácido nucleico de interés. El término "planta" también abarca células de planta, cultivos en suspensión, tejido caloso, embriones, regiones meristemáticas, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas, de nuevo en donde cada uno de los susodichos comprende el gen/ácido nucleico de interés.

En una realización específica, la invención proporciona fibras de algodón obtenibles de una planta de algodón según la invención.

Las fibras de algodón según la invención se pueden distinguir de fibras de algodón presentes en la naturaleza, es decir, fibras de algodón obtenidas de una línea isogénica que no comprende una secuencia de ácido nucleico como la descrita en la presente, por el contenido incrementado de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas. Los polímeros de GlcNAc o las oligoglucosaminas se pueden detectar directamente. Alternativamente, los polisacáridos cargados positivamente en las fibras de algodón se pueden detectar al medir el contenido de glucosamina después del tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para hidrolizar los polisacáridos. Las fibras de algodón según la invención también se pueden distinguir por su contenido de nitrógeno incrementado. Debido a la reactividad de los grupos que contienen nitrógeno dentro de los polímeros de glucosamina, las fibras de algodón según la invención se caracterizan por su reactividad química alterada en comparación con fibras obtenidas de plantas de algodón que no comprenden una región de ácido nucleico que codifica un polipéptido de GFAT según se describe en la presente. Las fibras según la invención tienen una capacidad incrementada para reaccionar con tintes u otros productos químicos adecuados a través de los grupos que contienen nitrógeno.

Las fibras de algodón según la invención se caracterizan por un contenido incrementado de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas. "Contenido incrementado" significa que la cantidad de polisacáridos cargados positivamente presente en las células o fibras de planta es superior que en células o fibras de planta que no comprenden proteína de GFAT o en comparación con células o fibras de planta que expresan un gen codificante de GFAT conocido en la técnica que no está optimizado para la expresión en células de plantas de algodón. En un ejemplo, el contenido de glucosamina (GlcN) es al menos dos veces el de células o fibras procedentes de plantas que no expresan una construcción génica introducida artificialmente. Se observaba que este nivel de fondo era de aproximadamente 0,010 a 0,015% de GlcN del peso de fibra total. Preferiblemente, las fibras según la invención contienen más de 0,03% de GlcN del peso de fibra total. Más preferiblemente, el contenido de GlcN de fibras según la invención es mayor de 0,06%, aún más preferiblemente mayor de 0,08%, lo más preferiblemente mayor de 0,10% de GlcN del peso de fibra total. En otro ejemplo, el contenido de GlcN de las células de planta o las fibras de algodón según la invención es al menos cuatro veces el de células o fibras procedentes de plantas que no expresan una construcción génica introducida artificialmente. En otro ejemplo más, las células o las fibras de planta tienen un contenido de GlcN que es al menos cinco veces, preferiblemente al menos siete veces y lo más preferiblemente diez veces el de células o fibras procedentes de plantas que no expresan una construcción génica introducida artificialmente.

Una "fibra" se define botánicamente como una célula ahusada estrecha y larga, muerta y hueca en la madurez, con una pared celular rígida compuesta principalmente por celulosa y habitualmente lignina. Las fibras blandas o liberianas se encuentran en el floema (corteza interna) de troncos de dicotiledóneas (lino, yute, cáñamo, ramio). Las fibras duras o foliares se encuentran en haces vasculares de hojas de monocotiledóneas (sisal, cáñamo de Manila, piña). Las fibras superficiales se desarrollan a partir de la superficie de semillas (algodón), hojas o frutos (fibra de coco).

"Fibra de algodón", según se usa en la presente, se refiere a un tricoma seminal, más específicamente una sola célula de una planta productora de fibras, tal como algodón, que se inicia a partir de la epidermis del integumento externo de los óvulos, en o justo antes de la antesis. El desarrollo morfológico de las fibras de algodón ha estado bien documentado (Basra y Malik, 1984, Int Rev of Cytology 89: 65-113; Graves y Stewart, 1988, J. Exp. Bot. 39 (1):

59-69; Ramsey y Berlin, 1976, American Journal of Botany 63 (6): 868-876; Ruan y Chourey, 1998, Plant Physiology 118: 399-406; Ruan y cols. 2000, Aust. J. Plant Physiol. 27:795-800; Stewart, 1975, Am. J. Bot. 62, 723-730).

5 Por lo tanto, también se describen en la presente paredes celulares de células de planta tales como paredes celulares procedentes de células de algodón, que comprenden un nivel incrementado de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas en comparación con paredes celulares procedentes de células de planta no modificadas o de células de planta que no expresan una secuencia nucleotídica que codifica GFAT según se describe en la presente.

10 La invención también se refiere a hilos hechos de fibras según la invención así como telas hechas de estos hilos.

Se describe un método para producir fibras de algodón con polisacáridos cargados positivamente, tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas, que comprende las etapas de

15 i) expresar un gen quimérico que comprende una región codificante de GFAT según se describe anteriormente en una célula de planta de algodón,

ii) regenerar una planta de algodón a partir de células de plantas de algodón de la etapa i) y

iii) opcionalmente aislar fibras de dicha planta de algodón.

20 En otra realización, se proporciona un método para producir fibras de algodón con polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas que comprende i) la expresión de un primer gen quimérico que comprende una región codificante de GFAT según se describe en la presente y un segundo gen quimérico que comprende una región codificante de quitina sintasa en una célula de planta de algodón, ii) la regeneración de una planta de algodón a partir de dichas células de plantas de algodón e iii) opcionalmente el aislamiento de fibras de dicha planta de algodón. Dichos primer y segundo gen quimérico se pueden introducir en la célula de planta simultáneamente o separadamente en cualquier orden según se describe anteriormente.

25 Se proporciona un método para producir fibras de algodón con un contenido incrementado de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas que comprende las etapas de i) expresar dicho primer y segundo gen quimérico en una célula de planta de algodón, ii) regenerar una planta de algodón a partir de dichas células de plantas de algodón e iii) opcionalmente aislar fibras de dicha planta de algodón. El término "contenido incrementado" se debe entender como se describe anteriormente.

30 Además, se proporciona un método para producir fibras de algodón con reactividad química alterada de las fibras que comprende las etapas de i) expresar un gen quimérico que comprende una región codificante de GFAT descrita en la presente en una célula de planta de algodón, y un segundo gen quimérico que comprende una región codificante de quitina sintasa según se describe en la presente ii) regenerar una planta de algodón de dichas células de plantas de algodón e iii) opcionalmente aislar fibras de dicha planta de algodón.

35 Se proporciona otro método para producir fibras de algodón con reactividad química alterada de las fibras que comprende las etapas de i) expresar un primer gen quimérico que comprende una región codificante de GFAT como la descrita anteriormente y un segundo gen quimérico que comprende una región codificante de quitina sintasa en una planta de algodón, ii) regenerar una planta de algodón de dichas células de plantas de algodón e iii) opcionalmente aislar fibras de dicha planta de algodón.

40 La molécula de ácido nucleico que se describe en la presente se puede usar para producir una planta de algodón con polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas en las fibras. En particular, se puede usar para incrementar la cantidad de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas en fibras. También se puede usar para la producción de fibras de algodón con reactividad química alterada. Esto podría permitir el acabado adicional cómodo, fácil y/o eficaz de las fibras. Las fibras obtenidas de una planta de algodón según la invención, p. ej., se pueden colorear con tintes reactivos que se unen a las fibras a través de enlaces covalentes con los grupos amino de los residuos de glucosamina en los polisacáridos. Alternativamente, otras sustancias se pueden ligar a través de reacciones químicas a los grupos amino de los residuos de glucosamina. Las sustancias también se pueden ligar a fibras según la invención a través de enlace electrostático o iónico a los grupos que contienen N de los polisacáridos. La ligazón de otras sustancias a fibras de algodón puede ser beneficiosa para transferir propiedades especiales a las fibras. Estos acabados pueden ser, pero no se limitan a, tinción, ligazón de pirorretardantes, agua, repelentes de aceite y manchas, agentes contra las arrugas, suavizantes, agentes antiestáticos, agentes blanqueadores fluorescentes o cualquier otro acabado textil.

45 Según se usa en la presente, se debe entender que "que comprende" especifica la presencia de características, números enteros, etapas o componentes indicados que se mencionen, pero no excluye la presencia o la adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Así, p. ej., un ácido

nucleico o una proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados, es decir, puede estar incluida en un ácido nucleico o una proteína mayores. Un gen quimérico que comprende una región de ADN que está funcionalmente o estructuralmente definida puede comprender regiones de ADN adicionales, etc.

5 Los siguientes ejemplos describen la generación de fibras de algodón con un contenido incrementado de polisacáridos cargados positivamente tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas.

10 A menos que se indique otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas recombinantes se llevan a cabo según protocolos estándar como los descritos en "Sambrook J y Russell DW (eds.) (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York" y en "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (eds.) (2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Nueva York".

15 Materiales y referencias estándar se describen en "Croy RDD (ed.) (1993) Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford" y en "Brown TA, (1998) Molecular Biology LabFax, 2ª Edición, Academic Press, San Diego". Materiales y métodos estándar para reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden encontrar en "McPherson MJ y Møller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford" y en "PCR Applications Manual, 3ª Edición (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim o www.roche-applied-science.com".

Descripción de secuencias

25 Se hace referencia a lo largo de la solicitud a las siguientes secuencias representadas en el listado de secuencias llamado "BCS14-2002_ST25", que tiene 42 kB (tamaño según se mide en Microsoft Windows®), contiene 4 secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, que está archivado conjuntamente con la presente mediante presentación electrónica:

30 SEQ ID 1: Secuencia nucleotídica sintética que codifica una proteína que tiene la actividad de una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) procedente de *E. coli*. La secuencia está optimizada para la expresión en células de plantas de algodón. La secuencia nucleotídica mostrada codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 2.

35 SEQ ID 2: Secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene la actividad de una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) procedentes de *E. coli*. La secuencia de aminoácidos mostrada se puede derivar de SEQ ID 1.

40 SEQ ID 3: ADN T de pTDBI 252. Comprende una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 que codifica un polipéptido de GFAT procedente de *E. coli* bajo el control de un promotor SCW-PRP selectivo en fibras, una región de ADN que codifica una quitina sintasa NOD C bajo el control de un promotor SCW-PRP selectivo en fibras y el gen epsps como un marcador seleccionable.

45 SEQ ID 4: ADN T de pTDBI 250. Comprende una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 que codifica un polipéptido de GFAT procedente de *E. coli* bajo el control de un promotor tipo Fb8-1 selectivo en fibras, una región de ADN que codifica una quitina sintasa NOD C bajo el control de un promotor tipo Fb8-1 selectivo en fibras y el gen epsps como un marcador seleccionable.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un gen quimérico que codifica una proteína de glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) para la expresión en células de algodón (solamente para referencia)

55 Una molécula de ADN que tiene la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID 1 se sintetizó mediante Entelechon GmbH. La secuencia nucleotídica estaba diseñada i) para codificar un polipéptido según SEQ ID 2 e ii) para optimizar la secuencia nucleotídica para la expresión en células de plantas de algodón. Con este propósito, se tuvieron en cuenta factores tales como la utilización de codones, la estructura secundaria del ARNm, el contenido de AT, los sitios de empalme crípticos o los sitios de restricción.

La secuencia nucleotídica resultante que se divulga en SEQ ID 1 es 75% idéntica (1390 de bases coincidentes de 1830) con la secuencia nucleotídica publicada que codifica una proteína de GFAT procedente de *E. coli* que estaba adaptada a la utilización de codones en plantas (documento WO 2007/039314).

Usando técnicas de ADN recombinante estándar, se construyó el siguiente gen de GFAT quimérico: Un gen de glutamina-6-fosfato-amidotransferasa quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:

- 5 i. la región promotora SCW-PRP selectiva en fibras según la secuencia desde la posición nucleotídica 61 a 1499 de SEQ ID 3,
- ii. un fragmento de ADN que codifica los 35 aminoácidos N-terminales de la ADN xilosiltransferasa procedente de *Arabidopsis thaliana* que funciona como un péptido señalizador de la localización en el aparato de Golgi,
- iii. un fragmento de ADN que codifica NOD C de *Azorhizobium caulinodans* clonado en el marco con el fragmento de ADN previo,
- 10 iv. la secuencia no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor,
- v. la región promotora SCW-PRP selectiva en fibras según la secuencia procedente de la posición nucleotídica 61 a 1499 de SEQ ID 3,
- vi. una región de ADN que tiene la secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de *E. coli* según SEQ ID 2,
- 15 vii. la secuencia no traducida 3' del gen de histona H4 de *Arabidopsis thaliana*.

Este gen quimérico se introdujo entre los límites de ADN T de un vector de ADN T junto con un gen sintético de 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (epsp) con mutación doble procedente de *Zea mays* (maíz) que proporciona resistencia a N-(fosfonometil)glicina como un marcador seleccionable. El vector de ADN T resultante se denominó pTDBI 252. La secuencia del ADN T de este vector se proporciona en SEQ ID 3. Los elementos genéticos del ADN T de este vector se representan en la Tabla 1.

Se construyó otro gen de GFAT quimérico que contenía las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:

- i. la región promotora tipo Fb8-1 selectiva en fibras según la secuencia desde la posición nucleotídica 60 a 1495 de SEQ ID 4,
- 25 ii. un fragmento de ADN que codifica los 35 aminoácidos N-terminales de la ADN xilosiltransferasa procedente de *Arabidopsis thaliana* que sirve como un péptido de localización en el aparato de Golgi,
- iii. un fragmento de ADN que codifica NOD C de *Azorhizobium caulinodans* clonado en el marco con el fragmento de ADN previo,
- iv. La secuencia no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor,
- 30 v. la región promotora tipo Fb8-1 selectiva en fibras según la secuencia desde la posición nucleotídica 60 a 1495 de SEQ ID 4,
- vi. una región de ADN que tiene la secuencia nucleotídica según SEQ ID 1 que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de *E. coli* según SEQ ID 2,
- vii. la secuencia no traducida 3' del gen de histona H4 de *Arabidopsis thaliana*.

35 Este gen quimérico se introdujo entre los límites a ADN T de un vector de ADN T junto con un gen epsps quimérico como un marcador seleccionable. El vector de ADN T resultante se denominó pTDBI 250. La secuencia del ADN T de este vector se proporciona en SEQ ID 4. Los elementos genéticos del ADN T se representan en la Tabla 2.

Tabla 1: Elementos del ADN T de pTDBI 252

Inicio	Final	Nombre	Descripción
1	25	RB	Repetición del límite derecho desde el ADN T de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
61	1499	PSCW-PRP	secuencia que incluye la región promotora de un gen de proteína de la pared celular rica en prolina de <i>Gossypium hirsutum</i>
1503	1607	RPXylTat	secuencia codificante para el péptido de retención en el aparato de Golgi del gen de beta-1,2-xilosiltransferasa de <i>A. thaliana</i>
1608	2798	NodC	secuencia codificante del gen de N-acetilglucosaminiltransferasa NodC de <i>Azorhizobium caulinodans</i>
2810	3030	3'35S	secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor
3068	4506	PSCW-PRP	secuencia que incluye la región promotora de un gen de proteína de la pared celular rica en prolina de <i>Gossypium hirsutum</i>
4510	6339	GFAT	región codificante del gen de glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de <i>Escherichia coli</i> optimizado para la expresión en células de plantas de algodón
6357	7017	3'H4 At	secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
7067	7983	PH4	secuencia que incluye la región promotora del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
8017	8497	intrón1 H3At + región de flanqueo	secuencia que incluye el primer intrón del gen II de la variante de histona H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i>
8502	8873	TP_opt	secuencia codificante del péptido transitorio optimizado, que contiene la secuencia de los genes subunitarios pequeños RuBisCO de <i>Zea mays</i> (maíz) y <i>Helianthus annuus</i>
8874	10211	2mepsps	secuencia codificante del gen de 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa de <i>Zea mays</i> (maíz)
10235	10895	3'H4 At	secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
11008	11032	LB	Repetición del límite izquierdo desde el ADN T de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Tabla 2: Elementos de pTDBI 250

Inicio	Final	Nombre	Descripción
1	25	RB	Repetición del límite derecho desde el ADN T de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
60	1495	Pfb8-tipo-1	secuencia que incluye la región promotora del gen tipo fb8 de <i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)
1497	1601	RPxylTat	secuencia codificante para el péptido de retención en el aparato de Golgi del gen de beta-1,2-xilosiltransferasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
1602	2792	NodC	secuencia codificante del gen de N-acetilglucosaminiltransferasa nodC de <i>Azorhizobium caulinodans</i>
2804	3026	3'35S	secuencia que incluye la región no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor

ES 2 702 207 T3

3061	4496	Pfb8-tipo-1	secuencia que incluye la región promotora del gen tipo fb8 de <i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)
4498	6327	GFAT	región codificante del gen de glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa de <i>Escherichia coli</i> optimizado para la expresión en células de plantas de algodón
6345	7005	3'H4 At	secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
7056	7970	PH4 AT	secuencia que incluye la región promotora del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
8005	8486	intrón1 H3At + región de flanqueo	secuencia que incluye el primer intrón del gen II de la variante de histona H3.III de <i>Arabidopsis thaliana</i>
8490	8861	TP_opt	secuencia codificante del péptido transitorio optimizado, que contiene la secuencia de los genes subunitarios pequeños RuBisCO de <i>Zea mays</i> (maíz) y <i>Helianthus annuus</i>
8862	10199	2mepsps	secuencia codificante del gen de 5-enol-piruvilsiquimato-3-fosfato sintasa con doble mutación de <i>Zea mays</i> (maíz)
10223	10883	3'H4 At	secuencia que incluye la región no traducida 3' del gen de histona H4 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
10996	11020	LB	Repetición del límite izquierdo desde el ADN T de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Como un control, se usó un gen quimérico que contenía las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:

- i. la región promotora SCW-PRP selectiva en fibras según la secuencia desde la posición nucleotídica 61 a 1499 de SEQ ID 3,
- 5 ii. un fragmento de ADN que codifica los 35 aminoácidos N-terminales de la ADN xilosiltransferasa procedente de *Arabidopsis thaliana*,
- iii. un fragmento de ADN que codifica NOD C de *Azorhizobium caulinodans* clonado en el marco con el fragmento de ADN previo,
- iv. la secuencia no traducida 3' del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor,
- 10 v. la región promotora SCW-PRP selectiva en fibras según una secuencia procedente de la posición nucleotídica 61 a 1499 de SEQ ID 3,
- vi. una región de ADN que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa procedente de *E. coli* que estaba optimizada para la utilización de codones en plantas según se describe en el documento WO 2007/039314 bajo SEQ ID 10 del mismo,
- 15 vii. la secuencia no traducida 3' del gen de histona H4 de *Arabidopsis thaliana*.

Este gen quimérico se introdujo entre los límites de ADN T de un vector de ADN T junto con un gen epsps quimérico como un marcador seleccionable. El vector de ADN T resultante se denominó pTGK 110, Este vector es idéntico a pTDBI252 excepto para la secuencia codificante de GFAT.

- 20 Ejemplo 2: Generación de plantas de algodón transgénicas que expresan una glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (solamente para referencia)

Los vectores de ADN T se introdujeron en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían un plásmido Ti cooperador y se usaron en la transformación de algodón esencialmente como se describe en el documento WO00/71733. Las plantas T0 se analizaron adicionalmente como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Determinación del contenido de glucosamina de fibras de algodón (solamente para referencia)

Fibras procedentes de plantas T0 de algodón transgénicas se aislaron, se trataron con ácido trifluoroacético (TFA) para hidrolizar los polímeros de glucosamina y se analizaron con respecto al contenido de glucosamina mediante HPLC. Todas las etapas se llevaron a cabo siguiendo protocolos estándar.

5 Las fibras de líneas no transformadas contenían aproximadamente 0,01% de GlcN. Los resultados para el contenido de glucosamina medido de fibras de algodón procedentes de diferentes plantas T0 que expresaban el gen de GFAT descrito en la presente bajo el control del promotor SCW-PRP (transformado con pTDBI 252) se representan en la Tabla 3.

10 **Tabla 3:** Contenido de GlcN de fibras de algodón procedentes de plantas T0 individuales

GFAT optimizada (pTDBI 252)		GFAT control (pTGK 110)	
pl1	0,0115 *	cpl1	0,0101 *
pl2	0,0118 *	cpl2	0,0112 *
pl3	0,0136 *	cpl3	0,0120 *
pl4	0,0141 *	cpl4	0,0121 *
pl5	0,0318	cpl5	0,0125 *
pl6	0,0340	cpl6	0,0316
pl7	0,0371	cpl7	0,0330
pl8	0,0389	cpl8	0,0334
pl9	0,0401	cpl9	0,0349
pl10	0,0405	cpl10	0,0425
pl11	0,0431	cpl11	0,0446
pl12	0,0448	cpl12	0,0536
pl13	0,0472	cpl13	0,0546
pl14	0,0502	cpl14	0,0566
pl15	0,0530	cpl15	0,0589
pl16	0,0538	cpl16	0,0597
pl17	0,0558	cpl17	0,0599
pl18	0,0630	cpl18	0,0714
pl19	0,0674	Promedio:	0,0385
pl20	0,0762		
pl21	0,0783		
pl22	0,0811		
pl23	0,0817		
pl24	0,0910		
pl25	0,0929		
pl26	0,0965		
pl27	0,1016		
pl28	0,1152		
pl29	0,1243		
pl30	0,1319		
Promedio:	0,0607		

Los valores representan % de GlcN del peso de fibras total; *: considerado como fondo

Los números dados representan el % de GlcN del peso total de fibras. Los valores por debajo de 0,015 se consideraban como fondo. La Tabla 3 también muestra en contenido de GlcN encontrado en fibras procedentes de plantas de algodón T0 individuales que se transformaban con el vector de control pTGK 110 que comprende una región de ADN codificante de GFAT que está optimizada para la utilización de codones en plantas y se conoce en la técnica.

La Tabla 4 muestra el contenido de GlcN promedio y máximo (medido en % del peso total de fibras) de fibras de algodón derivadas de plantas T0 que expresan el gen GFAT descrito en la presente bajo el control del promotor SCW-PRP o bajo el control del promotor tipo Fb8-1. Como un control, se dan valores para plantas que expresan el gen de GFAT optimizado para plantas descrito en el documento WO 2007/039314. El contenido promedio de GlcN de fibras que expresan la secuencia del gen de GFAT según SEQ ID 1 bajo el control del promotor SCW-PRP estaba aproximadamente cuatro veces por encima del nivel de fondo (0,061% frente a 0,015%) y casi dos veces el de plantas de control que expresan una secuencia del gen de GFAT optimizada para plantas publicada en el documento WO 2007/039314 (0,061% frente a 0,039%). El contenido de GlcN máximo que se medía en una planta T0 que expresa el gen GFAT descrito en la presente bajo el control del promotor SCW-PRP estaba casi 10 veces por encima del nivel de fondo de fibras procedentes de plantas que no expresan una construcción génica introducida artificialmente (0,132% frente a 0,015%). Por otra parte, era casi dos veces el de plantas de control que expresan una secuencia del gen de GFAT optimizada para plantas publicada en el documento WO 2007/039314 (0,132% frente a 0,071%). Asimismo, las plantas que expresan un gen de GFAT según SEQ ID 1 bajo el control del promotor tipo Fb8-1 tenían un incremento máximo en el contenido de GlcN de las fibras de más de 10 veces (0,178% frente a 0,015%) y un incremento promedio de 2 veces en el contenido de GlcN de las fibras (0,039% frente a 0,015%) en comparación con plantas que no expresan una construcción génica introducida artificialmente.

Tabla 4: Contenido de GlcN medio y promedio de fibras procedentes de plantas de algodón T0 que expresan un gen de GFAT según SEQ ID 1 bajo el control de diferentes promotores selectivos en fibras)

Promotor	GFAT promedio	ctrl.	GFAT máx.	ctrl.	GFAT promedio	opt.	GFAT máximo	opt.
SCW-PRP	0,039		0,071		0,061		0,132	
Tipo Fb8-1					0,039		0,178	

Los valores representan % de GlcN del peso total de fibras

Ejemplo 4: Fibras de algodón con reactividad incrementada

Plantas de algodón transgénicas que comprenden un gen de GFA quimérico y un gen de NOD C quimérico ligados operativamente a un promotor específico en fibras como el esbozado en el Ejemplo 1 se generan como se describe en el Ejemplo 2. Se recogen fibras de algodón maduras de estas plantas y se pueden colorear con tintes aniónicos tales como rojo Congo o se pueden hacer reaccionar con Alexa fluor 555 acoplado a aglutinina de germen de trigo (WGA). WGA se une específicamente a N-acetilglucosamina en células de planta y por lo tanto se puede usar como un reactivo de detección para N-acetilglucosamina. Además, las fibras de algodón maduras resultantes se pueden colorear con tintes comerciales incluyendo tintes reactivos para algodón (p. ej. Reactive Red 120, Levafix Blue CA), tintes ácidos (Acid Orange 7, Acid Blue 281) y tintes reactivos para lana (p. ej. Reactive Red 116, Realan Amber EHF).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer CropScience NV
 Meulewaeter, Frank

5 <120> Fibras de algodón con contenido de glucosamina incrementado

<130> BCS14-2002

<160> 4

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 1830

<212> ADN

<213> artificial

20 <220>

<223> secuencia artificial que codifica la glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) de E. coli

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1830)

30 <400> 1

atg tgc gga att gtt ggc gca ata gca caa agg gac gta gca gaa atc 48
 Met Cys Gly Ile Val Gly Ala Ile Ala Gln Arg Asp Val Ala Glu Ile
 1 5 10 15

ctt ctt gaa gga ctc cgt cgt ctg gaa tac aga gga tat gat tct gcc 96
 Leu Leu Glu Gly Leu Arg Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala
 20 25 30

ggt cta gcc gtt gta gat gcc gaa ggt cac atg aca cgt cta aga cgt 144
 Gly Leu Ala Val Val Asp Ala Glu Gly His Met Thr Arg Leu Arg Arg
 35 40 45

ctg ggt aag gtt caa atg ctg gct caa gca gcc gaa gaa cat cct tta 192
 Leu Gly Lys Val Gln Met Leu Ala Gln Ala Ala Glu Glu His Pro Leu
 50 55 60

cat ggt ggc aca ggt att gct cac act aga tgg gct act cac ggt gaa 240
 His Gly Gly Thr Gly Ile Ala His Thr Arg Trp Ala Thr His Gly Glu
 65 70 75 80

cct tca gag gta aat gct cat cca cat gtc tct gag cac att gtg gtc 288
 Pro Ser Glu Val Asn Ala His Pro His Val Ser Glu His Ile Val Val
 85 90 95

ggt cac aac ggg atc atc gaa aac cat gaa cca ctt cga gaa gag ctg 336
 Val His Asn Gly Ile Ile Glu Asn His Glu Pro Leu Arg Glu Glu Leu
 100 105 110

aaa gct cgt ggc tat act ttc gtt tca gag aca gac act gag gtg att 384
 Lys Ala Arg Gly Tyr Thr Phe Val Ser Glu Thr Asp Thr Glu Val Ile
 115 120 125

gct cat ctc gtg aac tgg gaa ctg aaa caa ggg gga act ctg aga gag 432
 Ala His Leu Val Asn Trp Glu Leu Lys Gln Gly Gly Thr Leu Arg Glu
 130 135 140

ES 2 702 207 T3

gct gtt cta cgt gct atc cct caa tta cgt ggt gct tac ggg aca gtg Ala Val Leu Arg Ala Ile Pro Gln Leu Arg Gly Ala Tyr Gly Thr Val 145 150 155 160	480
atc atg gat tca aga cac cca gat aca ctg ctg gca gca agg tct ggt Ile Met Asp Ser Arg His Pro Asp Thr Leu Leu Ala Ala Arg Ser Gly 165 170 175	528
agt cca ctg gtg att gga ctg ggg atg gga gaa aac ttt atc gct tcg Ser Pro Leu Val Ile Gly Leu Gly Met Gly Glu Asn Phe Ile Ala Ser 180 185 190	576
gat caa ctg gct ctg tta cct gtg aca cgg aga ttt atc ttc ctt gaa Asp Gln Leu Ala Leu Leu Pro Val Thr Arg Arg Phe Ile Phe Leu Glu 195 200 205	624
gag ggc gat atc gcg gaa ata act cga cgt agc gta aac atc ttc gat Glu Gly Asp Ile Ala Glu Ile Thr Arg Arg Ser Val Asn Ile Phe Asp 210 215 220	672
aaa acc gga gca gaa gta aaa cgc cag gat atc gaa tcc aat ctt caa Lys Thr Gly Ala Glu Val Lys Arg Gln Asp Ile Glu Ser Asn Leu Gln 225 230 235 240	720
tac gac gcc ggc gat aaa ggc ata tac cga cac tac atg cag aaa gag Tyr Asp Ala Gly Asp Lys Gly Ile Tyr Arg His Tyr Met Gln Lys Glu 245 250 255	768
atc tac gag caa ccg aac gct atc aag aat acc ctt act ggg cgt atc Ile Tyr Glu Gln Pro Asn Ala Ile Lys Asn Thr Leu Thr Gly Arg Ile 260 265 270	816
tca cat ggt cag gtt gac tta tct gaa ctg gga cca aac gca gac gaa Ser His Gly Gln Val Asp Leu Ser Glu Leu Gly Pro Asn Ala Asp Glu 275 280 285	864
cta ctg tcg aag gta gaa cat att cag atc ctc gcg tgt ggt act tct Leu Leu Ser Lys Val Glu His Ile Gln Ile Leu Ala Cys Gly Thr Ser 290 295 300	912
tat aac tct ggt atg gtc agt cgc tat tgg ttt gaa tca ctg gca gga Tyr Asn Ser Gly Met Val Ser Arg Tyr Trp Phe Glu Ser Leu Ala Gly 305 310 315 320	960
att cct tgc gac gtc gaa att gcc tcg gaa ttc aga tat cgc aag tct Ile Pro Cys Asp Val Glu Ile Ala Ser Glu Phe Arg Tyr Arg Lys Ser 325 330 335	1008
gca gta aga cgc aac agc ctg atg ata acg tta tct cag tct gga gaa Ala Val Arg Arg Asn Ser Leu Met Ile Thr Leu Ser Gln Ser Gly Glu 340 345 350	1056
acg gct gat aca ctg gct gga tta cgt ctg tca aaa gag ctt ggc tac Thr Ala Asp Thr Leu Ala Gly Leu Arg Leu Ser Lys Glu Leu Gly Tyr 355 360 365	1104
ctt ggt tct cta gca atc tgt aac gtt cct ggt agc tct ctt gtg cga Leu Gly Ser Leu Ala Ile Cys Asn Val Pro Gly Ser Ser Leu Val Arg 370 375 380	1152
gaa tct gat ctt gct ctt atg act aac gct ggt aca gaa atc ggg gtg Glu Ser Asp Leu Ala Leu Met Thr Asn Ala Gly Thr Glu Ile Gly Val	1200

ES 2 702 207 T3

385	390	395	400	
gca tcc aca aaa gca ttt aca act caa ctt acg gtg ctg cta atg ctt				1248
Ala Ser Thr Lys	Ala Phe Thr Thr	Gln Leu Thr Val	Leu Leu Met Leu	
	405	410	415	
gtg gca aag ctg tct aga ctc aaa ggt cta gat gcc tcc atc gag cat				1296
Val Ala Lys Leu	Ser Arg Leu Lys	Gly Leu Asp Ala Ser	Ile Glu His	
	420	425	430	
gat atc gtt cat ggt ctg caa gct ctt cct agc cga att gag cag atg				1344
Asp Ile Val His	Gly Leu Gln Ala	Leu Pro Ser Arg	Ile Glu Gln Met	
	435	440	445	
ctg tca caa gac aaa agg att gaa gcc ctg gca gaa gat ttc tca gac				1392
Leu Ser Gln Asp	Lys Arg Ile Glu	Ala Leu Ala Glu	Asp Phe Ser Asp	
	450	455	460	
aag cat cac gct ttg ttt ctc ggt cgt ggc gat cag tat cct atc gct				1440
Lys His His Ala	Leu Phe Leu Gly	Arg Gly Asp Gln Tyr	Pro Ile Ala	
	465	470	475	480
ctc gaa ggc gca ttg aag ctc aaa gag atc tcc tat ata cac gct gaa				1488
Leu Glu Gly Ala	Leu Lys Leu Lys	Glu Ile Ser Tyr	Ile His Ala Glu	
	485	490	495	
gct tac gct gca ggc gaa ctg aaa cac gga cct cta gct ctt att gac				1536
Ala Tyr Ala Ala	Gly Glu Leu Lys	His Gly Pro Leu	Ala Leu Ile Asp	
	500	505	510	
gca gat atg ccc gtt atc gtc gtt gca cca aac aac gaa ttg ctg gag				1584
Ala Asp Met Pro	Val Ile Val Val	Ala Pro Asn Asn	Glu Leu Leu Glu	
	515	520	525	
aag ctg aaa tca aat att gaa gag gta cgt gca aga ggc gga caa ctt				1632
Lys Leu Lys Ser	Asn Ile Glu Glu	Val Arg Ala Arg	Gly Gly Gln Leu	
	530	535	540	
tat gtc ttc gct gag caa gat gcc ggt ttt gta agt agc gat aac atg				1680
Tyr Val Phe Ala	Glu Gln Asp Ala	Gly Phe Val Ser	Ser Asp Asn Met	
	545	550	555	560
cac atc atc gag atg cct cac gtg gaa gag gtg att gct ccg atc ttc				1728
His Ile Ile Glu	Met Pro His Val	Glu Glu Val Ile	Ala Pro Ile Phe	
	565	570	575	
tac aca gtt ccc ctg cag ctt ctg gct tat cac gtt gcc ctt atc aaa				1776
Tyr Thr Val Pro	Leu Gln Leu Leu	Ala Tyr His Val	Ala Leu Ile Lys	
	580	585	590	
gga act gac gtt gac cag cca agg aat ctc gca aag tca gta acg gtt				1824
Gly Thr Asp Val	Asp Gln Pro Arg	Asn Leu Ala Lys	Ser Val Thr Val	
	595	600	605	
gag taa				1830
Glu				

<210> 2

5 <211> 609

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 2

ES 2 702 207 T3

Met Cys Gly Ile Val Gly Ala Ile Ala Gln Arg Asp Val Ala Glu Ile
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Gly Leu Arg Arg Leu Glu Tyr Arg Gly Tyr Asp Ser Ala
 20 25 30

Gly Leu Ala Val Val Asp Ala Glu Gly His Met Thr Arg Leu Arg Arg
 35 40 45

Leu Gly Lys Val Gln Met Leu Ala Gln Ala Ala Glu Glu His Pro Leu
 50 55 60

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

Pro Ser Glu Val Asn Ala His Pro His Val Ser Glu His Ile Val Val
 85 90 95

Val His Asn Gly Ile Ile Glu Asn His Glu Pro Leu Arg Glu Glu Leu
 100 105 110

Lys Ala Arg Gly Tyr Thr Phe Val Ser Glu Thr Asp Thr Glu Val Ile
 115 120 125

Ala His Leu Val Asn Trp Glu Leu Lys Gln Gly Gly Thr Leu Arg Glu
 130 135 140

Ala Val Leu Arg Ala Ile Pro Gln Leu Arg Gly Ala Tyr Gly Thr Val
 145 150 155 160

Ile Met Asp Ser Arg His Pro Asp Thr Leu Leu Ala Ala Arg Ser Gly
 165 170 175

Ser Pro Leu Val Ile Gly Leu Gly Met Gly Glu Asn Phe Ile Ala Ser
 180 185 190

Asp Gln Leu Ala Leu Leu Pro Val Thr Arg Arg Phe Ile Phe Leu Glu
 195 200 205

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

Lys Thr Gly Ala Glu Val Lys Arg Gln Asp Ile Glu Ser Asn Leu Gln

ES 2 702 207 T3

Leu Glu Gly Ala Leu Lys Leu Lys Glu Ile Ser Tyr Ile His Ala Glu
 485 490 495

Ala Tyr Ala Ala Gly Glu Leu Lys His Gly Pro Leu Ala Leu Ile Asp
 500 505 510

Ala Asp Met Pro Val Ile Val Val Ala Pro Asn Asn Glu Leu Leu Glu
 515 520 525

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

Tyr Val Phe Ala Glu Gln Asp Ala Gly Phe Val Ser Ser Asp Asn Met
 545 550 555 560

His Ile Ile Glu Met Pro His Val Glu Glu Val Ile Ala Pro Ile Phe
 565 570 575

Tyr Thr Val Pro Leu Gln Leu Leu Ala Tyr His Val Ala Leu Ile Lys
 580 585 590

Gly Thr Asp Val Asp Gln Pro Arg Asn Leu Ala Lys Ser Val Thr Val
 595 600 605

Glu

<210> 3

5 <211> 11032

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> ADN T de pTDBI 252

15 <400> 3

Ç
 aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gcgcggccgc 60
 ttcacggaaa gttgttatat ataagttcag taaataataa tgaaatataa attttaatta 120
 tatctagtac tcaataagaa gatggagaaa gttatgtaa ttatagttat aaattattta 180
 taaatttaaat atatatatat aaagaaaata gttgtataac taataattat ttttacaata 240
 ctttatatag ttatatttaa aaaaatttta aaattaaaat actattattt tgttcaatat 300
 attaataatt atattattta atttattatt gaatatgaat aaattttttt tgaaaattat 360
 atttttaatt tttagaaatt ttatataact ttccatatat atatttctga tttgtcaatt 420
 tcttttgaga tttatctaaa ttgatttgaa ttttttttat ttttaaaaaa taaaataatt 480
 ttaaaatttc ttggaatttt atataaattt ttggattttt caaaaaaat tgagattttt 540

ES 2 702 207 T3

ttctttttt tcgattttt aaatttatt caggaaaata taaactaact tttctttgct 600
 ttgggtataa ttaatattag ataaccaca aattagatca ataggagctt catgtcctaa 660
 tcccatttaa ttacttttgt tgtatcatta atttagtcga ccttacatag tagctctatg 720
 gggcaaatag ttataaatgt taaattagta tttaaatctt gaagttttta atttaaagtt 780
 cagactatta gtattatattc aaatatttaa gggtaaatat atattctaata atctaagctt 840
 gggcaaggt ttaaattaag tacttaaaact tggttttata gttcaaattg atttaaataa 900
 ctaagtatta atttgaatta agaagcaaaag ttcaagtacc taattagact ataaaaaaaa 960
 cttttgctag taaattgaac cttaaagtgc agtttagtta tctaattgga caaaaaaatc 1020
 ttaaatacca atttaaacc taaagtcaag tttaggtacc aaagtgtata tttatctaata 1080
 atttaaattt gatccacctt atttaaattt ttttggcca atgcaataag agaattaatt 1140
 aatacttaca cacatgatag agatataccc acaacagata cacactaca aaaaacattaa 1200
 aaaatagaaa gatataattc ctacaaaatt taaaagcatt taatttttta actaacatta 1260
 gacaaatgga aatgaaaga cttattttta agtttatgga tgaatctaata tttatctaac 1320
 attgggtttt ttttttttgc gacgaaatat gggtgagaga aggtagtaag ctaagtaggg 1380
 gagtaatatc tcaaacaaat aattaaaaaa ctcttttaa tgtggctata aatacctgaa 1440
 accaatcctt ctttcctcaa ctcaaatctt caatctttag atcatctctc caaaaaata 1500
 ccatgagtaa acggaatccg aagattctga agatttttct gtatatgta cttctcaact 1560
 ctctctttct catcatctac ttcgtttttc actcatctgc gttttcaagt gtcgtagatg 1620
 tgatcggttt gcttgcgact gcagcctacg tgacgttggc gagcgcatag aagggtggcc 1680
 agttcattaa cgtgtcgagc gtaacggatg tcgctggtct cgaaagtgat gctttgccgc 1740
 tcaactcaag ggttgacggt atcgtgccga cattcaatga gaactccagc acattgctcg 1800
 agtgcgctgc ttctatatgc gcacaagact accgcggacc aataacgatt gtcgtggtag 1860
 acgatgggtc gaccaacaaa acatcatttc acgcagtatg cgacaagtac gcgagcgacg 1920
 aaaggttcat atttgcgaa cttgatcaaa acaaggggaa gcgcgccgcg caaatggagg 1980
 ccatcaggag aacagacgga gacctgatac taaacgtaga ctccggacacg gttatagata 2040
 aggatgttgt taaaaagctt gcgctctcca tgagagcccc gaatgtcggg ggtgtcatgg 2100
 ggcagctcgt tgcaaaagaat cgagaaagat cttggcttac cagattaatc gatatggagt 2160
 actggcttgc gtgtaacgag gagcgcattg cgcagtcgag gtttggctcc gtgatgtgtt 2220
 gttgtgggcc gtgcgccatg tatagaagat ctgcaattac gccactattg gcagaatatg 2280
 agcaccagac attcctaggg cgtccgagca actttgttga ggatcgccat ctcaaatcc 2340
 tgatgctgaa ggcgggattt cggaccgggt acgtcccagg tgccgtagcg aggacgttgg 2400
 ttccggatgg gctggcgcg tacctgcgcc agcaactccg ctgggcccgc agcacttatc 2460

ES 2 702 207 T3

gcgacaccgc cctcgcctta cgtataaaga aaaatctaag caaatatata acctttgaga 2520
 tatgcgacaca gaatttgggt acggctctct tacttgtgat gaccatgatt tcgctttcgc 2580
 tgactacatc agggtcgcaa acgcccgtta tcattctggg tgcctgttg gggatgtcta 2640
 taataagatg ttgttctgtc gcccttatag cgaaagattt tcggtttcta tacttcatcg 2700
 ttcactcagc gttgaatggt ctaattttaa cgccgttaaa actctatgcc ctgttaacca 2760
 ttcgggatag tcggtggcta tcacgcgaga gttcctaagc tagcaagctt ggacacgctg 2820
 aatcaccag tctctctcta caaatctatc tctctctatt ttctccataa taatgtgtga 2880
 gtagttccca gataagggaa ttagggttcc tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat 2940
 aagaaacct tagtatgat ttgtatttgt aaaacttct tatcaataaa atttctaatt 3000
 cctaaaacca aaatccagta ctaaaatcca gacgcgtcct gcaggcccg gttaattaag 3060
 cggccgcttc acggaaagt gttatatata agttcagtaa ataataatga aatataaatt 3120
 ttaattatata ctagtactca ataagaagat ggagaaagt atgttaatta tagttataaa 3180
 ttatttataa atttaataa tatatataaa gaaaatagtt gtataactaa taattatttt 3240
 tacaatactt tatatagtta tatttaaaaa aattttaaaa ttaaaatact attattttgt 3300
 tcaatatatt aatatttata ttatttaatt tattattgaa tatgaataaa tttttttga 3360
 aaattatatt tttaattttt agaaatttta tataactttc catatatata tttctgattt 3420
 gtcaatttct tttgagattt atctaaattg atttgaattt tttttatttt taaaaataa 3480
 aataatttta aaatttcttg gaattttata taaatttttg gatttttcaa aaaaaattga 3540
 gatttttttc tttttttcog attttttaaa tttatttcag gaaaatataa actaactttt 3600
 ctttgctttg ggtataatta atattagata accacaaaat tagatcaata ggagcttcat 3660
 gtcctaatacc catttaatta cttttgttgt atcattaatt tagtcgacct tacatagtag 3720
 ctctatgggg caaatagtta taaatgttaa attagtattt aaatcttgaa gtttttaatt 3780
 taaagttcag actattagta ttatatcaaa tatttaaggg taaatatata ttctaatac 3840
 taagcttggg tcaaggttta aattaagtac ttaaacttgg ttttatagtt caaattgatt 3900
 taaataacta agtattaatt tgaattaaga agcaaagttc aagtacctaa ttagactata 3960
 aaaaaaactt ttgctagtaa attgaacctt aaagtcgagt ttagttatct aattggacaa 4020
 aaaaatctta aataccaatt taaaccctaa agtcaagttt aggtaccaa gtgtatattt 4080
 atctaataat taaatttgat ccacctaatt taaatttttt tggccaatg caataagaga 4140
 attaattaat acttacacac atgatagaga tatacccaca acagatacac actacaaaaa 4200
 acattaaaaa atagaaagat atatttcta caaaatttaa aagcatttaa ttttttaact 4260
 aacattagac aaatggaaat ggaaagactt atttttaagt ttatggatga atctaattta 4320

ES 2 702 207 T3

tctaaacatt ggggtttttt tttttgtgac gaaatatggg tgagagaagg tagtaagcta 4380
 agtaggggag taatatctca aacaaataat taaaaaactc ctttaaagt ggctataaat 4440
 acctgaaacc aatccttctt tcctcaactc aaatcttcaa tctttagatc atctctccaa 4500
 aaaaatacca tgtgcggaat tgttgccgca atagcacaaa gggacgtagc agaaatcctt 4560
 cttgaaggac tccgctgtct ggaatacaga ggatatgatt ctgccggtct agccggttga 4620
 gatgccgaag gtcacatgac acgtctaaga cgtctgggta aggttcaaat gctggctcaa 4680
 gcagccgaag aacatccttt acatggtggc acaggattg ctcacactag atgggctact 4740
 cacggtgaac cttcagaggt aaatgctcat ccacatgtct ctgagcacat tgtggctggt 4800
 cacaacggga tcatcgaaaa ccatgaacca cttcgagaag agctgaaagc tcgtggctat 4860
 actttcgttt cagagacaga cactgaggtg attgctcatc tcgtgaactg ggaactgaaa 4920
 caagggggaa ctctgagaga ggctgttcta cgtgctatcc ctcaattacg tggtgcttac 4980
 gggacagtga tcatggattc aagacacca gatacactgc tggcagcaag gtctggtagt 5040
 ccactggtga ttggactggg gatgggagaa aactttatcg cttcggatca actggctctg 5100
 ttacctgtga cacggagatt tatcttcctt gaagagggcg atatcgcgga aataactcga 5160
 cgtagcgtaa acatcttoga taaaaccgga gcagaagtaa aacgccagga tatcgaatcc 5220
 aatcttcaat acgacgccgg cgataaaggc atataccgac actacatgca gaaagagatc 5280
 tacgagcaac cgaacgctat caagaatacc cttactgggc gtatctcaca tggtcagggt 5340
 gacttatctg aactgggacc aaacgcagac gaactactgt cgaaggtaga acatattcag 5400
 atcctcgcgt gtggacttct ttataactct ggtatggtca gtcgctattg gtttgaatca 5460
 ctggcaggaa ttccttgoga cgtcgaatt gcctcggat tcagatatcg caagtctgca 5520
 gtaagacgca acagcctgat gataacgtta tctcagctcg gagaaacggc tgatacactg 5580
 gctggattac gtctgtcaaa agagcttggc taccttgggt ctctagcaat ctgtaacgtt 5640
 cctggtagct ctcttgtgcg agaactctgat cttgctctta tgactaacgc tggtacagaa 5700
 atcgggggtg catccacaaa agcatttaca actcaactta cggtgctgct aatgcttgtg 5760
 gcaaagctgt ctgactcaa aggtctagat gcctccatcg agcatgatat cgttcatggt 5820
 ctgcaagctc ttcctagccg aattgagcag atgctgtcac aagacaaaag gattgaagcc 5880
 ctggcagaag atttctcaga caagcatcac gctttgttct cgggtcgtgg cgatcagtat 5940
 cctatcgctc tcgaaggcgc attgaagctc aaagagatct cctatataca cgtgaagct 6000
 tacgctgcag gcgaactgaa acacggacct ctgactctta ttgacgcaga tatgccggtt 6060
 atcgtcgttg caccaaaaaa cgaattgctg gagaagctga aatcaaata tgaagaggta 6120
 cgtgcaagag gcggacaact ttatgtcttc gctgagcaag atgccggttt tgtaagtagc 6180
 gataacatgc acatcatcga gatgcctcac gtggaagagg tgattgctcc gatcttctac 6240

ES 2 702 207 T3

acagttcccc tgcagcttct ggcttatcac gttgccctta tcaaaggaac tgacgttgac 6300
 cagccaagga atctcgcaaa gtcagtaacg gttgagtaaa cgcgtggcgc gccccgatc 6360
 cgcgtttgtg ttttctgggt ttctcactta agcgtctgcg ttttactttt gtattgggtt 6420
 tggcgtttag tagtttgccg tagcgttctt gttatgtgta attacgcttt ttcttcttgc 6480
 ttcagcagtt tcggttgaaa tataaatcga atcaagtctc actttatcag cgttgtttta 6540
 aattttggca ttaaattggt gaaaattgct tcaattttgt atctaataag aagagacaac 6600
 atgaaattcg acttttgacc tcaaatcttc gaacatttat ttcttgattt cacgatggat 6660
 gaggataacg aaagggcggg tcctatgtcc gggaaagtcc ccgtagaaga caatgagcaa 6720
 agctactgaa acgoggacac gacgtcgcac tggtagcgat atgagttaaa ccgactcaat 6780
 tcctttatta agacataaac cgattttggg taaagtgtaa cagttagctg atataaaacc 6840
 gaaacaaacc ggtacaagtt tgattgagca acttgatgac aaacttcaga attttggtta 6900
 ttgaatgaaa atcatagtct aatcgtaaaa aatgtacaga agaaaagcta gagcagaaca 6960
 aagattctat attctggctc caatttatca tcgctttaac gtccttcaga tttgatcggg 7020
 gaattcgata tcattaccct gttatcccta aagcttatta atgtttgtcg aggagaaata 7080
 tgagtcgagg catggataca ctaagtccc ctgaagtgag catgatcttt gatgctgaga 7140
 tgattcccag agcaagatag tttgtgctgc aagtgcaca attgtaatga aaccaccact 7200
 caacgaattt acttgtggct ttgacatgtc gtgtgctctg tttgtatttg tgagtgccgg 7260
 ttggtaatta tttttgtaa tgtgatttta aaacctctta tgtaaatagt tactttatct 7320
 attgaagtgt gttcttggg tctatagttt ctcaaagga aattaaatg ttgacatccc 7380
 atttacaatt gataacttgg tatacacaaa ctttgtaaat ttggtgatat ttatggtcga 7440
 aagaaggcaa taccattgt atgtccaat atcaatatca atacgataac ttgataatac 7500
 taacatatga ttgtcattgt tttccagta tcaatataca ttaagctact acaaaattag 7560
 tataaatcac tatattataa atctttttcg gttgtaactt gtaattcgtg ggtttttaaa 7620
 ataaaagcat gtgaaaattt tcaataatg tgatggcgca attttatttt ccgagttcca 7680
 aaatattgcc gcttcattac cctaatttgt ggcgccacat gtaaaacaaa agacgattct 7740
 tagtggtat cactgccatc acgcgatca ctaatatgaa ccgtcgatta aaacagatcg 7800
 acggtttata catcatttta ttgtacacac ggatcgatat ctcagccgtt agatttaata 7860
 tgcgatctga ttgctcaaaa aatagactct ccgtctttgc ctataaaaac aatttcacat 7920
 ctttctcacc caaatctact cttaaccgtt cttcttcttc tacagacatc aatttctctc 7980
 gactctagag gatccaagct tatcgatttc gaaccctca ggcgaagaac aggtatgatt 8040
 tgtttgaat tagatcaggg gtttaggtct ttccattact ttttaatggt ttttctgtta 8100

ES 2 702 207 T3

ctgtctccgc gatctgattt tacgacaata gagtttcggg ttttgtccca ttccagtttg 8160
 aaaataaag tccgtctttt aagtttgctg gatcgataaa cctgtgaaga ttgagtctag 8220
 tcgatttatt ggatgatcca ttcttcatcg tttttttctt gcttcgaagt tctgtataac 8280
 cagatttgtc tgtgtgcgat tgtcattacc tagccgtgta tcgagaacta gggttttcga 8340
 gtcaattttg ccccttttgg ttatatctgg ttcgataacg attcatctgg attagggttt 8400
 taagtgggta cgttttagtat tccaatttct tcaaaattta gttatggata atgaaaatcc 8460
 ccaattgact gttcaatttc ttgttaaag cgcagatcac aatggcttcg atctcctcct 8520
 cagtcgcgac cgttagccgg accgcccctg ctcaggccaa catgggtggct ccgttcaccg 8580
 gccttaagtc caacgcgcc ttccccacca ccaagaaggc taacgacttc tccacccttc 8640
 ccagcaacgg tggaagagtt caatgtatgc aggtgtggcc ggcctacggc aacaagaagt 8700
 tcgagacgct gtcgtacctg ccgccgctgt ctatggcgcc caccgtgatg atggcctcgt 8760
 cggccaaccg cgtcgtctcg ttccaggggc tcaagtccac cgcacgcctc cccgtcgccc 8820
 gccgctcctc cagaagcctc ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccgg tgcattggccg 8880
 gcgccgagga gatcgtgctg cagcccatca aggagatctc cggcaccgtc aagctgccgg 8940
 ggtccaagtc gctttccaac cggatcctcc tactcgcgcg cctgtccgag gggacaacag 9000
 tgggtgataa cctgctgaac agtgaggatg tccactacat gctcggggcc ttgaggactc 9060
 ttggtctctc tgtcgaagcg gacaaagctg ccaaaagagc tgtagttgtt ggctgtggtg 9120
 gaaagtccc agttgaggat gctaaagagg aagtgcagct cttcttgggg aatgctggaa 9180
 tcgcaatgcg gtccttgaca gcagctgta ctgctgctgg tggaaatgca acttacgtgc 9240
 ttgatggagt accaagaatg agggagagac ccattggcga cttggttgtc ggattgaagc 9300
 agcttggtgc agatgtgat tgtttccttg gcaactgactg cccacctgtt cgtgtcaatg 9360
 gaatcggagg gctacctggt ggcaaggta agctgtctgg ctccatcagc agtcagtact 9420
 tgagtgcctt gctgatggct gctcctttgg ctcttgggga tgtggagatt gaaatcattg 9480
 ataaattaat ctccattccg tacgtcgaaa tgacattgag attgatggag cgttttggtg 9540
 tgaaagcaga gcattctgat agctgggaca gattctacat taagggaggt caaaaataca 9600
 agtcccctaa aaatgcctat gttgaagggt atgcctcaag cgcaagctat ttcttggtg 9660
 gtgctgcaat tactggaggg actgtgactg tggaaaggtt tggcaccacc agtttgacg 9720
 gtgatgtgaa gtttctgag gtactggaga tgatgggagc gaaggttaca tggaccgaga 9780
 ctacgtaac tgttactggc ccaccgcggg agccatttgg gaggaaacac ctcaaggcga 9840
 ttgatgtcaa catgaacaag atgcctgatg tcgccatgac tcttgctgtg gttgccctct 9900
 ttgccgatgg cccgacagcc atcagagacg tggcttctcg gagagtaaag gagaccgaga 9960
 ggatggttgc gatccggacg gagctaacca agctgggagc atctgttgag gaagggccgg 10020

ES 2 702 207 T3

actactgcat catcacgccg cgggagaagc tgaacgtgac ggcgatcgac acgtacgacg 10080
 accacaggat ggcgatggct ttctcccttg ccgcctgtgc cgagggtcccc gtcacccatcc 10140
 gggaccctgg gtgcaccocg aagaccttcc ccgactactt cgatgtgctg agcactttcg 10200
 tcaagaatta agctctagaa ctagtggatc ccccgatccg cgtttgtgtt ttctgggttt 10260
 ctcaactaag cgtctgcgtt ttacttttgt attgggtttg gcgttttagta gtttgcggta 10320
 gcgttcttgt tatgtgtaat tacgcttttt cttcttgctt cagcagtttc ggttgaaata 10380
 taaatcgaat caagtttcac tttatcagcg ttgttttaaa ttttggcatt aaattggtga 10440
 aaattgcttc aattttgtat ctaaatagaa gagacaacat gaaattcgac ttttgacctc 10500
 aaatcttoga acatttatth cctgatttca cgatggatga ggataacgaa agggcgggttc 10560
 ctatgtccgg gaaagttccc gtagaagaca atgagcaaag ctactgaaac gcggacacga 10620
 cgtcgcattg gtacggatat gagttaaac gactcaattc ctttattaag acataaacgg 10680
 attttggtta aagtgtaaca gtgagctgat ataaaaccga aacaaaccgg tacaagtttg 10740
 attgagcaac ttgatgacaa acttcagaat tttggttatt gaatgaaaat catagtctaa 10800
 tcgtaaaaaa tgtacagaag aaaagctaga gcagaacaaa gattctatat tctggttcca 10860
 atttatcatc gctttaacgt ccctcagatt tgatcgggaa accaaaacgt cgtgagacag 10920
 tttggttaac tataacggtc ctaaggtagc gatcggaggca ttacggcatt acggcactcg 10980
 cgagggtccg aattcgagca tggagccatt tacaattgaa tatatcctgc cg 11032

<210> 4

5 <211> 11020

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> ADN T de pTDBI 250

15 <400> 4

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact gggccccctc gagggcgatc gcgcggccgc 60
 atgattagtt agatcaagct tttgagtctt caaaaacata aaaattacaa aaaaaaaca 120
 aacttaaaat catthtatcaa tttgaacaac aaagcttggc cgaatgctaa gagcttaaaa 180
 atggcttctt ttgtttcttt ttgttgcaaa cgggtggagag aagagggaaa tgaagattga 240
 ccatatthtt ttattatgth ttaacatata atattaataa tthaatcata attatactth 300
 ggtgaaatgt acagtgggga gatacgtaaa gtatataaca ttatactthtt tgcaagcagt 360
 tggctggtct acccaagagt gatcaaaagt tgagctgcct tcaatgagcc aatthttgcc 420
 cataatggat aaaggcaatt tgtthtagtt aactgctcac agaataatgt taaaatgaaa 480
 ttaaaataag gtggcctggt cacacacaca aaaaaaact aatgthggtt ggttgaatt 540

ES 2 702 207 T3

tatattacgg aatgtaatat tatatthtaa aataaaatta tghtatttag attcttaata 600
 ttttgagcat tccatactat aatttcgtat acataatatt aaaatatagt aatataaagt 660
 gtaattaact ttaaattaca agcataatat taaatthtga atcaattaat ttttatttct 720
 attatthtaa ttaatttagt ctatthtttc aaaataaaat ttaaacttaa ataaaaataa 780
 tttttcctta atgttgaaac aactcatggt atacttcaaa attataagta ttatatttac 840
 cttgatgatt tatttatttag tatattaatt ctgattataa ttatggtggg atacaatcgc 900
 tttccactaa atatthtaac tatgatttat aaatthattt caacatcgtat tatttactta 960
 ttaatacata atthtataata atthttatgga aattgagacc aagaaacatt aagagaacaa 1020
 attctataac aaagacaatt tagaaaaaaa tgtactthta ggtaatthta agtactctta 1080
 accaaacaca aaaattcaaa tcaaatgaac taaataagat aatataacat acggaacatc 1140
 ttacttgtaa tcttacattc ccataattht attatgaaaa ataactttat attactcgaa 1200
 ctaaatggtg tcacaaatta ttatctaaat aaagaaaaac acttaattht tataacattt 1260
 tttcatatat ttgaaagatt atatthtga tatttacgta aaaatatttg acatagattg 1320
 agcaccttct taacataatc ccaccataag tcaagtatgt agatgagaaa ttggtacaaa 1380
 caacgtgggg ccaaatccca ccaaaccatc tctcattctc tcctataaaa ggcttgctac 1440
 acatagacaa caatccacac acaaatacac gttctthtct ttctatttga ttaacatga 1500
 gtaaacggaa tccgaagatt ctgaagattt ttctgtatat gttacttctc aactctctct 1560
 ttctcatcat ctacttcggt tttcactcat cgtcgttht c aagtgtcgtat gatgtgatcg 1620
 gtttgcttgc gactgcagcc tacgtgacgt tggcgagcgc atacaaggtg gtccagttca 1680
 ttaacgtgtc gagcgtaacg gatgtcgtg gtctcgaag tgatgctttg ccgctcactc 1740
 caagggttga cgttatcgtg ccgacattca atgagaactc cagcacattg ctcgagtgcg 1800
 tcgcttctat atgcgcacaa gactaccgcg gaccaataac gattgtcgtg gtagacgatg 1860
 ggtcgaccaa caaaacatca tttcacgag tatgcgacaa gtacgcgagc gacgaaaggt 1920
 tcataattht cgaacttgat caaaacaagg ggaagcgcgc cgcgcaaag gaggccatca 1980
 ggagaacaga cgggagactg atactaaacg tagactcggg cacggttata gataaggatg 2040
 ttgttacaaa gcttgctgctg tccatgagag ccccgaaatg cgggtggtgc atggggcagc 2100
 tcggtgcaaa gaatcgagaa agatcttggc ttaccagatt aatcgatatg gactactggc 2160
 ttgctgtaa cgaggagcgc attgcgcagt cgaggthtgg ctccgtgatg tgttgttgtg 2220
 ggccgtgctc catgtataga agatctgcaa ttaccgactc attggcagaa tatgagcacc 2280
 agacattcct agggcgtccg agcaacttht gtgaggatcg ccatctcaca atcctgatgc 2340
 tgaaggcggg atthcggacc gggtagctcc cagggtccgt agcggagacg ttggttccgg 2400
 atgggctggc gccgtacctg cgcagcaac tccgctgggc ccgcagcact tatcgcgaca 2460

ES 2 702 207 T3

ccgccctcgc cttacgtata aagaaaaatc taagcaaata taccaccttt gagatatgcg 2520
 cacagaatth gggtacggct ctcttacttg tgatgacat gatttcgctt tcgctgacta 2580
 catcagggtc gcaaacgccc gttatcattc tgggtgtcgt tgtggggatg tctataataa 2640
 gatgttgctc tgctgccctt atagcgaag attttcggtt tctatacttc atcgttcact 2700
 cagcgttgaa tgttctaatt ttaacgccgt taaaactcta tgcctgtta accattcggg 2760
 atagtcgggtg gctatcacgc gagagttcct aagctagcaa gcttggacac gctgaaatca 2820
 ccagctcttc tctacaaatc tatctctctc tattttctcc ataataatgt gtgagtagtt 2880
 ccagataag ggaattaggg ttcctatagg gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa 2940
 cccttagtat gtatttgat ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa 3000
 accaaaatcc agtactaaaa tccagacgcg tcctgcaggc ccgggttaat taagcggccg 3060
 catgattagt tagatcaagc ttttgagtct tcaaaaacat aaaaattaca aaaaaaaaaac 3120
 aaacttaaaa tcatttatca atttgaacaa caaagcttgg ccgaatgcta agagcttaaa 3180
 aatggcttct tttgtttctt tttgttgcaa acggtggaga gaagagggaa atgaagattg 3240
 accatatttt tttattatgt tttaacatat aatattaata atttaacat aattatactt 3300
 tggatgaatg gacagtgagg agatcagtaa agtatataac attatacttt ttgcaagcag 3360
 ttggctggtc tacccaagag tgatcaaagt ttgagctgcc ttcaatgagc caatttttgc 3420
 ccataatgga taaaggcaat ttgtttagtt caactgctca cagaataatg ttaaaatgaa 3480
 attaaaataa ggtggcctgg tcacacacac aaaaaaaaaac taatgttggg tggttgaatt 3540
 ttatattacg gaatgtaata ttatatttta aaataaaatt atgttattta gattcttaat 3600
 attttgagca ttccatacta taatttogta tacataatat taaaatatag taatataaag 3660
 tgtaattaac tttaaattac aagcataata ttaaattttg aatcaattaa tttttatttc 3720
 tattatttta attaatthag tctatttttt caaaataaaa tttaaatcta aataaaaata 3780
 attttcctt aatgttgaaa caactcatgt tatacttcaa aattataagt attatattta 3840
 ccttgatgat ttatttatta gtatattaat tctgattata attatggtgg gatacaatcg 3900
 ctttccacta aatattttta ctatgattta taaatttatt tcaacatcgt atatttactt 3960
 attaatatcat aatttatcat aattttatgg aaattgagac caagaacat taagagaaca 4020
 aattctataa caaagacaat ttagaaaaaa atgtactttt aggtaatttt aagtactctt 4080
 aaccaaacac aaaaattcaa atcaaatgaa ctaaataaga taatataaca tacggaacat 4140
 ctacttgta atcttacatt ccataatth tattatgaaa aataatctta tattactcga 4200
 actaaatggt gtcacaaatt attatctaaa taaagaaaaa cacttaattt ttataacatt 4260
 ttttcatata tttgaaagat tatattttgt atatttacgt aaaaatattt gacatagatt 4320

ES 2 702 207 T3

gagcaccttc ttaacataat cccaccataa gtcaagtatg tagatgagaa attggtacaa 4380
acaacgtggg gccaaatccc accaaacat ctctcattct ctctataaa aggcttgcta 4440
cacatagaca acaatccaca cacaaatata cggtcttttc tttctatttg attaaccatg 4500
tgcggaattg ttggcgcaat agcacaagg gacgtagcag aaatccttct tgaaggactc 4560
cgtcgtctgg aatacagagg atatgattct gccggtctag ccggtttaga tgcggaaggt 4620
cacatgacac gtctaagacg tctgggtaag gttcaaatgc tggctcaagc agccgaagaa 4680
catcctttac atgggtggcag aggtattgct cacactagat gggctactca cggtgaacct 4740
tcagaggtaa atgctcatcc acatgtctct gagcacattg tggctcgttca caacgggatc 4800
atcgaaaacc atgaaccact tcgagaagag ctgaaagctc gtggctatac tttcgtttca 4860
gagacagaca ctgaggtgat tgctcatctc gtgaactggg aactgaaaca agggggaact 4920
ctgagagagg ctgttctacg tgctatccct caattacgtg gtgcttacgg gacagtgatc 4980
atggattcaa gacaccaga tacactgctg gcagcaaggt ctggtagtcc actggtgatt 5040
ggactgggga tgggagaaaa ctttatcgct tcggatcaac tggctctggt acctgtgaca 5100
cggagattta tcttccttga agagggcgat atcgcgaaa taactcgacg tagcgtaaac 5160
atcttcgata aaaccggagc agaagtaaaa cgccaggata tcgaatccaa tcttcaatac 5220
gacgcgggag ataaaggcat ataccgacac tacatgcaga aagagatcta cgagcaaccg 5280
aacgctatca agaataccct tactggcggt atctcacatg gtcagggtga cttatctgaa 5340
ctgggaccaa acgcagacga actactgtcg aaggtagaac atattcagat cctcgcgtgt 5400
ggtacttctt ataactctgg tatggtcagt cgctattggt ttgaatcaact ggcaggaatt 5460
ccttgcgacg tcgaaattgc ctcggaattc agatatcgca agtctgcagt aagacgcaac 5520
agcctgatga taacgttatc tcagtctgga gaaacggctg atacactggc tggattacgt 5580
ctgtcaaaag agcttggcta ccttggttct ctagcaatct gtaacgttcc tggtagctct 5640
cttgtcgag aatctgatct tgctcttatg actaacgtg gtacagaaat cggggtggca 5700
tccacaaaag catttacaac tcaacttacg gtgctgctaa tgcttgtggc aaagctgtct 5760
agactcaaag gtctagatgc ctccatcgag catgatatcg ttcattggtct gcaagctctt 5820
cctagccgaa ttgagcagat gctgtcacia gacaaaagga ttgaagccct ggcagaagat 5880
ttctcagaca agcatcacgc tttgtttctc ggtcgtggcg atcagtatcc tatcgtctc 5940
gaaggcgcat tgaagctcaa agagatctcc tatatacacg ctgaagctta cgtgcaggc 6000
gaactgaaac acggacctct agctcttatt gacgcagata tgcccggtat cgtcgttgca 6060
ccaaacaacg aattgctgga gaagctgaaa tcaaatattg aagaggtacg tgcaagaggc 6120
ggacaacttt atgtcttcgc tgagcaagat gccggttttg taagtagcga taacatgcac 6180
atcatcgaga tgcctcacgt ggaagaggtg attgctccga tcttctacac agttcccctg 6240

ES 2 702 207 T3

cagcttctgg cttatcacgt tgccttatac aaaggaactg acgttgacca gccaaggaat 6300
 ctcgcaaagt cagtaacggt tgagtaaacg cgtggcgcgc ccccgatccg cgtttgtggt 6360
 ttctgggttt ctcacttaag cgtctgcggt ttacttttgt attgggtttg gcgtttagta 6420
 gtttgcggta gcgttcttgt tatgtgtaat tacgcttttt cttcttgctt cagcagtttc 6480
 ggttgaaata taaatcgaat caagtttcac tttatcagcg ttgttttaaa ttttgccatt 6540
 aaattggtga aaattgcttc aattttgtat ctaaatagaa gagacaacat gaaattcgac 6600
 ttttgacctc aaatcttcga acatttattt cctgatttca cgatggatga ggataacgaa 6660
 agggcggttc ctatgtccgg gaaagtccc gtagaagaca atgagcaaag ctactgaaac 6720
 gcggacacga cgtgcattg gtacggatat gagttaaacc gactcaattc ctttattaag 6780
 acataaacgg attttggtta aagtgaaca gtgagctgat ataaaaccga aacaaaccgg 6840
 tacaagtttg attgagcaac ttgatgaca acttcagaat tttggttatt gaatgaaat 6900
 catagtctaa tcgtaaaaaa tgtacagaag aaaagctaga gcagaacaaa gattctatat 6960
 tctggttcca atttatcatc gctttaacgt ccctcagatt tgatcgggga attcgatatc 7020
 attacctgt tatccctaaa gcttattaat gtttgcgag gagaaatag agtcgaggca 7080
 tggatacact aagttcccct gaagtgagca tgatctttga tgctgagatg attcccagag 7140
 caagatagtt tgtgctgcaa gtgacacaat tgtaatgaa ccaccactca acgaatttac 7200
 ttgtggcttt gacatgtcgt gtgctctggt tgtatttgtg agtgccgggt ggtaattatt 7260
 tttgttaatg tgattttaaa acctcttatg taaatagtta ctttatctat tgaagtgtgt 7320
 tcttgtggtc tatagtttct caaagggaaa ttaaaatggt gacatcccat ttacaattga 7380
 taacttggtg tacacaaact ttgtaaattt ggtgatattt atggtcgaaa gaaggcaata 7440
 cccattgtat gttccaatat caatatcaat acgataactt gataaacta acatatgatt 7500
 gtcattgttt ttccagtatc aatatacatt aagctactac aaaattagta taaatcacta 7560
 tattataaat ctttttcggt tgtaacttgt aattcgtggg tttttaaaat aaaagcatgt 7620
 gaaaattttc aaataatgtg atggcgcaat tttattttcc gagttccaaa atattgccgc 7680
 ttcattacc taatttgtgg cgccacatgt aaaacaaaag acgattctta gtggctatca 7740
 ctgccatcac gcggatcact aatatgaacc gtcgattaaa acagatcgac ggtttataca 7800
 tcattttatt gtacacacgg atcgatatct cagccgtag atttaatatg cgatctgatt 7860
 gctcaaaaaa tagactctcc gtctttgcct ataaaaacaa tttcacatct ttctcaccca 7920
 aatctactct taaccgttct tcttcttcta cagacatcaa tttctctcga ctctagagga 7980
 tccaagctta tcgatttcga acccctcagg cgaagaacag gtatgatttg tttgtaatta 8040
 gatcaggggt ttaggtcttt ccattacttt ttaatgtttt ttctgttact gtctccgcga 8100

ES 2 702 207 T3

tctgatttta cgacaataga gtttcgggtt ttgtccatt ccagtttgaa aataaaggtc 8160
cgtcttttaa gtttgctgga tcgataaacc tgtgaagatt gagtctagtc gatttattgg 8220
atgatccatt cttcatcgtt tttttcttgc ttcgaagttc tgtataacca gatttgtctg 8280
tgtgcgattg tcattaccta gccgtgtatc gagaactagg gttttcagat caattttgcc 8340
ccttttggtt atatctggtt cgataacgat tcatctggat tagggtttta agtggtgacg 8400
tttagtattc caatttcttc aaaatttagt tatggataat gaaaatcccc aattgactgt 8460
tcaatttctt gttaaatgcg cagatcacia tggcttcgat ctctctctca gtcgagaccg 8520
ttagccggac cgccctgct caggccaaca tggtggtctc gttcaccggc cttaagtcca 8580
acgccgcctt ccccaccacc aagaaggcta acgacttctc cacccttccc agcaacggtg 8640
gaagagttca atgtatgcag gtgtggccgg cctacggcaa caagaagttc gagacgctgt 8700
cgtacctgcc gccgctgtct atggcgccca ccgtgatgat ggctcgtcg gccaccgccg 8760
tcgctcgtt ccaggggctc aagtccaccg ccagcctccc cgtcgcccg cgtcctcca 8820
gaagcctcgg caacgtcagc aacggcgaa ggatccggtg catggccggc gccgaggaga 8880
tcgtgctgca gcccatcaag gagatctccg gcaccgtcaa gctgccgggg tccaagtgc 8940
tttccaaccg gatcctcta ctgcccgcc tgtccgagg gacaacagt gttgataacc 9000
tgctgaacag tgaggatgtc cactacatgc tcggggcctt gaggactctt ggtctctctg 9060
tcgaagcggg caaagctgcc aaaagagctg tagttgttg ctgtggtgga aagttcccag 9120
ttgaggatgc taaagaggaa gtgcagctct tcttgggaa tgctggaatc gcaatgcggt 9180
ccttgacagc agctgttact gctgctggtg gaaatgcaac ttacgtgctt gatggagtac 9240
caagaatgag ggagagacc attggcgact tggttgtcgg attgaagcag cttggtgcag 9300
atgttgattg tttccttggc actgactgcc cacctgttcg tgtcaatgga atcggagggc 9360
tacctgggtg caaggtcaag ctgtctggct ccatcagcag tcagtacttg agtgccttgc 9420
tgatggctgc tcctttggct cttggggatg tggagattga aatcattgat aaattaatct 9480
ccattccgta cgtcgaaatg acattgagat tgatggagcg ttttgggtg aaagcagagc 9540
attctgatag ctgggacaga ttctacatta agggaggtca aaaatacaag tccccataaa 9600
atgcctatgt tgaaggtgat gcctcaagcg caagctattt cttggctggt gctgcaatta 9660
ctggagggac tgtgactgtg gaaggttgtg gcaccaccag tttgcagggt gatgtgaagt 9720
ttgctgaggt actggagatg atgggagcga aggttacatg gaccgagact agcgttaactg 9780
ttactggccc accgcgggag ccatttggga ggaaacacct caaggcgatt gatgtcaaca 9840
tgaacaagat gcctgatgtc gccatgactc ttgctgtggt tgccctctt gccgatggcc 9900
cgacagccat cagagacgtg gcttcctgga gagtaaagga gaccgagagg atggttgcga 9960
tccggacgga gctaaccaag ctgggagcat ctgttgagga agggccggac tactgcatca 10020

ES 2 702 207 T3

tcacgccgcc ggagaagctg aacgtgacgg cgatcgacac gtacgacgac cacaggatgg 10080
 cgatggcttt ctcccttgcc gcctgtgccg aggtccccgt caccatccgg gaccctgggt 10140
 gcacccggaa gaccttcccc gactacttcg atgtgctgag cactttcgtc aagaattaag 10200
 ctctagaact agtggatccc ccgatccgcg tttgtgtttt ctgggtttct cacttaagcg 10260
 tctgcgtttt acttttgtat tgggtttggc gtttagtagt ttgcggtagc gttcttgta 10320
 tgtgtaatta cgcttttct tcttgcttca gcagtttcgg ttgaaatata aatcgaatca 10380
 agtttcaact tatcagcgtt gttttaaatt ttggcattaa attggtgaaa attgcttcaa 10440
 ttttgtatct aaatagaaga gacaacatga aattcgactt ttgacctcaa atcttcgaac 10500
 atttatttcc tgatttcacg atggatgagg ataacgaaag ggcggttcct atgtccggga 10560
 aagttcccgat agaagacaat gagcaaagct actgaaacgc ggacacgacg tcgcattggt 10620
 acggatatga gttaaaccga ctcaattcct ttattaagac ataaaccgat tttggttaaa 10680
 gtgtaacagt gagctgatat aaaaccgaaa caaacggta caagtttgat tgagcaactt 10740
 gatgacaaac ttcagaattt tggttattga atgaaaatca tagtctaate gtaaaaaatg 10800
 tacagaagaa aagctagagc agaacaaaga ttctatattc tggttccaat ttatcatcgc 10860
 tttaacgtcc ctcaagattg atcgggaaac caaacgctcg tgagacagtt tggttaacta 10920
 taacggtcct aaggtagcga tcgaggcatt acggcattac ggcaactcgc aggggtccgaa 10980
 ttcgagcatg gagccattta caattgaata taccctgccg 11020

REIVINDICACIONES

1. Una célula de planta de algodón que comprende un gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:
- 5 a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,
- b) una región de ADN que codifica un polipéptido de GFAT en donde dicha GFAT es codificada por una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:
- 10 i) una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1,
- ii) o una variante de la misma, en la que uno o más nucleótidos difieren de la secuencia nucleotídica según SEQ ID 1, con la condición de que dicha variante no difiera en más de 20 nucleótidos de SEQ ID 1,
- 15 que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) según SEQ ID 2
- iii) o una secuencia complementaria de i) o ii), y
- c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación, en donde dicha célula de planta de algodón comprende adicionalmente un segundo gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:
- 20 a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,
- 25 b) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de quitina sintasa y
- c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.
2. Una célula de planta de algodón según la reivindicación 1, en la que dicha quitina sintasa es una N-acetilglucosamina transferasa del tipo Nod C.
- 30 3. Una célula de planta de algodón según la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido de quitina sintasa comprende una señal de localización en el aparato de Golgi.
- 35 4. Una planta de algodón que consiste esencialmente en células de planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Fibras obtenibles de una planta de algodón según la reivindicación 4.
- 40 6. Un hilo o una tela hechos de fibras según la reivindicación 5.
7. Un método para producir fibras de algodón con polisacáridos cargados positivamente, tales como oligo-N-acetilglucosaminas u oligoglucosaminas, que comprende las etapas de
- 45 1) expresar en una célula de planta de algodón un gen quimérico que comprende las siguientes regiones de ADN ligadas operativamente:
- a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,
- 50 b) una región de ADN que codifica un polipéptido de GFAT en donde dicha GFAT está codificada por una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una secuencia nucleotídica según SEQ ID 1,
- 55 ii) o una variante de la misma, en donde uno o más nucleótidos difieren de la secuencia nucleotídica según SEQ ID 1, con la condición de que dicha variante no difiera en más de 20 nucleótidos de SEQ ID 1,
- que codifica una glutamina:fructosa-6-fosfato-amidotransferasa (GFAT) según SEQ ID 2
- 60 iii) o una secuencia complementaria de i) o ii), y
- c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación, y comprende expresar un segundo gen quimérico que comprende
- 65 a) un promotor expresable en plantas tal como un promotor preferente en fibras,

- 5
- b) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de quitina sintasa y
 - c) opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación
- 2) regenerar una planta de algodón a partir de células de plantas de algodón de la etapa i) y
- 3) opcionalmente aislar fibras de dicha planta de algodón.

Figura 1

```

1 atgtgCGGaa ttgttggcgc aatagcacaaggacgtag cagaaatcct
51 tcttgaagga ctccgctcgc tggatacagaggatatgat tctgccggtc
101 tagccgttgt agatgccgaa ggtcacatga cacgtctaag acgtctgggt
151 aaggttcaaa tgctggctca agcagccgaa gaacatcctt tacatgggtg
201 cacaggtatt gctcacacta gatgggctac tcacggtgaa ccttcagagg
251 taaatgctca tccacatgct tctgagcaca ttgtggctcgt tcacaacggg
301 atcatcgaaa accatgaacc acttcgagaa gagctgaaag ctogtggcta
351 tactttcgtt tcagagacag aactgaggt gattgctcat ctogtgaact
401 gggaactgaa acaaggggga actctgagag aggctgttct acgtgctatc
451 cctcaattac gtggctgctta cgggacagtg atcatggatt caagacacc
501 agatacactg ctggcagcaa ggtctggtag tccactggtg attggactgg
551 ggatgggaga aaactttatc gcttcggatc aactggctct gttacctgtg
601 acacggagat ttatcttcct tgaagagggc gatatcgcgg aaataactcg
651 acgtagcgtg aacatcttcg ataaaaccgg agcagaagta aaacgccagg
701 atatcgaatc caatcttcaa tacgacgccg gcgataaagg catataccga
751 cactacatgc agaaagagat ctacgagcaa ccgaacgcta tcaagaatac
801 ccttactggg cgtatctcac atggtcaggt tgacttatct gaactgggac
851 caaacgcaga cgaactactg tcgaaggtag aacatattca gatcctcgcg
901 tgtggactt cttataactc tggatggctc agtcgctatt ggtttgaatc
951 actggcagga attccttgcg acgtcgaaat tgcctcggaa ttcagatatac
1001 gcaagtctgc agtaagacgc aacagcctga tgataacggt atctcagctc
1051 ggagaaacgg ctgatacact ggttgatta cgtctgtcaa aagagcttgg
1101 ctaccttggg tctctagcaa tctgtaacgt tcttggtagc tctcttggc
1151 gagaatctga tcttgcctt atgactaacg ctggtacaga aatcggggtg
1201 gcatccacaa aagcatttac aactcaactt acggtgctgc taatgcttgt
1251 ggcaaagctg tctagactca aaggtctaga tgcctccatc gagcatgata
1301 tcgttcatgg tctgcaagct cttcctagcc gaattgagca gatgctgtca
1351 caagacaaaa ggattgaagc cctggcagaa gatttctcag acaagcatca
1401 cgctttgttt ctccgctcgtg gcgatcagta tcctatcgtc ctogaaggcg
1451 cattgaagct caaagagatc tcctatatac acgctgaagc ttacgctgca
1501 ggcgaaactg aacacggacc tctagctctt attgacgcag atatgcccg
1551 tatcgtcgtt gcaccaaaca acgaattgct ggagaagctg aaatcaaata
1601 ttgaagaggt acgtgcaaga ggcggacaac tttatgtctt cgctgagcaa
1651 gatgccggtt ttgtaagtag cgataacatg cacatcatcg agatgcctca
1701 cgtggaagag gtgattgctc cgatcttcta cacagttccc ctgcagcttc
1751 tggcttatca cgttgccctt atcaaaggaa ctgacggtga ccagccaagg
1801 aatctcgcaa agtcagtaac ggttgagtaa

```

Figura 2

MCGIVGAI AQRDVAEILLEG LRRLE YRGYDSAGLAVVDAEGHMTRLRRLGKVQMLAQAEHPLHG GTGIA
HTRWATHGEPSEVNAHPHVSEHIVVVHNGI IENHEPLREELKARGYTFVSETDTEVIAHLVNWELKQGGT
LREAVLRAIPQLRGAYGTVIMDSRHPDTLLAARSGSPLVIGLGMGENFIASDQLALLPVTRRFIFLEEGD
IAEITRRSVNIFDKTGAEVKRQDIESNLQYDAGDKGIYRHYMQKEIYEQPNAIKNTLTGRISHGQVDLSE
LGPNADELLSKVEHIQILACGTSYNSGMVSRYWFEFLAGIPCDVEIASEFRYRKSAVRRNSLMITLSQSG
ETADTLAGLRRLSKELGYLGSLAICNVPGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAKLS
RLKGLDASIEHDIVHGLQALPSRIEQMLSQDKRIEALAEDFS DKHHALFLGRGDQYPIALEGALKLKEIS
YIHAEAYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNELLEKLKLSNIEEVRARGGQLYVFAEQDAGFVSSDNMH
IIEMPHVEEVIAPIFYTVPLQLLAYHVALIKGTDVDQPRNLAKSVTVE